Aus dem Institut für Biologie der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. Enno Hartmann

Charakterisierung der Importin α -Spezifität von Kernimportsubstraten

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– aus der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät –

Vorgelegt von Beate Friedrich aus Berlin

Lübeck, 2007

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Enno Hartmann

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. Charli Kruse

3. Berichterstatter: Prof. Dr. Nils Johnsson

4. Berichterstatter: Prof. Dr. Hermann Haller

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Peters

INHALTSVERZEICHNIS

I١	IAH	_TS\	/ERZEICHNIS	I							
Z	USA	ММІ	ENFASSUNG	1							
Α	ABSTRACT2										
1 EINLEITUNG											
	1.1	Nul	kleozytoplasmatischer Transport	3							
	1.2	Imp	ortin $lpha/eta$ -vermittelter Kernimport	4							
	1.3		Die funktionellen Domänen von Importin α und Aufbau des Importin α/β -Heterodimers								
	1.4	Die	Importin α -Proteinfamilie	8							
	1.5	Zie	lsetzung	10							
2	EF	RGE	BNISSE	11							
	2.1	Imp	oortin $lpha$ -Spezifität in lebenden Zellen	11							
	2.	1.1	Herunterregulation der ubiquitär vorkommenden humanen Importin α -Isoformen in HeLa-Zellen mittels siRNAs	11							
	2.	1.2	Die α -Importine unterscheiden sich in ihrer Stabilität	13							
	2.	1.3	Die α -Importine besitzen spezifische Funktionen, die für das Zellwachstum von Bedeutung sind	14							
	2.2		erminanten für die Importin α -Spezifität von nimportsubstraten	17							
	2.2	2.1	Importin α -Spezifität kann in einem <i>in vitro</i> Bindungsassay visualisiert werden	17							
	2.2	2.2	Die NLS ist nicht die einzige Determinante für Importin α -Bindungspräferenzen	22							
	2.2	2.3	Importin α -Bindungsspezifität in Gegenwart von Importin β	24							
	2.2	2.4	NLS und Gesamtproteinkontext eines Kernimportsubstrates tragen gemeinsam zur Importin α -Bindungsspezifität bei	27							
	2.2	2.5	Die Bedeutung des Proteinkontextes für die Importin α -Spezifität wird auch im <i>in vitro</i> Kernimport deutlich	31							
	2.2	2.6	Beide basischen Sequenzabschnitte des RCC1 N-Terminus tragen zur Importin α -Bindung bei	36							
	2.2	2.7	Der relative Beitrag des Proteinkontextes eines Importsubstrates an der Importin α -Bindungsspezifität überwiegt gegenüber dem relativen Beitrag der NLS.	39							
	2.2	2.8	Importin α -Bindungspräferenzen können durch Mutationen in der Linker-Region einer <i>bipartite</i> NLS beeinflusst werden	41							

3	DISKUSSION			43
	3.1	Spe	zifische Funktionen der $lpha$ -Importine in lebenden Zellen	43
	3.2		kturelle Eigenschaften von Kernimportsubstraten immen Importin $lpha$ -Spezifität	45
	3.	.2.1	Die bipartite NLS von RCC1	46
	3.	.2.2	Die Importin α -Spezifität des RCC1	47
	3.	.2.3	Die Funktion der autoinhibitorischen Domäne	47
	3.	.2.4	Bedeutung von NLS und Gesamtproteinkontext eines Importsubstrates für Importin α-Spezifität	49
		3.2.4.	Der Proteinkontext und Importin $lpha$ -Spezifität	49
		3.2.4.	Die NLS und Importin α -Spezifität	50
4	M	IATE	RIAL UND METHODEN	54
	4.1	Mat	erial	54
	4.	.1.1	siRNAs	54
	4.	.1.2	Primer	54
	4.	.1.3	Plasmide	56
	4.	.1.4	Antikörper	59
	4.	.1.5	Bakterienstämme	
	4.	.1.6	Humane Zelllinien	60
	4.	.1.7	Chemikalien und Lösungen	60
	4.2	Met	hoden	61
	4.	.2.1	Molekularbiologische Methoden	61
		4.2.1.	-	
		4.2.1.	2 Klonierungen	61
		4.2.1.	3 Transformation von <i>E. coli</i>	61
		4.2.1.	Herstellung elektrokompetenter E. coli-Zellen	62
		4.2.1.	5 PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten	63
4.2.1		4.2.1.	6 Kolonie-PCR	63
		4.2.1.		
		4.2.1.		
		4.2.1.	5	
	4.	.2.2	Zellbiologische Methoden	
		4.2.2.	3 - 1 - 1	
		4.2.2.	3	
		4.2.2.3		
		4.2.2.4	4 Zellaufschluss	65

		4.2.2.5	Cycloheximid-Abbauexperiment	66
		4.2.2.6	Transfektion von HeLa-Zellen mit siRNAs	66
		4.2.2.7	Apoptose-Induktion mit Staurosporin	66
	4.2	2.3 P	roteinbiochemische Methoden	67
	ı	4.2.3.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	67
		4.2.3.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	67
		4.2.3.3	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	68
		4.2.3.4	Westernblot-Analyse	69
	į	4.2.3.5	Überexpression und Reinigung von GST-getaggten Proteinen	69
		4.2.3.6	Überexpression und Reinigung von His-getaggten Proteinen	71
		4.2.3.7	Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen	73
		4.2.3.8	In vitro Kernimportassay	74
		4.2.3.9	Importin $lpha$ -Bindungsassay	75
		4.2.3.10	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	76
5	RI	EFERE	NZEN	77
6	Al	NHANG	3	84
	6.1	Abkü	rzungen	84
	6.2		sagung	
	6.3		nslauf	
			kationen und Vorträge	
	6.4		ublikationen	
	6.4	4.2 V	orträge	90
	6.5	Fides	stattliche Erklärung	90

ZUSAMMENFASSUNG

Importin α und Importin β sind die Kerntransportrezeptoren des "klassischen" Kernimportweges und üben ihre Funktion als Heterodimer aus. Importin α bindet hierbei als Adapter an die Kernlokalisationssequenz (NLS) des zu importierenden Substrates, und Importin β vermittelt durch Interaktionen mit Kernporenproteinen den Kernimport des trimeren Importkomplexes. Bisherigen Daten zufolge besitzt ein Importsubstrat eine erhöhte Affinität für ein Importin β -gebundenes Importin α . In dieser Arbeit stellte sich jedoch heraus, dass auch Importin β bevorzugt an Substrat-gebundene α -Importine bindet. Demzufolge könnte die Bindung des Substrates an Importin α der Importin β -Bindung vorausgehen und somit einen Import des Substrat-unbeladenen Importin α/β -Dimers verhindern.

Während es nur eine Importin β -Isoform gibt, wurden bisher sechs verschiedene humane Importin α -Isoformen identifiziert. Die Bedeutung dieser Importin α -Vielfalt für den Organismus war bisher nicht bekannt. *In vitro* Studien deuteten jedoch auf unterschiedliche Substratspezifitäten der Importin α -Isoformen hin. Ob allerdings diese Ergebnisse auf spezialisierte Kernimportfunktionen der α -Importine in lebenden Zellen schließen lassen, war unklar. Um dieser Frage nachzugehen, wurden die α -Importine sowie Importin β in HeLa-Zellen mittels siRNAs (*small interfering RNAs*) einzeln herunterreguliert. Dies ließ die Expression der jeweils anderen Importine unbeeinflusst und führte im Fall von Importin α 3, α 5, α 7 und Importin β zu einer deutlichen Inhibition des Zellwachstums. Dadurch wurde deutlich, dass zumindest diese Importin α -Isoformen spezifische Funktionen in lebenden Zellen erfüllen.

Auf den Ergebnissen aufbauend wurde eine Analyse der Determinanten für eine spezifische Substratbindung an bevorzugte α -Importine durchgeführt. Bisherigen Vermutungen zufolge sollte alleine die NLS eines Substrates eine selektive Importin α -Bindung vermitteln. Für die Untersuchungen wurden zwei gut charakterisierte Modell-Substrate ausgewählt: RCC1, das eine ausgeprägte Präferenz für Importin α 3 und α 4 besitzt, und Nucleoplasmin, das durch diverse α -Importine in den Zellkern transportiert werden kann. Eine Analyse der bisher nur präliminär charakterisierten RCC1-NLS ergab, dass zwei basische Sequenzabschnitte im N-Terminus des RCC1 an der Importin α -Bindung beteiligt sind. Die NLS-Sequenzen der beiden Modell-Substrate wurden ausgetauscht. Durch *in vitro* Bindungs- und Importstudien wurde deutlich, dass die NLS zwar erforderlich ist, aber nicht ausreicht, um eine ausgeprägte Importin α -Spezifität zu vermitteln. Es konnte gezeigt werden, dass der Gesamtproteinkontext eines Substrates die spezifische Importin α -Bindung maßgeblich beeinflusst.

ABSTRACT

Importin α and importin β are the nuclear transport receptors of the "classical" nuclear import pathway and function as a heterodimer. Importin α acts as an adapter by binding both the import substrate via the nuclear localization sequence (NLS) and importin β . Importin β facilitates the translocation of the ternary import complex through the nuclear pore complex by interacting with nuclear pore proteins. Previous data showed that binding of import substrates to importin α is enhanced in the presence of importin β . In this study, it is demonstrated that importin β also binds with increased affinity to substrate-bound importin α . Thus, it is possible that substrate binding to importin α precedes the importin β binding and thereby prevents nuclear import of empty importin α/β heterodimers.

While only one importin β isoform exists, six human α importins have been described previously. The importance of this importin α diversity for the organism was unclear until now. Interestingly, several *in vitro* import studies have indicated different substrate-specificities of the importin α isoforms. Whether or not these results reflect specialized import functions of α importins in living cells was unclear. To address this question, the expression of importin α isoforms and importin β was individually down-regulated in HeLa cells using siRNAs (*small interfering RNAs*). This did not affect the expression levels of the other respective importins. Down-regulation of importin α 3, α 5, α 7 or importin β strongly inhibited cell proliferation. Thereby it was shown that these importins exhibit specific functions in living cells.

Emanating from these results the determinants for a specific substrate binding to particular α importins were analyzed. Up to now, it was assumed that only the NLS of a substrate is responsible for mediating importin α selectivity. To examine this issue, two well characterized import substrates were investigated as a model, RCC1 and nucleoplasmin. RCC1 has a pronounced preference for importin α 3 and α 4, whereas nucleoplasmin can be transported into the nucleus by various α importins. By analyzing the so far only roughly characterized NLS of RCC1 it turned out that two clusters of basic amino acids in the RCC1 N terminus contribute to importin α binding. The NLS of the two model substrates were exchanged. *In vitro* binding studies and nuclear import assays revealed that the NLS of a substrate is necessary but not sufficient to mediate pronounced importin α selectivity. It could be demonstrated that the whole-protein context of import substrates is a major determinant for mediating importin α specificity.

1 EINLEITUNG

1.1 Nukleozytoplasmatischer Transport

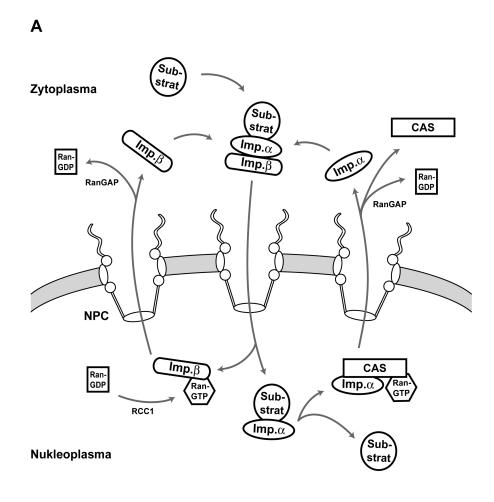
Eine Haupteigenschaft, die Eukaryonten von Prokaryonten unterscheidet, ist die Existenz eines Zellkerns. Er ist durch eine Doppelmembran umschlossen, die Teil des endoplasmatischen Retikulums ist und Nukleoplasma von Zytoplasma trennt. Im Zellkern finden u.a. DNA-Replikation, Transkription und der Zusammenbau von Ribonukleoproteinkomplexen statt. Alle daran beteiligten Proteine müssen vom Ort ihrer Synthese, dem Zytoplasma, in den Kern gelangen. Umgekehrt müssen Komponenten, die entweder im Kern generiert werden oder sich nur temporär darin befinden, denselben verlassen. Der nukleozytoplasmatische Austausch dieser Moleküle erfolgt durch Kernporenkomplexe (NPC, nuclear pore complex). Diese makromolekularen Strukturen besitzen in Wirbeltieren eine Größe von ca. 120 MDa und sind in die Kernmembran eingebettet. NPCs weisen eine achtfache Rotationssymmetrie auf. Mindestens 30 unterschiedliche Proteine (Nukleoporine) sind an ihrem Aufbau beteiligt. Von einer zentralen, in die Membran eingebetteten und einen Kanal bildenden Struktur ragen lange Filamente in das Zytoplasma sowie in den Nukleus. Im letzteren wird durch eine ringartige Verknüpfung der Filamente ein korbähnliches Gefüge gebildet. Die Translokation von Ionen, kleinen Molekülen und Proteinen bis 40 kDa durch Kernporenkomplexe kann durch passive Diffusion erfolgen, wohingegen größere Proteine, RNAs und Ribonukleoproteine (RNPs) aktiv mittels Transportfaktoren transloziert werden. Die meisten Proteine, ribosomalen Untereinheiten und einige RNAs, die in den Kern hinein oder aus dem Kern heraus transportiert werden müssen, werden durch lösliche Kerntransportrezeptoren der großen, evolutionär konservierten Familie der Importin β-ähnlichen Proteine importiert oder exportiert. Diese Proteinfamilie umfasst 14 Mitglieder in der Hefe, während das humane Genom mehr als 20 Gene enthält. Die meisten Mitglieder der Proteinfamilie sind entweder auf den nukleären Import (Importine) oder auf den Export von Proteinen aus dem Zellkern (Exportine) spezialisiert und interagieren direkt oder über Adapterproteine mit ihren Substraten. Die Assoziation mit Importsubstraten erfolgt über nukleäre Lokalisationssequenzen (NLS, nuclear localization sequence), umgekehrt binden Exportine an nukleäre Exportsignale von Substraten (NES, nuclear export sequence). Die Translokation durch den Kernporenkomplex wird über Interaktionen der Importine oder Exportine mit Nukleoporinen vermittelt. Die Regulation von Kernimport und -export erfolgt über die GTPase Ran. Im Kern bindet die GTP-gebundene Form von Ran (RanGTP) an die Kerntransportrezeptoren. Bei einer Importreaktion führt dies zur Dissoziation von Importkomplexen. Bei einer Exportreaktion kommt es zur Assemblierung von

Exportkomplexen, in denen RanGTP enthalten ist. Die Exportkomplexe dissoziieren nach erfolgtem Transport durch die Kernpore im Zytoplasma durch Aktivierung des Ran und der daraus resultierenden Hydrolyse des Ran-gebundenen GTP. Die ausschließlich nukleäre Lokalisation der GTP-gebundenen Form von Ran wird durch die entsprechende Lokalisation der beiden Ran-Effektoren erreicht: Der Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF, *guanine nucleotide exchange factor*) RCC1 befindet sich Chromatin-gebunden im Kern und katalysiert den Übergang von RanGDP zu RanGTP durch Nukleotidaustausch. Das GTPase-aktivierende Enzym RanGAP1 (GAP, *GTPase-activating protein*) hingegen befindet sich im Zytoplasma und sorgt dort mit Hilfe von Ran-Bindeproteinen für eine effektive Hydrolyse des Ran-gebundenen GTP (als Review s. Görlich und Kutay, 1999; Macara, 2001; Weis, 2003).

1.2 Importin α/β -vermittelter Kernimport

Bei der Identifizierung der ersten Importine war unter anderem die Etablierung eines *in vitro* Kernimportassays von großem Nutzen. In diesem Versuchsansatz wurde die Zellmembran durch das Detergenz Digitonin durchlässig gemacht und das Zytosol ausgewaschen. Ein fluoreszenzmarkiertes Importsubstrat konnte dann durch Zusatz von molekularen Energielieferanten und definierten zytosolischen Fraktionen in den Kern transportiert werden (Adam *et al.*, 1990). Diese Beobachtung, dass für den Kernimport von Proteinen bestimmte zytosolische Faktoren wichtig sind, führte letztendlich zur Identifizierung der ersten Transportfaktoren, Importin α und Importin β , deren Transportfunktion mit Hilfe des Kernimportassays nachgewiesen werden konnte (Adam und Adam, 1994; Görlich *et al.*, 1995; Görlich *et al.*, 1994).

Importin α und Importin β üben ihre Funktion als Heterodimer aus, wobei Importin α eine Adapter-Funktion hat und sowohl an Substrat als auch an Importin β bindet. Importin β vermittelt als eigentlicher Kerntransportrezeptor durch Interaktion mit Nukleoporinen den Kernimport des trimeren Importkomplexes (Görlich und Kutay, 1999). Im Kern bindet RanGTP an Importin β , wodurch dieses vom Importkomplex abdissoziiert (Chi *et al.*, 1996; Görlich *et al.*, 1996b; Rexach und Blobel, 1995). Der Importin β /RanGTP-Komplex kann den Nukleus direkt verlassen (Hieda *et al.*, 1999; Izaurralde *et al.*, 1997). Importin α dagegen wird durch den RanGTP-gebundenen Exportfaktor CAS wieder ins Zytoplasma transportiert, dessen Bindung an Importin α im Nukleus die Substrat-Freigabe fördert (s. Abb. 1A) (Gilchrist *et al.*, 2002; Kutay *et al.*, 1997). Ein Nukleoporin (Nup50) ist ebenfalls unterstützend bei der Substrat-Freigabe beteiligt (Matsuura und Stewart, 2005). Mittlerweile konnten viele Aspekte dieses "klassischen" Kernimportweges analysiert und aufgeklärt werden. Dabei stellte sich unter anderem heraus, dass viele verschiedene Proteine über den Importin α / β -



В

monopartite SV40 NLS: PKKKRKV

bipartite Nucleoplasmin NLS: KRPAATKKAGQAKKKK

Abb. 1: Komponenten klassischen Kernimports. (A) Importin α/β -vermittelter Kerntransport. Der Importkomplex, bestehend aus Importin α , Importin β und Substrat, gelangt durch die Kernporenkomplexe (NPC) in den Kern. Im Nukleoplasma bindet RanGTP, das mit Hilfe von RCC1 aus RanGDP gebildet wurde, an Importin β , das dadurch vom Komplex abdissoziiert und den Kern in RanGTP-gebundener Form wieder verlässt. Importin α wird durch den RanGTP-gebundenen Exportfaktor CAS wieder ins Zytoplasma transportiert. Im Zytoplasma dissoziieren die Exportkomplexe durch die von RanGAP katalysierte Hydrolyse des Ran-gebundenen GTP. (**B**) Die Prototypen klassischer NLS: Die *monopartite* NLS des großen T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40) und die *bipartite* Nucleoplasmin NLS. Die an der Importin α -Bindung vorrangig beteiligten basischen Aminosäuren sind fett gedruckt.

vermittelten Transportweg in den Kern gelangen und dass die funktionelle Vielfalt dieser Proteine die Vielfältigkeit der Substrate anderer Kernimport-Rezeptoren übertrifft. Eine Gemeinsamkeit der Importin α/β -Substrate liegt in dem Vorhandensein einer "klassischen" NLS, die von Importin α gebunden wird. Klassische NLS bestehen entweder aus einer einzelnen Anhäufung basischer Aminosäuren (*monopartite* NLS)

oder aus zwei basischen Sequenzabschnitten (*bipartite* NLS), die durch zehn bis zwölf Aminosäuren voneinander getrennt sind ("Linker-Region") (Dingwall und Laskey, 1991). Die Prototypen beider Gruppen sind die *monopartite* NLS des großen T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40 large T-Ag NLS) (Kalderon et al., 1984) und die *bipartite* Nucleoplasmin NLS (s. Abb. 1B) (Robbins et al., 1991). Mittlerweile existieren Kristallstrukturen mehrerer NLS im Komplex mit Importin α (Conti und Kuriyan, 2000; Conti et al., 1998; Fontes et al., 2003a; Fontes et al., 2000).

1.3 Die funktionellen Domänen von Importin α und Aufbau des Importin α/β -Heterodimers

Importin α besteht aus einer flexiblen, basischen N-terminalen Importin β -Bindedomäne (IBB-Domäne) (Görlich et al., 1996a; Weis et al., 1996), einer großen, strukturierten NLS-bindenden Domäne, die zehn hintereinander liegende "Armadillo" (ARM)-Motive umfasst, und einem kurzen C-Terminus (Conti et al., 1998; Kobe, 1999). Die ARM-Motive sind nach dem Protein Armadillo in *Drosophila melanogaster* benannt, in dem dieses Strukturmotiv, das sich in vielen Proteinen wieder findet und in Protein-Protein-Wechselwirkungen involviert ist, zuerst entdeckt wurde (Peifer et al., 1994). Ein einzelnes ARM-Motiv besteht aus ca. 40 Aminosäuren, welche drei α -Helices bilden (H1, H2 und H3), die in einem etwa dreieckigen Querschnitt angeordnet sind (s. Abb. 2A). Die ARM-Motive sind hintereinander gestapelt und erzeugen eine superhelikale Struktur mit einer flachen Grube (s. Abb. 2B). Je zwei Helices der ARM-Motive (H1 und H2) formen die gewölbte Außenfläche des Proteins, und die H3-Helices bilden die konkave Innenfläche, die von konservierten Asparagin- und Tryptophan-Resten gesäumt ist und in der sich zwei NLS-Bindungsstellen befinden. Die NLS-Bindungsstellen umfassen Aminosäuren der ARM-Motive eins bis vier (größere, Nterminale Bindungsstelle) und vier bis acht (kleinere, C-terminale Bindungsstelle) (Conti et al., 1998; Fontes et al., 2000). Bei der NLS-Bindung an Importin α sind sowohl polare als auch hydrophobe Wechselwirkungen beteiligt. Bipartite NLS binden an beide NLS-Bindungsstellen, wobei das N-terminale basische Cluster einer bipartite NLS an die kleinere Bindungsstelle bindet und das C-terminale basische Cluster an die größere Bindungsstelle; die bipartite NLS ist also antiparallel zur Superhelix der ARM-Motive ausgerichtet (Conti und Kuriyan, 2000; Fontes et al., 2003a; Fontes et al., 2000). *Monopartite* NLS können an beide NLS-Bindungsstellen von Importin α binden, aber in den bisher untersuchten Fällen scheint nur die Bindung an die größere. N-terminale Bindungsstelle physiologisch relevant zu sein (Conti und Kuriyan, 2000; Conti et al., 1998; Fontes et al., 2003b; Fontes et al., 2000).

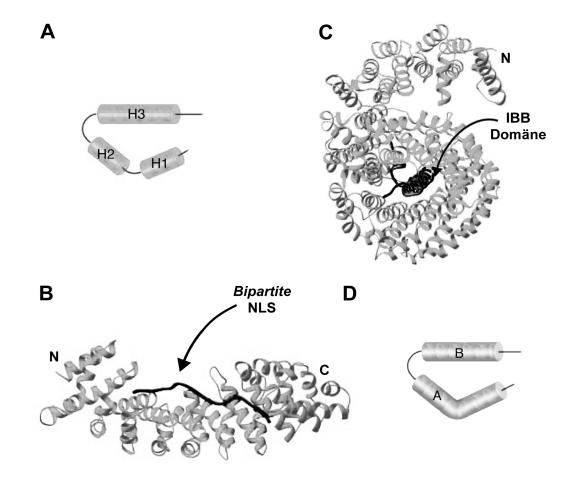


Abb. 2: Strukturen und strukturelle Einheiten von Importin α und Importin β . (A) Schematische Darstellung eines ARM-Motivs von Importin α . Die drei α -Helices sind mit H1-3 gekennzeichnet. (B) Die Struktur der NLS-bindenden ARM-Domäne von Importin α mit gebundener *bipartite* NLS. (C) Die Struktur von Importin β mit gebundener IBB-Domäne von Importin α . (D) Schematische Darstellung eines HEAT-Motivs. Die Helices A und B sind gekennzeichnet. Die Strukturen wurden dem Review (Conti und Izaurralde, 2001) entnommen.

Die N-terminale IBB-Domäne des Importin α , die ca. 40 häufig basische Aminosäuren umfasst, erfüllt zwei Funktionen: Importin β -Bindung und Autoinhibition. In Abwesenheit von Importin β und/oder eines Importsubstrats bindet eine NLS-ähnliche Sequenz in der IBB-Domäne an die größere NLS-Bindungsstelle von Importin α (Kobe, 1999). Obgleich diese Interaktion mit der NLS-Bindung kompetitiert, können Importsubstrate auch in Abwesenheit von Importin β an Importin α binden. Allerdings ist in diesem Fall die Affinität signifikant niedriger (Hu und Jans, 1999; Rexach und Blobel, 1995). Die Reihenfolge der Bindungen von Substrat und Importin β an Importin α ist bisher nicht bekannt (Goldfarb et al., 2004). Bei der Bindung von Importin β . Im IBB-Importin β -Komplex faltet sich die IBB-Domäne zu einer α -Helix, die von einem Großteil von Importin β (carboxy-terminal) spiralförmig umschlossen wird, wobei der Innenbereich

der Importin β-Windung negativ geladen und damit elektrostatisch komplementär zur IBB-Domäne ist (s. Abb. 2C) (Cingolani et al., 1999). Ähnlich wie Importin α ist auch Importin β aus hintereinander geschalteten Helix-Motiven aufgebaut, 19 sogenannten HEAT-Motiven (der Name bezieht sich auf die Proteine, in denen das Motiv zuerst gefunden wurde: Huntingtin, elongation factor 3, A-Untereinheit der Phosphatase 2A und Lipid-Kinase TOR1). Diese bestehen aus je ca. 40 Aminosäuren, die in einer gebogenen α -Helix (A-Helix) und einer geraden α -Helix (B-Helix) angeordnet sind (s. Abb. 2D). Die Struktur von ARM- und HEAT-Motiven ist sehr ähnlich: Die A-Helix eines HEAT-Motivs entspricht dem H1/H2-Helix-Duo des ARM-Motivs, die B-Helix entspricht der H3-Helix. Wie die ARM-Motive bilden auch die hintereinander gestapelten **HEAT-Motive** eine superhelikale Struktur, Außenfläche von den gekrümmten A-Helices und deren konkave Innenfläche von den B-Helices gebildet wird (Cingolani et al., 1999; Conti und Izaurralde, 2001).

1.4 Die Importin α -Proteinfamilie

Während es nur eine Importin β -Isoform gibt, wurden bisher sechs verschiedene humane Importin α -Isoformen gefunden (Cortes *et al.*, 1994; Cuomo *et al.*, 1994; Köhler *et al.*, 1999; Köhler *et al.*, 1997; Weis *et al.*, 1995). Die α -Importine wurden entsprechend ihrer Sequenzähnlichkeit in drei verschiedene Subfamilien unterteilt (s. Abb. 3) (Köhler *et al.*, 1997). Die erste Subfamilie besteht aus Importin α 1, auch

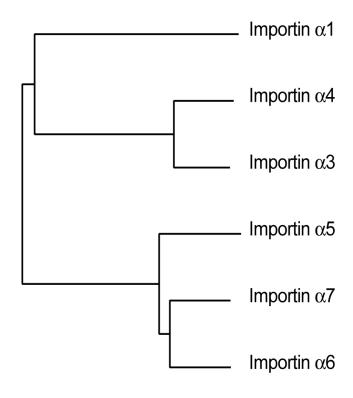


Abb. 3: Ähnlichkeits-Dendrogramm der humanen Importin α -Isoformen. Das Dendrogramm wurde auf der Basis eines Alignments der humanen Importin α -Proteinsequenzen mit dem Programm ClustalW (Version 1.83, Gonnet-Matrix) Zugangserstellt. nummern für die Proteinseguenzen in NCBI Datenbank: P52292 (Importin α 1), O00629 (Importin α 3), (Importin α 4), O00505 P52294 (Importin α 5), O15131 (Importin α 6), AAC15233 (Importin α 7).

Rch1 genannt. Das dem Importin α 1 am nähsten verwandte Importin ist das in *Xenopus laevis* gefundene Importin α 2 (Görlich *et al.*, 1994), das bisher zwar in anderen Wirbeltieren, aber nicht in Säugetieren identifiziert wurde. Die zweite Importin α -Subfamilie besteht aus Importin α 3/Qip1 und Importin α 4/hSRP1 γ . Die dritte Subfamilie wird von Importin α 5/hSRP1, Importin α 6 und Importin α 7 gebildet. Mitglieder verschiedener Subfamilien haben ca. 50 % Sequenzähnlichkeit, während Mitglieder derselben Subfamilie mindestens 80 % Sequenzidentität besitzen (Köhler *et al.*, 1999; Köhler *et al.*, 1997). Importin α -Gene der dritten Subfamilie sind in allen Eukaryonten präsent (einschließlich Pilzen und Pflanzen), während α -Importine der ersten und zweiten Subfamilie nur in mehrzelligen Tieren zu finden sind. Dies deutet darauf hin, dass letztere erst während der Evolution der Metazoa entstanden sind (als Review s. Goldfarb *et al.*, 2004).

Die Zahl der Importin α -Gene steigt mit der Komplexität eines Organismus. In der Bäckerhefe gibt es nur ein Importin α , das essentiell ist (Yano *et al.*, 1994; Yano *et al.*, 1992). In der Taufliege *Drosophila melanogaster* existieren drei α -Importine, je eines aus den drei Subfamilien, für die z.T. spezifische Funktionen nachgewiesen wurden. Das *Drosophila* Importin α 2 ist das Homologe zum humanen Importin α 1 und hat eine Funktion in der Gametogenese. Sowohl männliche als auch weibliche Fliegen, denen dieses Gen fehlt, weisen Defekte bei der Gametogenese auf und sind steril (Mason *et al.*, 2002). *Drosophila* Importin α 3 ist hingegen für die Entwicklung essentiell (Mason *et al.*, 2003).

Säugetiere und Menschen besitzen mehr als drei α -Importine. Der Grund für diese Importin α -Vielfalt war bisher nicht aufgeklärt. Obgleich sich die α -Importine in ihren zell- und gewebespezifischen Expressionsmustern unterscheiden, werden alle Isoformen abgesehen von Importin α 6, das bisher nur im Hoden nachgewiesen wurde. ubiquitär exprimiert (Hogarth et al., 2006; Köhler et al., 2002; Köhler et al., 1999; Köhler et al., 1997; Tsuji et al., 1997). In vitro Importstudien zeigten, dass es Importsubstrate gibt, die von mehreren α -Importinen gebunden bzw. transportiert werden, z.B. das Chaperon Nucleoplasmin (Köhler et al., 1999), die DNA Topoisomerase II (Mirski et al., 2007) oder der Autoimmunregulator AIRE (Ilmarinen et al., 2006). Auf der anderen Seite wurden aber auch Substrate gefunden, die in in vitro Experimenten spezifisch von bestimmten α -Importinen in den Zellkern importiert werden. Zu diesen Substraten gehören z.B. die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT2, deren Kernimport durch Importin α 5 erfolgt (Melen et al., 2003; Sekimoto et al., 1997) sowie NF- κ B, der spezifisch von Importin α 3 und α 4 gebunden wird (Fagerlund *et al.*, 2005), oder auch der Guaninnukleotid-Austauschfaktor RCC1, der preferentiell von Importin $\alpha 3$ transportiert wird (Köhler et al., 1999; Talcott und Moore, 2000). Ob jedoch diese Ergebnisse von *in vitro* Studien eine differentielle Importfunktion der α -Importine in lebenden Zellen widerspiegeln ist unklar, da in solchen *in vitro* Versuchen die Bedingungen von den physiologischen Verhältnissen in lebenden Zellen abweichen. Zum Beispiel differieren die Proteinkonzentrationen der verwendeten Proteine von den physiologischen Konzentrationen, und es fehlt im *in vitro* Experiment die Vielfalt an zellulären Proteinen und somit die möglichen Kompetitionspartner.

Wodurch die bei einigen Substraten *in vitro* beobachteten Importin α -Spezifitäten bestimmt werden, ist ebenfalls ungeklärt. Ist die Eigenschaft eines Substrates, präferenziell mit bestimmten α -Importinen zu interagieren, allein in seiner NLS verschlüsselt, oder tragen andere Proteinbereiche bzw. die Gesamtstruktur des Substrates dazu bei? NLS-Sequenzen sind sowohl nötig als auch hinreichend für den Kernimport über den Importin α / β -vermittelten Transportweg (Kalderon *et al.*, 1984; Lanford *et al.*, 1986; Robbins *et al.*, 1991), und frühere *in vitro* Kernimportstudien ergaben auch erste Hinweise darauf, dass verschiedene NLS mit unterschiedlichen Affinitäten an einzelne α -Importine binden (Miyamoto *et al.*, 1997; Nadler *et al.*, 1997). Ob dies jedoch für die bevorzugte Substratbindung an ein einzelnes α -Importin ausreichen kann, wurde nicht gezeigt.

1.5 Zielsetzung

In der vorliegenden Doktorarbeit sollte zuerst der Frage nachgegangen werden, ob Importin α -Spezifität in lebenden, humanen Zellen tatsächlich existiert. Da sich dies als zutreffend herausstellte, wurden im Weiteren die Determinanten, die für eine bevorzugte Bindung eines Substrates und dessen Kernimport durch bestimmte α -Importine verantwortlich sind, eingehender untersucht.

2 ERGEBNISSE

2.1 Importin α -Spezifität in lebenden Zellen

2.1.1 Herunterregulation der ubiquitär vorkommenden humanen Importin α -Isoformen in HeLa-Zellen mittels siRNAs

Um der Frage nachzugehen, ob die α -Importine tatsächlich spezifische Funktionen in lebenden Zellen ausüben, wurde die Expression der ubiquitär exprimierten α -Importine $(\alpha 1, \alpha 3, \alpha 4, \alpha 5 \text{ und } \alpha 7)$ jeweils einzeln mittels siRNAs (small interfering RNAs) in HeLa-Zellen herunterreguliert. siRNAs sind kleine, aus 21-23 Nukleotiden bestehende, doppelsträngige RNA-Stücke mit homologer Sequenz zu einer zelleigenen mRNA. Sie werden in den Zielzellen von einem Endoribonuklease-Proteinkomplex (RISC, RNAinduced silencing complex) gebunden, der anhand der siRNA das komplementäre Stück der zelleigenen mRNA findet und diese zerschneidet (als Review s. Hannon, 2002). Für alle α -Importine sowie für Importin β wurde eine einzelne siRNA konstruiert; im Falle von Importin α 3 wurde zusätzlich eine weitere siRNA entworfen, um das Auftreten von Primer-spezifischen Effekten auszuschließen (s. Abb. 4A). Mit den einzelnen siRNAs wurden HeLa-Zellen transfiziert und drei Tage später geerntet. Ein Teil der Zellen wurde auf die Verminderung der Proteinmenge des entsprechenden Importins hin untersucht, während ein anderer Teil neu ausgesät und am nächsten Tag erneut transfiziert wurde. Nach weiteren drei Tagen (sieben Tage nach der ersten Transfektion) wurden die Zellen erneut geerntet, gezählt und mittels Westernblot-Analyse wurde die Importin-Mengenreduktion in den Zellen bestimmt. Die Menge der α -Importine verringerte sich unterschiedlich schnell in den entsprechend transfizierten Zellen: Drei Tage nach der ersten Transfektion war nur die Proteinmenge von Importin α1 drastisch reduziert (unter 20 % des Ausgangswertes), während für eine ähnlich starke Verminderung der anderen α-Importine die zweite siRNA-Transfektion nötig war. Nach sieben Tagen (drei Tage nach der zweiten Transfektion) war die Proteinmenge aller α -Importine auf mindestens 20 % abgesunken, verglichen mit der Importin α -Menge in Kontrollzellen, die nur mit dem Transfektionsreagenz ohne siRNA behandelt worden waren (s. Abb. 4B bzw. nicht gezeigte Daten). Die Verminderung der Importin β-Menge nach sieben Tagen siRNA-Behandlung war weniger deutlich, jedoch reproduzierbar (s. Abb. 4B). Die beiden gegen Importin α3 gerichteten siRNAs zeigten eine vergleichbare Effektivität (s. Abb. 4C). Die Proteinmenge aller α -Importine ließ sich also durch sieben Tage siRNA-Behandlung um mindestens 80 % reduzieren.

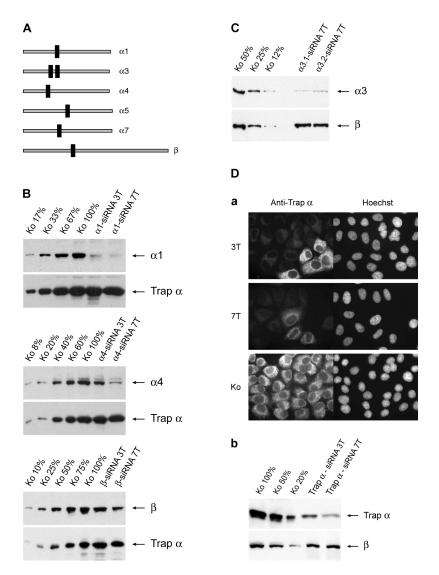


Abb. 4: : siRNA-vermittelte Proteinverminderung der einzelnen α -Importine und Importin β in HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden zweimal (am Tag 0 und am Tag 4) mit siRNAs transfiziert und an Tag 3 und Tag 7 mittels entsprechender spezifischer Primärantikörper per SDS-PAGE und Westernblot-Analyse oder Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Kontrollzellen, die mit Transfektionsreagenz ohne siRNA behandelt worden waren, dienten als Vergleich. (A) Schematische Darstellung der Importin-cDNA-Sequenzen. Die Regionen, die für die Herstellung von siRNAs verwendet worden waren, sind als schwarze Rechtecke dargestellt. Im Fall von Importin a3 wurden zwei verschiedene siRNAs für die Versuche herangezogen. (B) Westernblot-Analysen von Lysaten aus Importin $\alpha 1$ -, $\alpha 4$ - und β -siRNAtransfizierten HeLa-Zellen. Gleiche Mengen Zelllysat (10 µg) der siRNA-transfizierten Zellen wurden durch SDS-PAGE separiert und anschließend mittels Immunoblotting mit Importin-spezifischen Primärantikörpern analysiert. Unterschiedliche Mengen Zelllysat von Kontrollzellen dienten als Vergleich. Ein gegen das ER-Protein Trap α gerichteter Antikörper fungierte als Ladungskontrolle. (C) Westernblot-Analyse von Lysaten aus HeLa-Zellen, die mit den zwei unterschiedlichen α 3-siRNAs transfiziert worden waren. SDS-PAGE/Westernblotting erfolgte mit einem α3-spezifischen Primärantikörper zur Analyse der Importin α 3-Verminderung und einem spezifischen anti-Importin β -Antikörper als Ladungskontrolle. Unterschiedliche Mengen Kontrollzelllysat dienten als Vergleich. (D) Bestimmung der siRNA-Transfektionseffizienz mit einer siRNA gegen Trap α. (a) Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie der siRNA-transfizierten Zellen mit einem spezifischen anti-Trap α-Antikörper. Die linken Felder zeigen Trap α-spezifische Fluoreszenzsignale, die rechten Ausschnitte machen die DNA durch Interkalierung des Farbstoffes Hoechst sichtbar. (b) Westernblot-Analyse von Zelllysaten mit einem spezifischen anti-Trap α -Antikörper. Ein spezifischer anti-Importin β -Antikörper diente als Ladungskontrolle. α , Importin α ; β , Importin β ; Ko, Kontrolle; T, Tage.

Um die Transfektionseffizienz bei den siRNA-Experimenten zu bestimmen, wurde eine Kontroll-siRNA gegen ein unbeteiligtes Protein, das im ER lokalisierte Trap α , herangezogen. Immunfluoreszenzanalysen mit einem spezifischen anti-Trap α -Antikörper ergaben, dass nach sieben Tagen siRNA-Behandlung in mehr als 95 % der Zellen die Fluoreszenz drastisch reduziert war, während sich in weniger als 5 % der Zellen die Fluoreszenzsignale vergleichbar mit denen in untransfizierten Kontrollzellen zeigten (s. Abb. 4D, für die Abbildung wurden Bereiche mit transfizierten und untransfizierten Zellen gewählt). Die Herunterregulation der Expression von Trap α in den transfizierten Zellen wurde mittels Immunoblotting bestätigt, wobei das Ausmaß der Proteinverminderung vergleichbar war zur Importin α -Reduktion in den oben beschriebenen Importin α -siRNA-Experimenten (s. Abb. 4D). Die siRNA-Transfektionseffizienz liegt also bei über 95 %.

2.1.2 Die α -Importine unterscheiden sich in ihrer Stabilität

Bei den siRNA-Experimenten wurde beobachtet, dass sich die Proteinmenge der α-Importine in HeLa-Zellen durch siRNA-Behandlung unterschiedlich schnell verringerte (s. Abb. 4B bzw. nicht gezeigte Daten). Dies könnte in unterschiedlichen Proteinstabilitäten der α -Importine begründet sein. Um die Stabilitäten der α -Importine zu untersuchen, wurde die Translation in HeLa-Zellen durch Cycloheximid inhibiert und die Abnahme der Importin α -Menge in den Zellen durch Immunoblotting analysiert. Die Proteinmengen an Importin α 1 und α 5 verminderten sich sichtbar in dem betrachteten Zeitraum von 48 h, wobei die Importin α1-Menge nach 48 h auf ca. 25 % abgesunken und damit am deutlichsten reduziert war. Von noch längeren Cycloheximid-Inkubationen wurde abgesehen, da die zellschädigende Wirkung des Cycloheximid nach zwei Tagen in erhöhtem Maße zum Absterben der Zellen führte. In einem Versuchsansatz wurde zusätzlich zum Cycloheximid der Proteasom-Inhibitor ALLN für einen Zeitraum von 6 h eingesetzt (zu einem späteren Zeitpunkt waren die Zellen durch das ALLN zu sehr geschädigt). ALLN hemmte den Abbau von Importin α 1 und α 5; die Degradation dieser beiden Importine ist demzufolge Proteasom-abhängig. Importin α 3, α 4, α 7 und Importin β zeigten sich in dem 48-stündigen Versuchszeitraum stabil (s. Abb. 5). Die Verminderung dieser Importine wird in den siRNA-Versuchen daher vermutlich hauptsächlich durch Zellteilung bewirkt, was die Notwendigkeit einer längeren siRNA-Behandlung erklärt. Dagegen korreliert der rasche Abbau von Importin α 1 mit einer effizienten Herunterregulation der Expression des Proteins schon drei Tage nach siRNA-Transfektion.

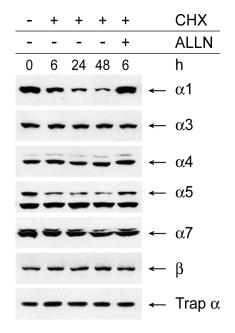


Abb. 5: Die α -Importine sind in HeLa-Zellen unterschiedlich stabil. HeLa-Zellen wurden bis zu 48 h mit Cycloheximid bzw. 6 h mit Cycloheximid und dem Proteasom-Inhibitor ALLN inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zelllysate hergestellt und die Proteinkonzentrationen bestimmt. Jeweils 10 μg Protein wurden einer SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotting mit den anti-Importin α spezifischen Antikörpern unterzogen. anti-Trap α-Antispezifischer körper diente als Ladungskontrolle. α , Importin α ; β , Importin β; CHX, Cycloheximid.

2.1.3 Die α -Importine besitzen spezifische Funktionen, die für das Zellwachstum von Bedeutung sind

Die siRNA-vermittelte Reduktion jeder einzelnen Importin α -Isoform ließ die Expression der anderen Isoformen unbeeinflusst (s. Abb. 6). Die Herunterregulation der einzelnen α -Importine war somit spezifisch. Insbesondere war keine vermehrte Expression anderer Isoformen zu beobachten. Die einzelnen α -Importine gehören somit vermutlich separaten regulatorischen Netzwerken an.

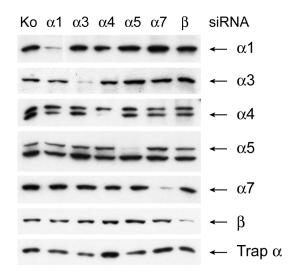


Abb. 6: Die Herunterregulation einzelner α-Importine lässt die Expression der anderen Isoformen unbeeinflusst. HeLa-Zellen wurden wie in Abb. 4 beschrieben zweimal mit jeweils der gleichen Importin α-siRNA transfiziert. Nach 7 Tagen wurden gleiche Mengen Zelllysat per SDS-PAGE und Westernblotting mit den spezifischen anti-Importin α-Antikörpern untersucht (für die Detektion von Importin α 7 wurde der anti- α 6/ α 7-Antikörper verwendet). Ein gegen Trap α gerichteter Antikörper fungierte als Ladungskontrolle. α, Importin α ; β , Importin β ; Ko, Kontrollzellen.

Hätten die α -Importine spezifische Import-Funktionen in lebenden Zellen, sollte der Import spezifisch transportierter Substrate in den entsprechend siRNA-behandelten Zellen inhibiert sein. Das bisher am besten charakterisierte Beispiel eines Importin α -spezifischen Kernimports ist der Transport des RCC1 (Guaninnukleotid-Austauschfaktor der GTPase Ran) in den Zellkern. In *in vitro* Studien war eine deutliche Abhängigkeit des RCC1-Imports von Importin α 3 gezeigt worden (Köhler *et al.*, 1999; Talcott und Moore, 2000). Dr. Christina Quensel untersuchte daher, ob in Importin α 3-siRNA-transfizierten Zellen ein verminderter Kernimport von RCC1 gemessen werden konnte. Tatsächlich beobachtete sie einen verlangsamten Transport von RCC1 in den Zellkern, wenn sie dieses in das Zytosol von α 3-siRNA-behandelten Zellen mikroinjizierte (Quensel *et al.*, 2004). Es gab keine generelle Beeinträchtigung des Importin α -beteiligten Kernimports in den siRNA-behandelten Zellen, da Nucleoplasmin, ein Substrat, das von mehreren Importin α -Isoformen transportiert wird (Köhler *et al.*, 1999), nach Mikroinjektion unverändert importiert wurde.

Als nächstes wurde untersucht, ob auch für andere Importin α -Isoformen spezifische Funktionen in Zellen nachgewiesen werden konnten. Falls die einzelnen α -Importine essentielle Funktionen hätten, sollte dies am Zellwachstum der entsprechend siRNA-transfizierten Zellen erkennbar sein. Um den Effekt der Importin α -Herunterregulation auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurden die HeLa-Zellen am Ende der siRNA-Transfektions-Experimente gezählt. Die Zellzahl der Importin α 3-, α 5- und α 7-siRNA-transfizierten Zellen war sehr viel geringer (meistens < 30 %) als die Anzahl der Kontrollzellen, die nur mit dem Transfektionsreagenz behandelt worden waren. Der Effekt auf die Zellzahl durch die Herunterregulation der Expression von Importin α 3 war bei beiden α 3-siRNAs zu beobachten und in seinem Ausmaß vergleichbar. Die α 1-siRNA-transfizierten Zellen zeigten eine nur leicht verminderte Zellzahl am Versuchsende im Vergleich zu den Kontrollzellen, während die α 4-siRNA-Behandlung keinen Einfluss auf die Proliferation der HeLa-Zellen gehabt hatte (s. Abb. 7). Importin α 3, α 5 und α 7 besitzen somit spezifische Funktionen in den Zellen.

Die Herunterregulation der Expression von Importin β resultierte ebenfalls in einer stark verminderten Zellzahl im Vergleich zu den Kontrollzellen, wobei der Effekt in seinem Ausmaß vergleichbar war mit der reduzierten Zellzahl, die aus der α 3-, α 5- oder α 7-siRNA-Behandlung hervorgegangen war (s. Abb. 7). Interessanterweise war das Importin β -Proteinlevel in den verbliebenen Zellen höher als die Proteinmenge an Importin α 3, α 5 oder α 7 in den entsprechend siRNA-behandelten Zellen (s. Abb. 4 und Abb. 6). Dies zeigt, dass eine geringe Reduktion an Importin β schädlicher für die Zellen ist als die vergleichbare Reduktion einer einzelnen Importin α -Isoform.

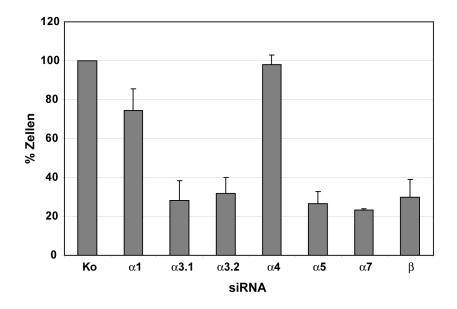


Abb. 7: Effekt der siRNA-vermittelten Importin α -Verminderung auf die Zellzahl. HeLa-Zellen wurden wie in Abb. 4 beschrieben zweimal mit jeweils der gleichen Importin α -siRNA transfiziert. Nach sieben Tagen wurden die Zellen geerntet und gezählt. Zellzahlen der siRNA-transfizierten Zellen wurden prozentual auf die Zahl der Kontrollzellen bezogen, die als 100 % definiert wurde. Es wurden drei bis sechs Experimente durchgeführt. Das Balkendiagramm gibt Mittelwerte mit Standardabweichungen der Mittelwerte wieder. α 3.1 und α 3.2 repräsentieren die zwei verschiedenen Importin α 3-siRNAs. α , Importin α ; β , Importin β ; Ko, Kontrollzellen.

Die im Vergleich zu den Kontrollzellen verminderte Zellzahl nach der Behandlung mit den entsprechenden siRNAs könnte ihre Ursache in einer erhöhten Zelltod-Rate haben. Deshalb wurde das Vorkommen von Apoptose in den siRNA-behandelten Zellen mittels eines spezifischen Antikörpers gegen den Apoptose-Marker PARP analysiert. Die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) wird während des Apoptose-Prozesses von einer Protease gespalten, wodurch ein charakteristisches Fragment entsteht (Kaufmann et al., 1993; Lazebnik et al., 1994). Westernblot-Analysen mit dem spezifischen anti-PARP-Antikörper ergaben jedoch, dass keine signifikante Menge des apoptotischen Spaltproduktes in den Zelllysaten der siRNA-behandelten Zellen vorhanden war. Zellen hingegen, in denen Apoptose durch das Alkaloid Staurosporin induziert worden war, zeigten ein deutliches Signal des PARP-Spaltproduktes (s. Abb. 8). Apoptose scheint also nicht die Hauptursache für die geringe Zellzahl nach Importin α 3-, α 5-, α 7- oder Importin β-Herunterregulation zu sein. Ebenso wurde kein vermehrtes Auftreten nekrotischer Zellen beobachtet. Dr. Christina Quensel untersuchte deshalb mittels FACS-Analysen, ob der Ablauf des Zellzyklus in den α 3-, α 5-, α 7- oder β -siRNAtransfizierten Zellen an einem bestimmten Punkt deutlich verändert war und die geringe Zellzahl am Versuchsende erklären könnte. Dies war jedoch nicht zu beobachten (Quensel et al., 2004), we shall be svermutlich in den α 3-, α 5-, α 7- oder β -siRNAbehandelten Zellen zu einem allgemein verminderten Zellwachstum gekommen war.

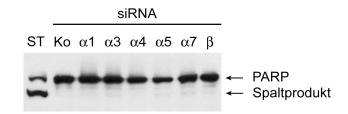


Abb. 8: Untersuchung von Apoptose in den Importin-defizienten Zellen. HeLa-Zellen wurden wie in Abb. 4 beschrieben zweimal mit jeweils der gleichen Importin α -siRNA transfiziert. Sieben Tage nach Beginn der siRNA-Transfektionen wurden gleiche Mengen Zelllysat per SDS-PAGE und Westernblotting mit einem spezifischen gegen PARP gerichteten Primärantikörper analysiert. HeLa-Zellen, in denen Apoptose durch Staurosporin-Inkubation (5 μ M, 8 h) induziert worden war, dienten als Positivkontrolle. Pfeile markieren die Positionen von PARP und dem Apoptose-spezifischen PARP-Spaltprodukt. ST, Staurosporin; α , Importin α ; β , Importin β ; Ko, nicht mit siRNA behandelte Kontrollzellen.

Die siRNA-Experimente haben gezeigt, dass die α -Importine in lebenden Zellen nicht redundant sind, sondern dass einzelne Importin α -Isoformen spezifische Funktionen haben, die für ein geregeltes Zellwachstum von Bedeutung sind.

2.2 Determinanten für die Importin α -Spezifität von Kernimportsubstraten

2.2.1 Importin α -Spezifität kann in einem *in vitro* Bindungsassay visualisiert werden

In den ersten Experimenten konnte gezeigt werden, dass die Importin α -Isoformen in Zellen spezifische Funktionen haben. Doch welche Strukturen in Substraten determinieren den präferenziellen Kerntransport durch bestimmte α -Importine? Eine Möglichkeit ist, dass allein Unterschiede in der NLS die Differenzen in den Affinitäten der Substrate zu den verschiedenen α -Importinen bewirken. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass andere Domänen der Substrate ausschlaggebend für die spezifische Bindung an entsprechende α -Importine sind.

Um den Einfluss der NLS auf die Importin α -Spezifität zu untersuchen, wurden zwei Modell-Substrate mit unterschiedlicher Importin α -Präferenz ausgewählt: RCC1, der Guaninnukleotid-Austauschfaktor für die GTPase Ran, und Nucleoplasmin, ein saures Chaperon. Beide Proteine besitzen eine terminal lokalisierte NLS und einen Hauptteil, der sich selbständig stabil falten kann (Dutta *et al.*, 2001; Renault *et al.*, 1998). Der Hauptteil von RCC1 bildet eine 7-blättrige Propeller-Struktur (Renault *et al.*, 1998), während der unstrukturierte N-Terminus zwei basische Cluster enthält (s. Abb. 9A) und

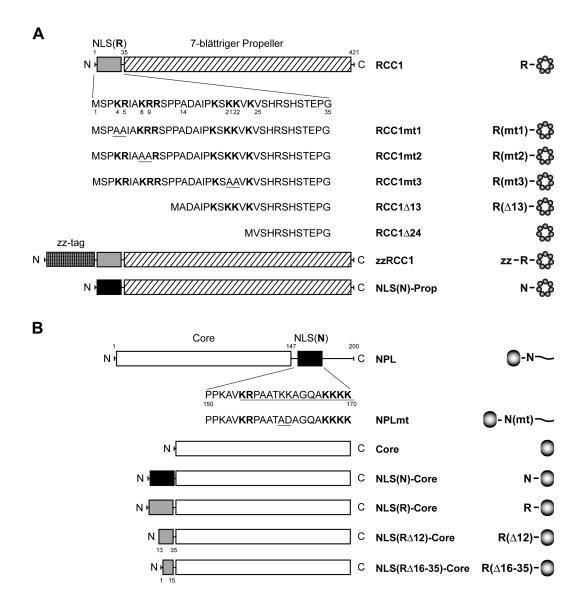


Abb. 9: Übersicht über die in den Experimenten verwendeten Importsubstrate. (A) Schematische Darstellungen von RCC1 und RCC1-Derivaten. RCC1 ist mit den relativen Positionen von Propeller-Domäne und NLS gezeigt. Die Sequenz des NLS-beinhaltenden N-Terminus ist aufgelistet, wobei basische Reste fett gedruckt sind. Konstrukte mit N-terminalen Mutationen und Deletionen sind darunter aufgelistet. Unterstrichene Aminosäuren kennzeichnen Mutationen. zzRCC1 besteht aus dem Wildtyp-RCC1 und einem N-terminal fusionierten zz-Tag (zwei Immunglobulin G-Bindedomänen von Protein A). NLS(N)-Prop wurde durch Fusion der in (B) aufgelisteten Nucleoplasmin-Region N-terminal an RCC1A24 erhalten. (B) Schematische Darstellungen von Nucleoplasmin (NPL) und Nucleoplasmin-verwandten Substraten. Nucleoplasmin ist mit den relativen Positionen von Core-Domäne und NLS gezeigt. Die Sequenz der NLS-umfassenden Region, die für weitere Konstrukte verwendet wurde, ist aufgelistet. Die durch kristallographische Analysen verifizierte bipartite NLS (Fontes et al., 2000) ist unterstrichen. Basische Cluster, die an der Importin α-Bindung beteiligt sind, sind fett gedruckt. Eine Mutante mit modifiziertem NLS-Linker ist darunter aufgelistet, wobei die veränderten Aminosäuren unterstrichen sind. NLS(N)-Core wurde durch Fusion der NLS-umfassenden Region N-terminal an die Core-Domäne erhalten. NLS(R)-Core entstand durch Klonierung des in (A) aufgelisteten RCC1 N-Terminus N-terminal an die Nucleoplasmin Core-Domäne. Aminosäuren 13-35 des RCC1 N-Terminus wurden N-terminal an die Core-Domäne fusioniert, um das Konstrukt NLS(R∆12)-Core herzustellen, die Aminosäuren 1-15 des RCC1 N-Terminus wurden N-terminal an die Core-Domäne kloniert, um das Fusionsprotein NLS(**R**∆16-35)-Core zu erhalten.

als NLS funktionieren kann (Nemergut und Macara, 2000; Seino *et al.*, 1992; Talcott und Moore, 2000). Die gut charakterisierte NLS von Nucleoplasmin dagegen befindet sich C-terminal zum strukturierten Hauptproteinteil (Core) (s. Abb. 9B) und wurde bereits im Komplex mit dem Importin α der Bäckerhefe und Importin α 1 der Maus kristallisiert (Conti und Kuriyan, 2000; Fontes *et al.*, 2000).

Schon in früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass Importsubstrate in Abwesenheit von anderen Importfaktoren an Importin α binden können (Nemergut und Macara, 2000; Nishinaka et al., 2004; Seki et al., 1997; Weis et al., 1995). In solchen Bindungsstudien war es möglich, Importin α -Spezifitäten zu reproduzieren, die in *in vitro* Importassays beobachtet worden waren (Talcott und Moore, 2000; Welch et al., 1999). Dies deutet darauf hin, dass die Importin α -Transportspezifität direkt von der Bindungsstärke der Substrate an individuelle α -Importine abhängt. Aus diesem Grund wurde ein in vitro Bindung der Modell-Substrate RCC1 und Bindungsassay etabliert und die Nucleoplasmin an die ubiquitär vorkommenden α -Importine (α 1, α 3, α 4, α 5 und α 7) untersucht. Für diese Bindungsexperimente wurden die α -Importine mit einem Cterminalen GST-Tag versehen, rekombinant exprimiert und aufgereinigt (s. Abb. 10A). Ebenfalls C-terminal GST-getaggtes Importin β und GST selbst dienten als Kontrolle. Der Nachweis über die Vollständigkeit der C-terminal getaggten Importine wurde erbracht, indem die Proteine mit Trypsin verdaut und die N-terminalen Peptide via Massenspektrometrie nachgewiesen wurden (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren konnten bei allen α -Importinen beide Protein-Termini in einer Westernblot-Analyse mit anti-GST- und spezifischen anti-Importin α-Antikörpern nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

His-getaggtes rekombinantes RCC1 zeigte in einem Bindungsversuch die beste Bindung an Importin $\alpha 3$, eine ebenfalls effiziente Bindung an Importin $\alpha 4$ und nur eine sehr schwache Bindung an die anderen Importin α -Isoformen. Eine spezifische Bindung an Importin β wurde nicht beobachtet (s. Abb. 10B). Dieses Ergebnis ist in Einklang mit der in unterschiedlichen Transportassays beobachteten Spezifität von RCC1 (Köhler *et al.*, 1999; Quensel *et al.*, 2004; Talcott und Moore, 2000). Die Bindungsreaktion, bei der das Substrat in ca. dreifachem molarem Überschuss gegenüber den α -Importinen eingesetzt wurde, wurde in Gegenwart von 2 mg/ml BSA durchgeführt. Wurde auf die Verwendung von BSA verzichtet, kam es zur Hintergrundbindung von RCC1 an GST (Daten nicht gezeigt). Selbst wenn RCC1 in einem nur leichten molaren Überschuss gegenüber Importin $\alpha 3$ in einem Bindungsexperiment eingesetzt wurde, assoziierte fast das gesamte RCC1 mit diesem Importin. RCC1 wurde also in einem äquimolaren Verhältnis an Importin $\alpha 3$ gebunden (s. Abb. 10C: Gelspuren 1, 3 u. 5). Diese Bindung war abhängig von der mutmaßlichen NLS im N-Terminus, da ein Konstrukt, dem der

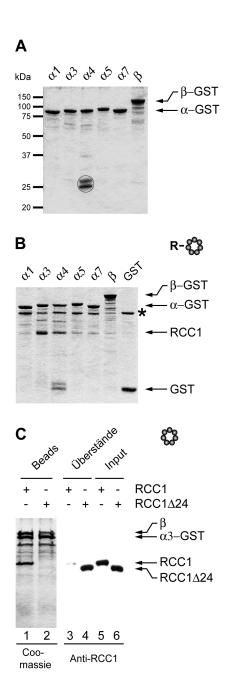


Abb. 10: RCC1 zeigt Importin α-Bindungs-Bindungsassays. spezifität in in vitro (A) Coomassie-Färbung von Glutathion (GSH)-Sepharose-gekoppelten Importinen. Äquimolare Mengen der genannten rekombinanten Importine wurden über ihren C-terminalen GST-Tag an GSH-Sepharose gebunden und einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung unterworfen. Massenspektrometrie von tryptischen Spaltpeptiden bestätigte das Vorhandensein intakter N-Termini und somit die Vollständigkeit der Importine. Des Weiteren konnte durch die massenspektrometrische Analyse gezeigt werden, dass die durch einen Kreis gekennzeichneten Kontaminationen der Importin α 4-Präparation nur aus GST-Fragmenten bestehen. (B) Coomassie-Färbung von GSH-Sepharose-assoziierten Proteinen nach Bindungsreaktionenen von RCC1 mit den \alpha-Importinen. Gleiche Mengen der angegebenen GST-getaggten Importine wurden an GSH-Sepharose gebunden und mit dem dreifachen molaren Überschuss des aufgereinigten rekombinanten RCC1 inkubiert. Gebundene Proteine wurden durch SDS-PAGE separiert. Der Stern markiert BSA, welches in den Bindungsreaktionen in einer Konzentration von 2 mg/ml verwendet wurde und trotz der Waschschritte in geringem Maße in der Sepharose verblieb. (C) Bindungsassays mit RCC1/RCC1∆24 und immobilisiertem Importin α3-GST in Gegenwart von Importin β. RCC1 und RCC1Δ24 wurden in nur leichtem molaren Überschuss gegenüber Importin α 3 eingesetzt. Gebundene und im Überstand verbliebene Proteine wurden einer SDS-PAGE unterworfen und anschließend mit Coomassie gefärbt (Sepharose-assoziierte Proteine) bzw. mittels Westernblot-Analyse mit einem spezifischen anti-RCC1-Antikörper untersucht (im Überstand verbliebene Proteine und Input-Proben). α , Importin α ; β , Importin β .

Hauptteil des N-Terminus inklusive der basischen Cluster fehlte (RCC1 Δ 24, [s. Abb. 9A]), nicht an Importin α 3 binden konnte. In Gegenwart von Importin β sind die Affinitäten von Substraten an Importin α deutlich erhöht (Catimel *et al.*, 2001; Fanara *et al.*, 2000; Rexach und Blobel, 1995). Aber auch bei Anwesenheit von Importin β war eine Bindung von RCC1 Δ 24 an Importin α 3 nicht zu detektieren (s. Abb. 10C: Gelspuren 2, 4 u. 6). Da RCC1 Δ 24 nach der Bindungsreaktion noch vollständig im Überstand vorhanden war (s. Abb. 10C: Gelspuren 4 u. 6), kann das Ausbleiben der Bindung an Importin α 3 nicht auf eine Degradation des Proteins zurückgeführt werden.

Im Gegensatz zu RCC1 und im Einklang mit früheren Studien (Köhler *et al.*, 1999) assoziierte das zweite Modell-Substrat Nucleoplasmin im Bindungsassay mit mehreren α -Importinen. Die stärkste Bindung war an Importin α 1 und α 5 zu beobachten, eine ebenfalls signifikante Bindung an Importin α 3 und α 7, und eine nur sehr schwache Bindung an Importin α 4 (s. Abb. 11A).

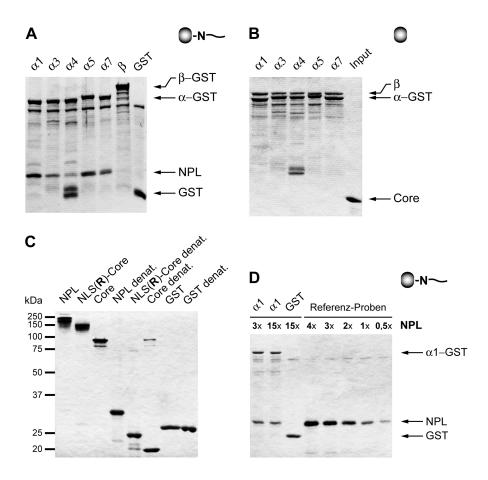


Abb. 11: Importin α-Bindungsverhalten von Nucleoplasmin. (A) Bindung von Nucleoplasmin an die verschiedenen α-Importine. Gleiche Mengen der angegebenen C-terminal GST-getaggten Importine wurden an GSH-Sepharose gebunden und mit rekombinantem Nucleoplasmin inkubiert. Gebundene Proteine wurden durch SDS-PAGE separiert und mittels Coomassie-Färbung visualisiert. (B) Importin α -Bindungsexperiment mit der Nucleoplasmin Core-Domäne. Der Versuchsablauf ist wie in (A) beschrieben, mit dem Unterschied, dass die Bindungsreaktionen in Gegenwart von Importin β durchaeführt wurden und in der SDS-PAGE eine Input-Probe als Größenveraleich mitgeführt wurde. (C) Die Core-enthaltenden Proteine bilden in Lösung Oligomere. Nucleoplasmin, Core und NLS(R)-Core wurden vergleichsweise mit (denat.) und ohne vorheriges Aufkochen einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung unterworfen. Als Kontrollprotein wurde GST mitgeführt. (**D**) Jedes im Oligomer vorhandene Nucleoplasmin-Monomer bindet an Importin α . Der Bindungversuch mit Nucleoplasmin und immobilisiertem Importin α 1-GST wurde wie unter (A) beschrieben durchgeführt, nur dass Nucleoplasmin in zwei unterschiedlichen Mengen eingesetzt wurde: Einmal in dem üblichen dreifachen molaren Überschuss gegenüber Importin α , wobei bei der Bestimmung der Molarität von einem Nucleoplasmin-Monomer ausgegangen wurde, und einmal in einem 15-fachen molaren Überschuss. In der anschließenden SDS-PAGE/Coomassie-Färbung wurden verschiedene Mengen des rekombinanten Nucleoplasmins als Referenzproben mitgeführt. Die Zahlen geben Molaritäten in Bezug auf Importin α 1-GST an. α , Importin α ; β , Importin β; NPL, Nucleoplasmin; denat., denaturiert.

Wurde der NLS-beinhaltende C-Terminus von Nucleoplasmin entfernt, so konnte die verbleibende Core-Domäne (s. Abb. 9B) weder in Abwesenheit noch in Gegenwart von Importin β and ie α -Importine binden (s. Abb. 11B bzw. nicht gezeigte Daten). Die Core-Domäne von Nucleoplasmin bildet in Lösung einen pentameren Komplex (Earnshaw et al., 1980). Dieser Komplex weist eine ungewöhnliche Stabilität auf und zeigt sogar eine partielle Resistenz gegenüber der Denaturierung während der SDS-PAGE (Dingwall et al., 1982). Um zu überprüfen, ob auch die verwendeten Core-enthaltenden Proteine (Nucleoplasmin, Core und eines der später eingeführten Konstrukte) in Lösung als solche Pentamere vorliegen, wurden diese ohne vorheriges Aufkochen einer SDS-PAGE unterworfen. Im Vergleich zu den durch Aufkochen denaturierten Proteinen und gegenüber einem Kontrollprotein (GST), das sowohl ohne als auch mit vorherigem Aufkochen auf dem Gel als Monomer erkennbar war, wurden die nicht denaturierten Core-Proteine durch die SDS-PAGE/Coomassie-Färbung tatsächlich als oligomere Strukturen sichtbar, möglicherweise als Pentamere (s. Abb. 11C). Dennoch zeigte sich einem Bindungsexperiment mit Importin α 1 und verschiedenen Nucleoplasmin, dass bei einem (bezogen auf das Monomer) dreifachen molaren Überschuss an Nucleoplasmin gegenüber Importin α das Verhältnis von Importin α 1 zu gebundenem Nucleoplasmin etwa äquimolar und die Bindung in der Sättigung war (s. Abb. 11D). Dies deutet darauf hin, dass innerhalb des Pentamers jedes Nucleoplasmin-Monomer mit je einem α -Importin interagiert.

Die Bindungsexperimente konnten somit die in früheren Importassays beobachteten Importin α -Präferenzen von RCC1 und Nucleoplasmin reproduzieren sowie die NLS-Abhängigkeit der Substratbindung an Importin α bestätigen.

2.2.2 Die NLS ist nicht die einzige Determinante für Importin α -Bindungspräferenzen

Wenn die NLS allein verantwortlich wäre für die beobachtete Importin α -Spezifität von RCC1, dann müsste die Spezifität verloren gehen, wenn die RCC1-NLS durch die Nucleoplasmin-NLS ersetzt wird. Des Weiteren müsste die Spezifität übertragbar sein, wenn die RCC1-NLS an ein anderes Protein fusioniert wird. Um dies zu überprüfen, wurden die NLS der beiden Modell-Substrate ausgetauscht.

Zur besseren Vergleichbarkeit mit RCC1, dem Protein mit der am deutlichsten ausgeprägten Importin α -Spezifität, wurden alle Fusionsproteine mit N-terminaler NLS konstruiert. Folgerichtig wurde zuerst ein Konstrukt hergestellt, das die Nucleoplasmin-NLS N-terminal zur Core-Domäne enthält: NLS(\mathbf{N})-Core (s. Abb. 9B). In einem Bindungsexperiment zeigte NLS(\mathbf{N})-Core Bindung an Importin α 1, α 3, α 5 und α 7, während nur eine sehr schwache Interaktion mit Importin α 4 zu beobachten war

(s. Abb. 12A). Dieses Bindungsmuster ähnelte dem des Wildtyp-Nucleoplasmin, was darauf hindeutet, dass die Position der NLS relativ zur Core-Domäne für das Importin α -Bindungsmuster keine wesentliche Bedeutung besitzt.

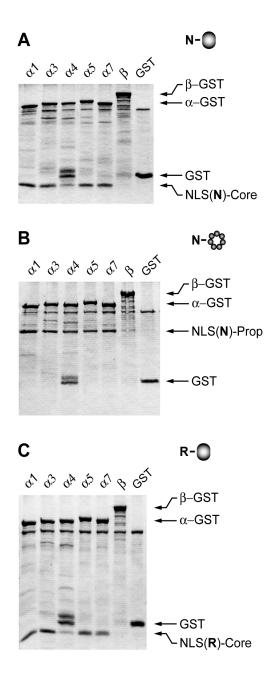


Abb. 12: Die NLS ist nicht hinreichend um Importin α-Präferenzen zu vermitteln. Äquimolare Mengen der angegebenen C-terminal GST-getaggten Importine wurden in Bindungsexperimenten mit einzelnen Substraten eingesetzt. Die Importine wurden an GSH-Sepharose gebunden und mit den rekombinanten, His-getaggten Substraten inkubiert. Sepharose-assoziierte Proteine wurden durch SDS-PAGE separiert und mittels Coomassie-Färbung visualisiert. Folgende Substrate wurden verwendet: (A) NLS(N)-Core, (B) NLS(N)-Prop, (C) NLS(R)-Core. α , Importin α ; β , Importin β.

Zum Austausch der NLS-Sequenzen wurden die folgenden beiden Konstrukte hergestellt: NLS(\mathbf{N})-Prop, ein Fusionsprotein bestehend aus der Nucleoplasmin-NLS und der Propeller-Domäne von RCC1 (s. Abb. 9A), und NLS(\mathbf{R})-Core, eine Fusion zwischen dem RCC1 N-Terminus und der Nucleoplasmin Core-Domäne (s. Abb. 9B). Im Gegensatz zu RCC1 wurde NLS(\mathbf{N})-Prop von allen α -Importinen gebunden (s. Abb. 12B). Dies demonstrierte, dass die Importin α -Bindungsspezifität von RCC1 von seiner

NLS abhängt. Überraschenderweise zeigte NLS(\mathbf{R})-Core Bindung an Importin α 1, α 3, α 5 und α 7, und nur eine sehr schwache Assoziation mit Importin α 4 (s. Abb. 12C). Dieses Bindungsmuster stimmte nicht mit dem des RCC1 überein, sondern deckte sich mit dem des NLS(\mathbf{N})-Core. Die RCC1-NLS war also nicht in der Lage, die Importin α -Spezifität von RCC1 auf die Nucleoplasmin Core-Domäne zu übertragen.

Die beiden Core-Konstrukte NLS(**N**)-Core und NLS(**R**)-Core lagen wie das Nucleoplasmin und die Core-Domäne in Lösung als Oligomere vor (s. Abb. 11C bzw. nicht gezeigte Daten) und verhielten sich wie das Nucleoplasmin in Bindungsexperimenten wie Monomere (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse der Experimente belegen, dass die NLS zwar erforderlich ist, aber nicht ausreicht, um eine ausgeprägte Importin α -Bindungsspezifität zu vermitteln.

2.2.3 Importin α -Bindungsspezifität in Gegenwart von Importin β

In lebenden Zellen werden heterotrimere Importkomplexe aus Importin α , Importin β und Substrat gebildet, wobei die Reihenfolge der Bindung von Substrat und Importin β an Importin α noch nicht bekannt ist bzw. auch für jeden Komplex unterschiedlich sein könnte, abhängig vom Substrat oder den Konzentrationen der Bindungspartner (als weiterführende Information s. Review Goldfarb *et al.*, 2004).

Wurde Importin β in äquimolarem Verhältnis zu Importin α als eine zusätzliche Komponente in dem oben beschriebenen Bindungsassay eingesetzt (bei sonst ungeänderten experimentellen Bedingungen), so war eine differierende Substratbindung an die einzelnen α -Importine kaum noch erkennbar. Alle bisher verwendeten Substrate wurden von allen α -Importinen mit kaum unterschiedlichen Effizienzen gebunden (s. Abb. 13A bzw. nicht gezeigte Daten). Dieses Resultat kann zwei Ursachen haben:

1. Die autoinhibitorische IBB-Domäne des Importin α konkurriert mit dem Substrat um die gleiche Bindungsstelle (Kobe, 1999). Die in Abwesenheit von Importin \(\beta \) beobachteten Bindungsunterschiede von Substraten an die einzelnen α -Importine könnten daher überwiegend auf Unterschieden in den Affinitäten der einzelnen autoinhibitorischen Domänen der α -Importine zu den ieweiligen Substratbindungsstellen beruhen und nicht auf unterschiedlichen Affinitäten der Substrate zu den Bindungsstellen. Da Importin β an die IBB-Domäne und die darin enthaltene autoinhibitorische Domäne von Importin α bindet, würde eine durch die autoinhibitorischen Domänen verursachte Spezifität in Gegenwart von Importin β nicht mehr beobachtet werden. Dieses Modell ist jedoch wenig wahrscheinlich, da in einem solchen Fall alle Substrate ein ähnliches Importin α -Bindungsmuster zeigen sollten.

2. Durch das Ausbleiben der Kompetition mit der autoinhibitorischen Domäne von Importin α in Gegenwart von Importin β sind die Affinitäten der Substrate für die α -Importine deutlich erhöht (Catimel *et al.*, 2001; Fanara *et al.*, 2000; Rexach und Blobel, 1995). Bisher veröffentlichte Dissoziationskonstanten für Importin α und Substrat/NLS in Gegenwart von Importin β liegen zwischen 5 nM und 70 nM (Efthymiadis *et al.*, 1997; Hu und Jans, 1999). Da bei den bisher vorgestellten Bindungsreaktionen deutlich höhere Konzentrationen der Bindungspartner verwendet wurden (ca. jeweils 125 nM für Importin α und Importin β , und die dreifache Menge, ca. 375 nM, für das Substrat), besteht die Möglichkeit, dass Importin α -Spezifität in Gegenwart von Importin β zwar noch vorhanden war, aber unter den gegebenen Konzentrationsverhältnissen nicht beobachtet werden konnte. In diesem Fall sollte die Spezifität bei verringerten Konzentrationen der Bindungspartner wieder sichtbar werden.

Um die zweite Möglichkeit zu testen, wurde ein Bindungsassay mit RCC1 in Gegenwart von Importin β durchgeführt, bei dem die Konzentrationen aller Bindungspartner (RCC1, Importin α und Importin β) schrittweise verringert wurden. Für diesen Titrationsversuch wurde ein Vertreter aus jeder Importin α -Subfamilie ausgewählt (Importin α 1, α 3 und α 5), ein Ansatz mit Importin α 1 ohne Importin β diente als Negativkontrolle. Bei einer 1/10-Verdünnung der Reaktionspartner war eine bevorzugte Bindung von RCC1 an Importin $\alpha 3$ schon wieder deutlich sichtbar, während bei einer 1/30-Verdünnung eine Bindung von RCC1 an Importin α 1 und α 5 gar nicht mehr zu detektieren war. Importin β offenbarte jedoch ebenfalls Spezifität und zeigte wie RCC1 bei zunehmender Verdünnung der Bindungspartner eine bevorzugte Bindung an Importin $\alpha 3$ (s. Abb. 13B). Bei einem Titrationsversuch mit Nucleoplasmin und ausgewählten α -Importinen ergab sich ein analoges Ergebnis: Bei einer schrittweisen Verdünnung der Reaktionspartner wurde Importin α -Spezifität von Nucleoplasmin wieder sichtbar, wobei auch Importin β bevorzugt mit den α -Importinen assoziierte, an die Nucleoplasmin am effektivsten gebunden war (nicht gezeigte Daten). Die Affinität von Importin β für Importin α ist also erhöht, wenn Importin α an ein Substrat binden kann und Importin β nicht mehr mit der Substratbindungsstelle von Importin α um die Bindung der IBB-Domäne konkurrieren muss.

Da immer noch nicht geklärt werden konnte, ob Substrate Importin α -Spezifität zeigen, selbst wenn die α -Importine in einem Komplex mit Importin β vorliegen, wurden weitere Bindungsversuche mit RCC1 und Nucleoplasmin durchgeführt, bei denen Substrate und α -Importine in einer 1/30-Verdünnung eingesetzt wurden, während Importin β mit der ursprünglichen Konzentration verwendet wurde. Das Experiment ergab eine Bindung von RCC1 an Importin α 3 und α 4 und eine Bindung von Nucleoplasmin an sämtliche α -Importine, bevorzugt aber an Importin α 1 und α 5. Importin β assoziierte unter den

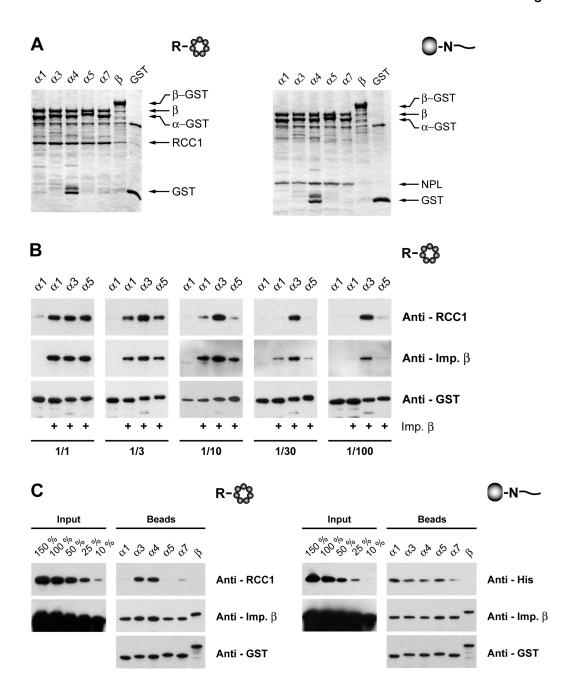


Abb. 13: Visualisierung von Importin α-Bindungsspezifitäten in Gegenwart von Importin β. Gleiche Mengen der angegebenen C-terminal GST-getaggten Importine wurden an GSH-Sepharose gebunden und mit einzelnen Substraten in Gegenwart von Importin β inkubiert. Sepharoseassoziierte Proteine wurden durch SDS-PAGE separiert und mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht (A), oder die Importkomplex-Komponenten Importin α , Importin β und Substrat wurden einzeln in einer Westernblot-Analyse mit spezifischen Primärantikörpern gegen die Proteine selbst (RCC1, Importin β) oder gegen ihre Tags (Nucleoplasmin, Importin α) nachgewiesen (B, C). (A) Die Bindungspartner wurden in den üblichen Konzentrationen in die Bindungsansätze gegeben: ~ 125 nM Importin α und Importin β , ~ 375 nM Substrat (RCC1 bzw. Nucleoplasmin). **(B)** Die Konzentrationen aller Bindungspartner wurden schrittweise 1/3, 1/10, 1/30 und 1/100 verdünnt. RCC1 fungierte als Substrat. Ein Ansatz mit Importin α 1-GST ohne Importin β diente als Negativkontrolle. (C) Bindungsexperimente mit RCC1 bzw. Nucleoplasmin als Substrat. Importin β wurde in seiner ursprünglichen Konzentration verwendet (~ 125 nM), während Substrat und α -Importine in einer 1/30-Verdünnung eingesetzt wurden. In der SDS-PAGE wurden verschiedene Mengen der Importin α -Bindungspartner (Substrat und Importin β) als Vergleich mitgeführt (Input-Proben). α , Importin α ; β , Importin β ; Imp., Importin; NPL, Nucleoplasmin.

gewählten Konzentrationen mit allen α -Importinen (s. Abb. 13C). Importin α -Spezifität zwischen den einzelnen Importin α -Subfamilien war also wieder sichtbar, ebenso wie der auch im Nucleoplasmin-Bindungsassay ohne Importin β beobachtete Unterschied in der Bindungsstärke von Nucleoplasmin an Importin α 5 und α 7, welche derselben Subfamilie angehören (s. im Vergleich Abb. 11A). Ein Unterschied in der Substrat-Bindungsintensität an Importin α 3 und α 4 konnte hingegen unter den gegebenen Konzentrationsverhältnissen nicht beobachtet werden, weder für RCC1 noch für Nucleoplasmin.

Insgesamt zeigen diese Versuche, dass Präferenzen von Importsubstraten für bestimmte α -Importine auch in Gegenwart von Importin β detektiert werden können und dass Importin β eine erhöhte Affinität für Substrat-gebundene α -Importine besitzt.

2.2.4 NLS und Gesamtproteinkontext eines Kernimportsubstrates tragen gemeinsam zur Importin α -Bindungsspezifität bei

In lebenden Zellen befinden sich unzählige Substrate im Zytoplasma und konkurrieren um den Transport in den Nukleus mit einem bestimmten α -Importin. Experimente, die solch eine Kompetitionssituation einschließen, haben sich im Hinblick auf den Nachweis der Importin α -Spezifität als empfindlicher erwiesen (Köhler et~al., 1999). Aus diesem Grund sollten als Ergänzung zu den oben angeführten Einzelsubstrat-Bindungsassays ebenfalls Kompetitionsstudien durchgeführt werden, in denen zwei Substrate gleichzeitig in äquimolarem Verhältnis in der Bindungsreaktion eingesetzt werden. In Analogie zu der Situation in lebenden Zellen und um eine zusätzliche Kompetition mit der autoinhibitorischen Domäne von Importin α zu vermeiden, wurden die Kompetitionsexperimente in Gegenwart von Importin β durchgeführt. Da in den Einzelsubstratassays ohne Importin β ebenfalls eine Konkurrenzsituation bestanden hatte, und zwar zwischen dem Substrat und der autoinhibitorischen Domäne von Importin α , wurden die Konzentrationsverhältnisse aus diesen Assays für die folgenden Kompetitionsexperimente übernommen.

In einem ersten Kompetitionsversuch wurden die beiden Wildtyp-Proteine RCC1 und Nucleoplasmin zusammen eingesetzt. Das Experiment ergab, dass RCC1 als alleiniges Substrat an Importin $\alpha 3$ und $\alpha 4$ gebunden wurde, während an den anderen α -Importinen hauptsächlich eine Assoziation mit Nucleoplasmin zu verzeichnen war (s. Abb. 14A). In einem ergänzenden Experiment wurde überprüft, ob RCC1 nicht nur in einer direkten Kompetition mit Nucleoplasmin die alleinige Bindung an Importin $\alpha 3$ und $\alpha 4$ erreichen konnte, sondern ob es auch in der Lage war, Nucleoplasmin aus einem bestehenden Importkomplex mit Importin $\alpha 3$ und $\alpha 4$ zu verdrängen. Unter den gegebenen Konzentrationsverhältnissen und in Gegenwart von Importin β war

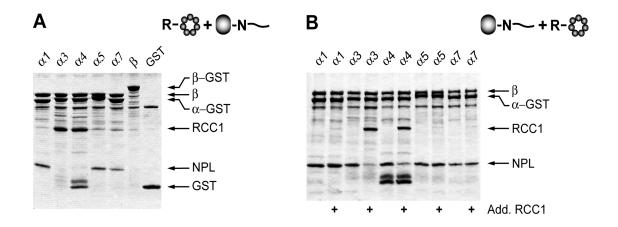
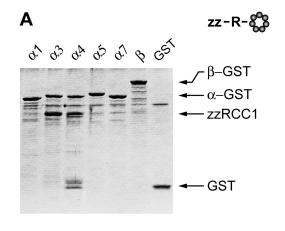
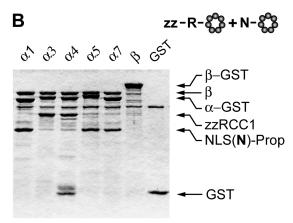


Abb. 14: Kompetitions- und Substratverdrängungs-Experimente verdeutlichen Importin α -Spezifität. Äquimolare Mengen der angegebenen C-terminal GST-getaggten Importine wurden an GSH-Sepharose gebunden und mit Substraten inkubiert. Sepharose-assoziierte Proteine wurden durch SDS-PAGE separiert und mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. (A) RCC1 und Nucleoplasmin wurden gleichzeitig in äquimolaren Mengen in Gegenwart von Importin β in der Bindungsreaktion eingesetzt. (B) In einer ersten Bindungsreaktion wurden Nucleoplasmin und Importin β zu den immobilisierten α -Importinen gegeben, in einem zweiten Schritt wurde RCC1 in nur leichtem molarem Überschuss zu den Importkomplexen zugesetzt (+). α , Importin α ; β , Importin β ; NPL, Nucleoplasmin; Add., Addition.

Nucleoplasmin in der Lage, mit allen α -Importinen einen Importkomplex zu bilden (s. Abb. 13A). In dem Versuch wurden zuerst Komplexe aus Nucleoplasmin, Importin β und den einzelnen α -Importinen gebildet, worauf in einem zweiten Schritt RCC1 in nur leichtem molarem Überschuß zu den Importkomplexen gegeben wurde. Im Falle der Importin α 3- und α 4-Komplexe konnte eine effektive Verdrängung von Nucleoplasmin durch RCC1 erreicht werden, wobei Nucleoplasmin aus dem Importin α 3-Komplex sogar fast vollständig verdrängt wurde. Keine Verdrängung von Nucleoplasmin durch RCC1 konnte hingegen bei den Importin α 1-, α 5- und α 7-Komplexen beobachtet werden (s. Abb. 14B). RCC1 hat also eine sehr viel höhere Affinität für Importin α 3 und α 4 als Nucleoplasmin.

Um die Bedeutung der NLS für die Importin α -Spezifität genauer zu analysieren, wurden direkte Kompetitionen von Substraten durchgeführt, die sich nur in ihrer NLS unterscheiden. Beide Propeller-Proteine RCC1 und NLS(N)-Prop konnten in Einzelsubstratassays ohne Importin β an Importin α 3 und α 4 binden (s. Abb. 10B und Abb. 12B). Da die beiden Proteine die gleiche Größe haben, konnten sie nach einem Kompetitionsexperiment in der anschließenden SDS-PAGE nicht voneinander separiert werden und erschienen auf dem Coomassie-gefärbten Gel als eine Bande, die gleichmäßig in allen Importin α -Ansätzen zu sehen war (Daten nicht gezeigt). In einer Westernblot-Analyse konnte jedoch mit einem gegen den nur bei RCC1 vorhandenen RCC1 N-Terminus gerichteten Antikörper gezeigt werden, dass RCC1 nur mit





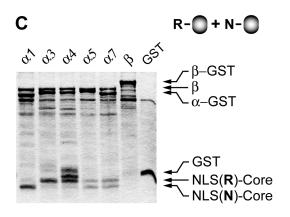


Abb. 15: Die NLS trägt zur Ausprägung von Importin α-Bindungspräferenzen bei. Es wurden Kompetitions-Bindungsassays mit Substraten durchgeführt, die sich nur in ihrer NLS unterscheiden. Gleiche Mengen der angegebenen C-terminal GST-getaggten Importine wurden an GSH-Sepharose gebunden und mit einem einzelnen Substrat (A) oder mit zwei Substraten in äquimolaren Mengen in Gegenwart von Importin β (B, C) inkubiert. Sepharose-gebundene Proteine wurden einer SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung unterzogen. Folgende Substrate wurden verwendet: (A) zzRCC1, (B) zzRCC1 und NLS(N)-Prop, (C) NLS(R)-Core und NLS(N)-Core. α , Importin α ; β , Importin β.

Importin $\alpha 3$ und $\alpha 4$ assoziiert vorlag (Daten nicht gezeigt). Um jedoch eine Aussage über beide Propeller-Proteine treffen zu können, wurde der Kompetitionsversuch mit einer N-terminal zz-getaggten, d.h. mit zwei Immunglobulin G-Bindedomänen von Protein A versehenen Variante von RCC1 (s. Abb. 9A) wiederholt. zzRCC1 ist größer (~ 60 kDa) als RCC1 (~ 45 kDa) und zeigte im Einzelsubstratassay ohne Importin β die gleiche Importin α -Spezifität wie RCC1 (s. Abb. 15A). In einer Kompetition mit NLS(N)-Prop wurde nur zzRCC1 von Importin $\alpha 3$ und $\alpha 4$ gebunden, während nur NLS(N)-Prop mit Importin $\alpha 1$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$ assoziierte (s. Abb. 15B). Die RCC1-NLS besitzt also eine

höhere Affinität für Importin $\alpha 3$ und $\alpha 4$ als die Nucleoplasmin-NLS. Des Weiteren wurden die beiden NLS im Kontext der Nucleoplasmin Core-Domäne einer Konkurrenzsituation ausgesetzt. Beide Core-Konstrukte NLS(**N**)-Core und NLS(**R**)-core hatten im Einzelsubstratassay das gleiche Bindungsmuster an die α -Importine gezeigt (s. Abb. 12A und C). In der Kompetition jedoch wurde hauptsächlich NLS(**R**)-core von Importin $\alpha 3$ und $\alpha 4$ gebunden, während nur NLS(**N**)-Core einen Komplex mit Importin $\alpha 1$ bildete. Beide Substrate assoziierten gleichermaßen mit Importin $\alpha 5$ und $\alpha 7$ (s. Abb. 15C). Die RCC1-NLS besitzt also generell eine höhere Affinität für Importin $\alpha 3$ und $\alpha 4$ als die Nucleoplasmin-NLS, selbst wenn sie sich nicht in ihrem Wildtyp-Proteinkontext befindet.

Um die Bedeutung des Haupt-Proteinteils für die Importin α-Spezifität zu untersuchen, wurden Kompetitionsversuche mit den Substraten durchgeführt, die die gleiche NLS besitzen und sich nur in ihrem Hauptteil unterscheiden. Beide Substrate, die die RCC1-NLS besitzen, RCC1 und NLS(R)-core, konnten in einem Einzelsubstrat-Bindungsversuch an Importin α 3 binden (s. Abb. 10B und Abb. 12C). In einer Kompetition jedoch wurde nur RCC1 von Importin α 3 und α 4 gebunden. NLS(**R**)-core dagegen zeigte effiziente Bindung an Importin α 1 und α 5, eine schwächere Bindung an Importin α 7, jedoch keine Bindung an Importin α 3 und α 4 (s. Abb. 16A). Die Affinität der RCC1-NLS für Importin α 3 und α 4 ist somit im Kontext des RCC1-Propellers erhöht. Desgleichen konnten beide Konstrukte, die die Nucleoplasmin-NLS beinhalten, NLS(N)-Prop und NLS(N)-Core, an Importin α 3 binden, wenn sie in einem Einzelsubstratassay eingesetzt wurden (s. Abb. 12A und B). In einem Kompetitionsexperiment dagegen konnte NLS(**N**)-Prop eine starke Assoziation mit allen α -Importinen behaupten, während eine eindeutige Bindung von NLS(**N**)-Core nur an Importin α 1 und α 5 bzw. eine äußerst schwache Bindung an Importin α 7 zu erkennen war (s. Abb. 16B). Um auszuschließen, dass dieses Ergebnis aus einer schlechten Erreichbarkeit der Nucleoplasmin-NLS in dem NLS(N)-Core-Konstrukt resultierte, wurde der letztgenannte Kompetitionsversuch mit Wildtyp-Nucleoplasmin anstelle des Core-Konstruktes wiederholt. Bei der Kompetition mit NLS(N)-Prop band Nucleoplasmin mit ähnlicher Effektivität an Importin α 1 und α 5 wie zuvor NLS(**N**)-Core bei der Kompetition mit NLS(**N**)-Prop. Eine schwache Bindung von Nucleoplasmin war auch an Importin α 4 und α 7 zu erkennen, keine Assoziation wurde hingegen mit Importin α 3 detektiert (s. Abb. 16C). Dies bedeutet, dass auch die Affinität der Nucleoplasmin-NLS für die α -Importine durch die Gegenwart des RCC1-Propellers oder der Nucleoplasmin Core-Domäne beeinflusst wird.

Diese Experimente belegen somit, dass sowohl die NLS als auch der Proteinkontext eines Kernimportsubstrates für die Ausprägung der Importin α -Bindungsspezifität eine Rolle spielen.

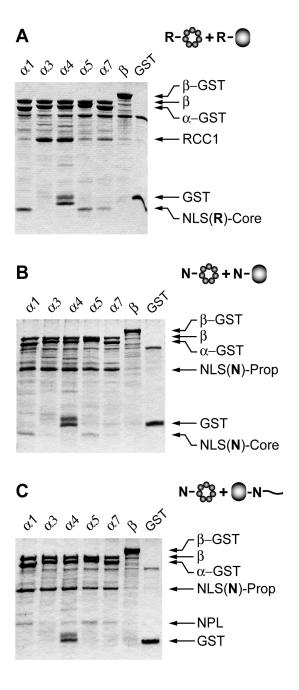


Abb. 16: Der RCC1 Propeller erhöht die Substrat-Affinität für Importin $\alpha 3$ und $\alpha 4$. Es wurden Kompetitions-Bindungsassays durchgeführt mit Substraten, die die gleiche NLS besitzen und sich nur in ihrem Proteinhauptteil unterscheiden. Gleiche Mengen der angegebenen C-terminal GST-getaggten Importine wurden an GSH-Sepharose gebunden und mit zwei Substraten in äquimolaren Mengen in Gegenwart von Importin β inkubiert. Sepharoseassoziierte Proteine wurden in SDS-PAGE aufgetrennt einer und mittels Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Folgende wurden verwendet: Substrate und NLS(R)-Core, (A) RCC1 (B) NLS(N)-Prop und NLS(N)-(C) NLS(N)-Prop Nucleoplasmin. α , Importin α ; β , Importin β; NPL, Nucleoplasmin.

2.2.5 Die Bedeutung des Proteinkontextes für die Importin α -Spezifität wird auch im *in vitro* Kernimport deutlich

Da die Möglichkeit besteht, dass in den Bindungsassays artifizielle Interaktionen sichtbar gemacht wurden, die keine relevante Bedeutung für den Kernimport besitzen,

wurden die in den Bindungsstudien eingesetzten Substrate zusätzlich in in vitro Importassays mit semi-permeabilisierten HeLa-Zellen analysiert. Hierfür wurde ein Importin α aus jeder Subfamilie ausgewählt (Importin α 1, α 3 und α 5), da die Mitglieder derselben Subfamilie (Importin α 3 und α 4 bzw. Importin α 5 und α 7) jeweils ein sehr ähnliches Verhalten in den vorangegangenen Kompetitions-Bindungsassays gezeigt hatten. Die Importsubstrate wurden mit einer Fluoreszenzmarkierung versehen, entweder mit Fluorescein (Markierung von RCC1, Nucleoplasmin und NLS(N)-Core) oder mit Texas Red (Markierung von NLS(N)-Prop und NLS(R)-Core). Die markierten Substrate wurden zuerst einzeln in Importassays eingesetzt. Die Importversuche zeigten, dass RCC1-FI nur von Importin α3 in die HeLa-Zellkerne importiert wurde (s. Abb. 17A). Nucleoplasmin-FI wurde dagegen von allen drei verwendeten α -Importinen transportiert, obwohl sich der Import mit Importin $\alpha 3$ als weniger effektiv erwies als der Import mit Importin α 1 und α 5 (s. Abb. 17B). Dieselben Transporteffizienten mit den drei α -Importinen wurden bei NLS(**N**)-Core-FI beobachtet (s. Abb. 17C). Das letztgenannte Ergebnis stellt einen gewissen Widerspruch dar zu den Einzelsubstrat-Bindungsassays, in denen NLS(N)-Core gleichermaßen von Importin $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$ gebunden wurde (s. Abb. 12A). NLS(**N**)-Prop-TR und NLS(**R**)-Core-TR wurden von allen drei verwendeten α -Importinen effizient in die HeLa-Zellkerne importiert (s. Abb. 17D und E). Damit haben die Einzelsubstrat-Importassays die Ergebnisse der Einzelsubstrat-Bindungsassays bestätigt. Die markante Importin α-Spezifität von RCC1 ging durch Ersetzen der RCC1-NLS durch die Nucleoplasmin-NLS verloren, war aber auch nicht durch Fusion der RCC1-NLS an die Nucleoplasmin Core-Domäne übertragbar.

Für weitere Analysen wurden analog zu den Bindungsstudien Kompetitions-Importassays durchgeführt. Hierfür wurden zwei Substrate gleichzeitig in äguimolaren Mengen in den Importexperimenten eingesetzt. Wieder sollten zuerst die Substrate miteinander konkurrieren, die sich nur in ihrer NLS unterscheiden. Beide Propeller-Proteine, RCC1-FI und NLS(N)-Prop-TR, wurden in Einzelsubstrat-Importassays von Importin $\alpha 3$ in die HeLa-Zellkerne importiert (s. Abb. 17A und D). Das Kompetitionsexperiment hingegen ergab, dass fast ausschließlich RCC1-Fl von Importin $\alpha 3$ transportiert wurde, während NLS(N)-Prop-TR von Importin $\alpha 1$ und $\alpha 5$ in die Zellkerne importiert wurde (s. Abb. 18A). Die RCC1-NLS führt also im Vergleich zur Nucleoplasmin-NLS zu einer höheren Import-Effizienz mit Importin α 3. Kompetitionsversuch mit den Core-Konstrukten NLS(N)-Core-FI und NLS(R)-Core-TR zeigte, dass nur NLS(**N**)-Core-FI von Importin α 1 transportiert wurde, während nur NLS(\mathbf{R})-Core-TR von Importin α 3 in die Zellkerne importiert wurde (s. Abb. 18B). Beide Substrate wurden von Importin α 5 importiert, aber der Transport war nicht so effizient

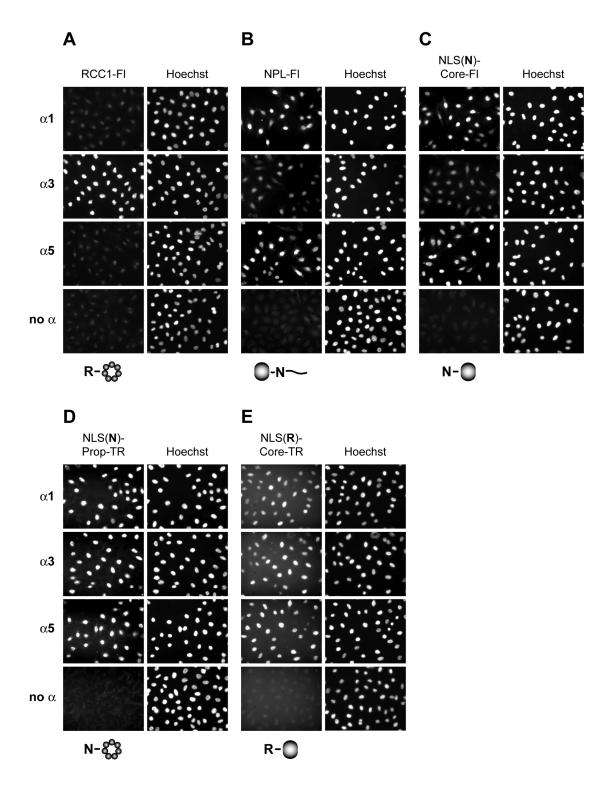


Abb. 17: Importin α -abhängiger *in vitro* Kernimport von fluoreszenzmarkierten Substraten. Fluorescein- und Texas Red-markierte Proteine wurden zusammen mit einem Energieregenerierenden System, rekombinanten Importfaktoren und dem jeweils angegebenen α -Importin zu Digitonin-permeabilisierten HeLa-Zellen gegeben. Ein Ansatz ohne Importin α diente als Negativkontrolle. Nach Fixierung der Zellen wurden Fluoreszenzsignale mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die linken Abschnitte geben den Kernimport von folgenden Substraten wieder: (A) RCC1-FI, (B) Nucleoplasmin-FI, (C) NLS(N)-Core-FI, (D) NLS(N)-Prop-TR, (E) NLS(R)-Core-TR. Die rechten Felder zeigen Fluoreszenzsignale des DNA-Farbstoffes Hoechst. α , Importin α ; NPL, Nucleoplasmin; FI, Fluorescein; TR, Texas Red.

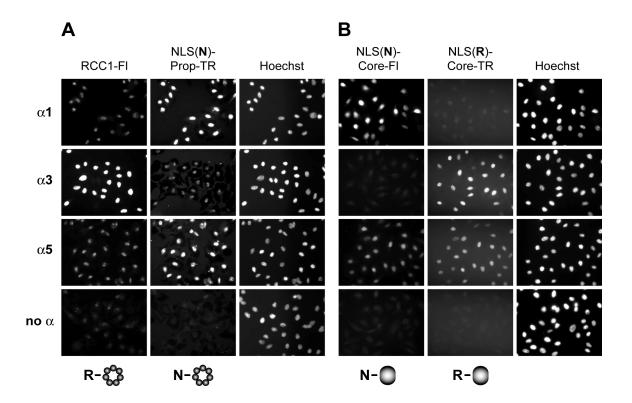
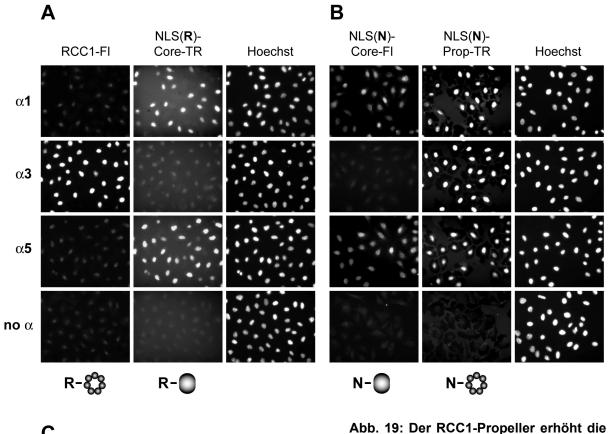
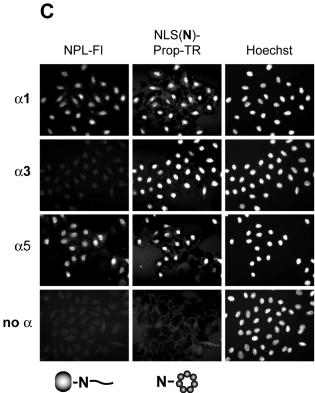


Abb. 18: Die NLS trägt zur Importin α-Transportspezifität bei. Es wurden Kompetitions-Importassays durchgeführt mit Substraten, die sich nur in ihrer NLS unterscheiden. Die angegebenen Importin α-Isoformen, rekombinante Importfaktoren, ein Energie-regenerierendes System und äquimolare Mengen der folgenden Substrate wurden mit Digitonin-permeabilisierten HeLa-Zellen inkubiert: (A) RCC1-FI und NLS(N)-Prop-TR, (B) NLS(N)-Core-FI und NLS(R)-Core-TR. Ein Ansatz ohne Importin α diente als Negativkontrolle. Der Kerntransport wurde mittels Fluoreszenz-mikroskopie ausgewertet. Die linken Säulen geben den Kernimport der Fluorescein-markierten Substrate wieder, die mittleren Felder visualisieren den Kernimport von Texas Red-markierten Proteinen. Die Zellkerne wurden durch den DNA-Farbstoff Hoechst sichtbar gemacht (rechte Abschnitte). α , Importin α ; FI, Fluorescein; TR, Texas Red.

wie im Einzelsubstrat-Importassay (s. Abb. 17C und E). Diese Ergebnisse, die die Bedeutung der NLS für Importin α -Spezifität hervorheben, bestätigen die Daten der Kompetitions-Bindungsassays.

Des Weiteren wurden Kompetitions-Importassays mit den Substraten durchgeführt, die die gleiche NLS besitzen, sich aber in ihrem Proteinhauptteil unterscheiden. Beide Substrate, die die RCC1-NLS besitzen, RCC1-FI und NLS(R)-Core-TR, wurden in Einzelsubstrat-Importassays von Importin α 3 in die HeLa-Zellkerne importiert (s. Abb. 17A und E). In einer Konkurrenzsituation jedoch wurde nur RCC1-FI von Importin $\alpha 3$ transportiert, während nur NLS(**R**)-Core-TR von Importin α 1 und α 5 importiert wurde (s. Abb. 19A). Demzufolge führt die RCC1-NLS im Kontext des RCC1-Propellers zu einer größeren Importeffizienz mit Importin α3 als im Kontext der Nucleoplasmin Core-Nucleoplasmin-NLS-Domäne. Das Kompetitions-Importexperiment mit den beinhaltenden Konstrukten, NLS(**N**)-Core-FI und NLS(N)-Prop-TR,





Transporteffizienz mit Importin α3. Es wurden Kompetitions-Importassays durchgeführt mit Substraten, die die gleiche NLS nur in besitzen und sich Proteinhauptteil unterscheiden. Die ange-Importin α -Isoformen, gebenen rekom-Importfaktoren, Energiebinante ein regenerierendes System und äquimolare Mengen der folgenden Substrate wurden mit Digitonin-permeabilisierten HeLa-Zellen inkubiert: (A) RCC1-FI und NLS(R)-Core-TR, (B) NLS(N)-Core-FI und NLS(N)-Prop-TR, (C) NPL-FI und NLS(N)-Prop-TR. Ein Ansatz ohne Importin α diente Negativkontrolle. Der Kerntransport wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Die linken Säulen geben den Kernimport der Fluorescein-markierten Substrate wieder, die mittleren Felder visualisieren den Kernimport von Texas Red-markierten Proteinen. Die Zellkerne selbst wurden durch den DNA-Farbstoff Hoechst sichtbar gemacht (rechte Abschnitte). α , Importin α ; NPL, Nucleoplasmin; FI, Fluorescein; TR, Texas Red.

ergab, dass nur NLS(**N**)-Prop-TR von Importin α 3 in die HeLa-Zellkerne transportiert wurde, während beide Substrate von Importin α 1 und α 5 importiert wurden (s. Abb. 19B). Der Transport beider Substrate durch Importin α 1 und α 5 in dem

Kompetitionsexperiment war weniger effizient als ihr jeweiliger Transport im Einzelsubstratassay (Vgl. Abb. 17C und D). Das gleiche Ergebnis wurde erzielt, wenn anstelle des NLS(\mathbf{N})-Core-FI Fluorescein-markiertes Wildtyp-Nucleoplasmin in dem Kompetitions-Importassay mit NLS(\mathbf{N})-Prop-TR eingesetzt wurde (s. Abb. 19C). Daraus wird ersichtlich, dass auch die Nucleoplasmin-NLS im Kontext des RCC1-Propellers einen effizienteren Transport mit Importin α 3 bewirkt als im Kontext der Nucleoplasmin Core-Domäne.

Die *in vitro* Kernimportassays konnten die Ergebnisse der Bindungsassays bestätigen: Sowohl die NLS eines Substrates als auch der Gesamtproteinkontext sind bedeutende Determinanten für Importin α -Spezifität.

2.2.6 Beide basischen Sequenzabschnitte des RCC1 N-Terminus tragen zur Importin α -Bindung bei

Die Kompetitionsexperimente ergaben, dass die NLS des RCC1 zur Importin α -Spezifität beiträgt. Bisher war jedoch noch nicht einmal der genaue Importin α-Bindungsmodus der RCC1-NLS – ob *monopartite* oder *bipartite* – bekannt. Wird die Sequenz des RCC1 N-Terminus (s. Abb. 9A) mit der Nucleoplasmin-NLS (s. Abb. 9B) verglichen, so liegt die Vermutung nahe, dass es sich auch bei der RCC1-NLS um eine bipartite NLS handelt. Der RCC1 N-Terminus besitzt zwei basische Cluster, welche durch acht nicht basische Reste voneinander getrennt sind. Um den Beitrag der beiden basischen Sequenzabschnitte an der Importin α -Bindung zu untersuchen, wurden RCC1-Mutanten hergestellt, in denen die einzelnen Cluster entweder mutiert oder deletiert sind (s. Abb. 9A). Die Bindung dieser Mutanten an die einzelnen α -Importine wurde sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Importin β untersucht. Die beiden Mutanten RCC1mt1 (K4A, R5A) und RCC1mt2 (K8A, R9A), in denen jeweils eine der beiden KR-Dubletten des ersten (N-terminalen) basischen Clusters des RCC1 N-Terminus durch zwei Alanine substituiert ist (s. Abb. 9A), zeigten Bindungsspezifität für Importin α 3 und α 4 sowohl in Abwesenheit als auch in Anwesenheit von Importin β (s. Abb. 20A bzw. nicht gezeigte Daten). Dies ist ein Gegensatz zum Bindungsverhalten des Wildtyp-RCC1, das in Gegenwart von Importin β an alle α -Importine gleichermaßen gebunden hatte (s. Abb. 13A). Wurde der komplette N-terminale basische Sequenzabschnitt des RCC1 N-Terminus durch Deletion der ersten 13 Aminosäuren entfernt (RCC1\(Delta\)13 [s. Abb. 9A]), so wurde damit der Effekt einer einzelnen KR-Mutation verstärkt: RCC1Δ13 wurde in Gegenwart von Importin β ausschließlich von Importin $\alpha 3$ und $\alpha 4$ gebunden (s. Abb. 20B, rechte Hälfte), wobei die Bindung schwächer war als die des Wildtyp-RCC1 und die der Mutanten RCC1mt1 und RCC1mt2. In Abwesenheit von Importin β war die Bindung an Importin α 4 fast verloren,

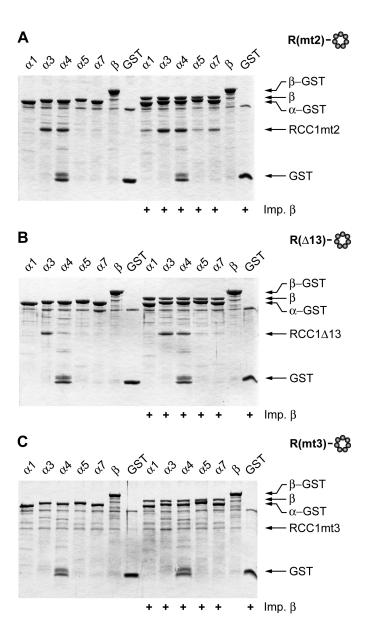


Abb. 20: **Beide** basischen Cluster des RCC1 N-Terminus tragen zur Importin α-Bindung bei. Gleiche Mengen der angegebenen C-terminal GST-getaggten Importine wurden in Bindungsexperimenten mit einzelnen Substraten eingesetzt. Die Importine wurden an GSH-Sepharose gebunden und mit dem Substrat sowohl in Gegenwart (+) als auch in Abwesenheit von Importin β inkubiert. Sepharose-assoziierte Proteine wurden durch SDS-PAGE separiert und mittels Coomassievisualisiert. Färbung Folgende Substrate wurden verwendet: (K8A, (A) RCC1mt2 R9A), **(B)** RCC1∆13, (C) RCC1mt3 (K21A, K22A). α , Importin α ; β , Importin β; Imp., Importin.

so dass eine signifikante Interaktion nur noch zwischen RCC1 Δ 13 und Importin α 3 zu sehen war (s. Abb. 20B, linke Hälfte). Wurde das zweite (C-terminale) basische Cluster des RCC1 N-Terminus durch Substitution der Lysine 21 und 22 mit Alaninen mutiert (RCC1mt3 [s. Abb. 9A]), so konnte keine signifikante Bindung mehr zu irgendeinem α -Importin beobachtet werden, weder in Abwesenheit noch in Gegenwart von Importin β (s. Abb. 20C). Das C-terminale basische Cluster des RCC1 N-Terminus ist also kritisch für die Importin α -Bindung, während das N-terminale basische Cluster die Affinität für die α -Importine verstärkt.

Um die Bedeutung der beiden basischen Sequenzabschnitte auch in einem anderen Proteinkontext zu untersuchen, wurden zum einen die ersten 15 Aminosäuren des RCC1 N-Terminus, in denen das erste basische Cluster enthalten ist, N-terminal an die Nucleoplasmin Core-Domäne fusioniert ($NLS(\mathbf{R}\Delta 16-35)$ -Core [s. Abb. 9B]). Zum

anderen wurde ein Konstrukt hergestellt, das die Aminosäuren 13-35 des RCC1 N-Terminus und das darin liegende zweite basische Cluster N-terminal zur Nucleoplasmin Core-Domäne enthält (NLS($\mathbf{R}\Delta12$)-Core [s. Abb. 9B]). Wie erwartet zeigte das Konstrukt NLS($\mathbf{R}\Delta16$ -35)-Core, dem das zweite basische Cluster fehlt, keine signifikante Bindung an die α -Importine, weder in Abwesenheit noch in Gegenwart von Importin β . Eine äußerst schwache Interaktion mit den α -Importinen konnte in Gegenwart von Importin β detektiert werden, wenn das Substrat in hohem molarem Überschuß (20-fach) gegenüber den α -Importinen eingesetzt wurde (s. Abb. 21A).

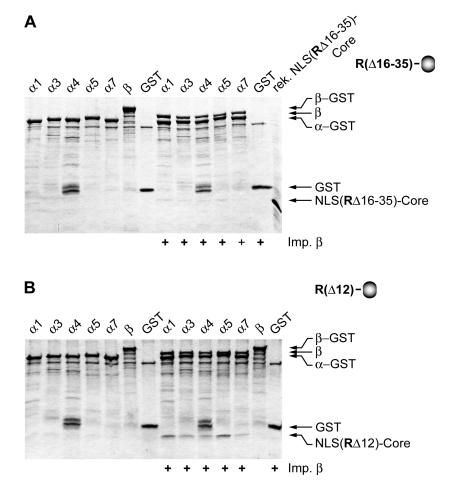


Abb. 21: Die Importin α -Bindungspräferenzen des zweiten basischen Clusters des RCC1 N-Terminus werden durch den Proteinkontext bestimmt. Äquimolare Mengen der genannten C-terminal GST-getaggten Importine wurden an GSH-Sepharose gebunden und mit einem einzelnen Substrat sowohl in Gegenwart (+) als auch in Abwesenheit von Importin β inkubiert. Sepharosegebundene Proteine wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Folgende Substrate wurden verwendet: (A) NLS(R Δ 16-35)-Core, wobei dieses Substrat in einem 20-fachen molaren Überschuß gegenüber den α -Importinen eingesetzt wurde. Bei der SDS-PAGE wurde rekombinantes NLS(R Δ 16-35)-Core als Größenvergleich mitgeführt. (B) NLS(R Δ 12)-Core. α , Importin α ; β , Importin β ; Imp., Importin; rek., rekombinant.

Bindungsexperimente mit dem Fusionsprotein NLS($\mathbf{R}\Delta12$)-Core, in welchem das zweite basische Cluster enthalten ist, ergaben, dass die Assoziation von NLS($\mathbf{R}\Delta12$)-Core mit den α -Importinen wesentlich schwächer war als die des den gesamten RCC1 N-Terminus umfassenden NLS(\mathbf{R})-Core, da die Interaktion von NLS($\mathbf{R}\Delta12$)-Core mit den α -Importinen nur in Gegenwart von Importin β visualisiert werden konnte (Vgl. Abb. 21B und Abb. 12C). Überraschenderweise wurde die stärkste Bindung von NLS($\mathbf{R}\Delta12$)-Core an Importin $\alpha1$ und $\alpha5$ detektiert und eine schwächere Bindung an Importin $\alpha3$, $\alpha4$ und $\alpha7$ (s. Abb. 21B, rechte Hälfte). Dieses Bindungsmuster entspricht dem des Wildtyp-Nucleoplasmin in Gegenwart von Importin β (als Nucleoplasmin und die α -Importine verdünnt eingesetzt wurden, [s. Abb. 13C]). Durch die Bindungsexperimente mit den Konstrukten NLS($\mathbf{R}\Delta12$)-Core und RCC1 $\Delta13$ wird somit erneut deutlich, dass der Proteinkontext eines Substrates eine entscheidende Bedeutung für dessen Importin α -spezifische Bindung besitzt. Darüber hinaus zeigen die Versuche mit diesen beiden Fusionsproteinen, dass das in diesen Konstrukten abwesende erste basische Cluster des RCC1 N-Terminus für die Bindung an keines der α -Importine essentiell ist.

Der RCC1 N-Terminus enthält folglich eine *bipartite* NLS, deren C-terminales basisches Cluster für die Bindung an alle α -Importine essentiell ist, während das N-terminale basische Cluster eine deutliche Erhöhung der Affinität für die α -Importine bewirkt, aber nicht essentiell ist und auch keine signifikante Änderung der Spezifität für bestimmte α -Importine verursacht.

2.2.7 Der relative Beitrag des Proteinkontextes eines Importsubstrates an der Importin α -Bindungsspezifität überwiegt gegenüber dem relativen Beitrag der NLS

In oben angeführten Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl die NLS eines Substrates als auch der Proteinkontext die Importin α -Bindungsspezifität bestimmen. Aus dieser Erkenntnis resultiert die Frage, ob diese beiden Determinanten in unterschiedlichem Ausmaß zur Ausprägung von Importin α -Bindungspräferenzen führen. Einen ersten Hinweis zur Beantwortung dieser Frage ergaben die vorangegangenen Bindungsversuche mit den Konstrukten RCC1 Δ 13 und NLS($R\Delta$ 12)-Core: In beiden Fusionsproteinen ist der zweite Teil des RCC1 N-Terminus, der das Cterminale basische Cluster enthält, vorhanden. Im Kontext des RCC1-Propellers bewirkte das zweite basische Cluster eine ausschließliche Bindung an Importin α 3 und α 4 (s. Abb. 20B). Im Kontext der Nucleoplasmin Core-Domäne dagegen wurde das Bindungsmuster des Wildtyp-Nucleoplasmin sichtbar, in dem die Assoziation mit diesen Importinen deutlich schwächer war als die Interaktion mit Importin α 1 und α 5 (s. Abb.

21B). Dies deutet darauf hin, dass der relative Beitrag des Proteinkontextes zur Ausprägung von Importin α-Bindungsspezifität größer ist als der relative Beitrag der NLS. Ein weiteres Experiment zur Beantwortung dieser Frage wurde durch ein Kompetitions-Bindungsexperiment mit den Konstrukten NLS(R)-Core und NLS(N)-Prop durchgeführt, wodurch die RCC1-NLS und der RCC1-Propeller einer Konkurrenz-Situation ausgesetzt wurden. Importin α 1, α 3, α 4 und α 7 zeigten in diesem Versuch eine ausschließliche und starke Assoziation mit dem Propeller-Konstrukt, während die Bindung an Importin $\alpha 5$ für beide Fusionsproteine detektiert wurde (s. Abb. 22). Dieses Experiment spiegelt den Einfluss des Proteinkontextes wider: Zum einen konnte die RCC1-NLS, die eine höhere Affinität für die Importine α 3 und α 4 als die Nucleoplasmin-NLS besitzt, nicht im Kontext der Nucleoplasmin Core-Domäne mit den Importinen α3 und α4 assoziieren, da sich das Propeller-Konstrukt mit der Nucleoplasmin-NLS bei der Bindung an diese Importine durchsetzte. Zum anderen konnte die RCC1-NLS im Kontext der Nucleoplasmin Core-Domäne an Importin $\alpha 5$ binden, obwohl sie in ihrem Wildtyp-Kontext in Einzelsubstrat-Bindungsexperimenten keine Assoziation Importin $\alpha 5$ gezeigt hatte und sich darüber hinaus hier in Konkurrenz mit der Nucleoplasmin-NLS befand, die in jedem getesteten Proteinkontext eine effektive Interaktion mit Importin α5 gezeigt hatte. Die Nucleoplasmin Core-Domäne erhöht also die Affinität einer NLS für Importin $\alpha 5$, während der RCC1-Propeller eine hochaffine Bindung an Importin α 3 und α 4 vermittelt. Dieser Einfluss der Proteinkern-Domänen auf die Bindungsaffinität an bestimmte α -Importine überwiegt gegenüber den Importin α -Bindungspräferenzen einer NLS.

Der relative Beitrag des Proteinkontextes zur Ausprägung von Importin α -Bindungsspezifität ist demzufolge größer als der relative Beitrag der NLS.

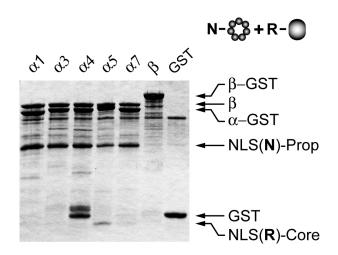


Abb. 22: Der relative Beitrag des Proteinkontextes an der Importin α-Bindungsspezifität ist größer als der relative Beitrag der NLS. Gleiche Mengen der angegebenen C-terminal GST-getaggten Importine wurden an GSH-Sepharose gebunden gleichzeitig mit äquimolaren Mengen Substrate NLS(**R**)-Core NLS(N)-Prop in Gegenwart von Importin β inkubiert. Sepharose-assoziierte Proteine wurden einer SDS-PAGE und einer anschließenden Coomassie-Färbung unterworfen. α , Importin α ; β , Importin β.

2.2.8 Importin α -Bindungspräferenzen können durch Mutationen in der Linker-Region einer *bipartite* NLS beeinflusst werden

Ungeachtet des bedeutenden Einflusses des Proteinkontextes auf die Importin α-Spezifität hatte sich in den Kompetitionsexperimenten mit den Substraten, die sich nur in ihrer NLS unterscheiden, ergeben, dass die RCC1-NLS und die Nucleoplasmin-NLS unterschiedliche Affinitäten für die einzelnen α -Importine besitzen. Ein Vergleich der RCC1-NLS mit der Nucleoplasmin-NLS zeigt, dass die größten Unterschiede in der Linker-Region zwischen den basischen Clustern zu finden sind (Vgl. Abb. 9A und B). Am augenfälligsten ist die Präsenz von zwei zusätzlichen basischen Aminosäuren in der Linker-Region der Nucleoplasmin-NLS (K161, K162), während in der Linker-Region der RCC1-NLS ein saurer Rest an der entsprechenden Stelle zu finden ist (D15). Um in einem initialen Experiment zu analysieren, ob sich Importin α -Bindungspräferenzen durch den Austausch von Aminosäuren in der Linker-Region modifizieren lassen, wurden die zwei Lysine im NLS-Linker des Wildtyp-Nucleoplasmin analog zu den entsprechenden Aminosäuren in der Linker-Region der RCC1-NLS durch ein Alanin und ein Aspartat ersetzt (K161A, K162D). Die Bindung des mutierten Nucleoplasmin (NPLmt) an die einzelnen α -Importine wurde sowohl in Anwesenheit als auch in Abwesenheit von Importin β untersucht. In Abwesenheit von Importin β zeigte sich eine effektive und in ihrer Intensität vergleichbare Bindung an die Importine $\alpha 1$, $\alpha 3$ und $\alpha 4$, während die Interaktion mit Importin $\alpha 5$ sehr schwach und eine signifikante Bindung an Importin α 7 nicht zu detektieren war. In Gegenwart von Importin β war eine Assoziation mit allen α -Importinen zu beobachten, die bei Importin α 5 und α 7 etwas schwächer war als bei den Importinen α 1, α 3 und α 4 (s. Abb. 23). Das Importin α -Bindungsmuster hatte sich durch die Substitution der beiden basischen Aminosäuren im NLS-Linker also deutlich verändert: Wildtyp-Nucleoplasmin hatte bevorzugt an Importin α 1 und α 5 gebunden, eine ebenfalls signifikante Bindung war an Importin α 3 und α 7 detektiert worden, und nur eine sehr schwache Assoziation war mit Importin α 4 zu erkennen gewesen (s. Abb. 11A). Durch die Mutation hatte sich die Affinität für Importin α 5 und α 7, welche der gleichen Importin α -Subfamilie angehören, wesentlich verringert. Des Weiteren wurde durch die Aminosäure-Substitution die relative Affinität für die Importin α -Subfamilie $\alpha 3/\alpha 4$ erhöht, da die Bindung von NPLmt an Importin $\alpha 1$, $\alpha 3$ und α 4 gleichermaßen effektiv war und sich somit die Bindungsstärken von Importin α 4 relativ zu Importin α 3 und von Importin α 3 und α 4 relativ zu Importin α 1 erhöht hatten. Die Mutation hatte die Importin α -Bindungspräferenzen von Nucleoplasmin somit denen des Wildtyp-RCC1 angenähert: Die Affinitäten für Importin α 5 und α 7 hatten sich

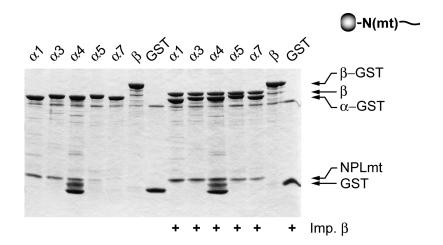


Abb. 23: Importin α -Bindungsspezifität lässt sich durch Mutation des Linkers einer bipartite NLS verändern. Äquimolare Mengen der angegebenen C-terminal GST-getaggten Importine wurden an GSH-Sepharose gekoppelt und mit NPLmt sowohl in Gegenwart (+) als auch in Abwesenheit von Importin β inkubiert. Sepharose-gebundene Proteine wurden durch SDS-PAGE separiert und mittels Coomassie-Färbung visualisiert. α , Importin α ; β , Importin β ; Imp., Importin.

verringert, während die relativen Affinitäten für Importin α 3 und α 4 erhöht worden waren.

Importin α -Bindungspräferenzen können somit durch Modulation der Aminosäure-Zusammensetzung des Linkers einer *bipatite* NLS verändert werden.

3 DISKUSSION

Die vorliegende Arbeit behandelt zwei Fragen, die sich im Zusammenhang mit der beobachteten Radiation des Importin α -Gens während der Evolution der Vertebraten stellen. Erstens, haben die sich entwickelten Isoformen spezifische Funktionen in lebenden Zellen, und zweitens, welche strukturellen Merkmale sind an der Ausbildung einer spezifischen Substratbindung an einzelne Importin α -Isoformen beteiligt?

3.1 Spezifische Funktionen der α -Importine in lebenden Zellen

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass die meisten α -Importine spezifische Funktionen in der Zelle haben.

In einer siRNA-Studie konnten die Proteinmengen der verschiedenen ubiquitär exprimierten α -Importine in HeLa-Zellen einzeln herunterreguliert werden, ohne die Proteinlevel der anderen Isoformen zu beeinflussen. Insbesondere wurde keine vermehrte Expression anderer Isoformen durch die Verminderung einzelner α -Importine beobachtet. In Abbauexperimenten zeigte sich darüber hinaus, dass die verschiedenen α -Importine unterschiedliche Halbwertszeiten in der Zelle besitzen. Im Zusammenhang mit der schon früher beobachteten, Signal-abhängigen spezifischen Änderung der relativen Expressionshöhe einzelner α -Importine in verschiedenen Zelllinien (Köhler *et al.*, 2002; Köhler *et al.*, 2001) deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass die verschiedenen Isoformen Bestandteile unterschiedlicher Signalkaskaden in der Zelle sind und somit spezifische Funktionen haben.

Die Expression aller α -Importine konnte mit Hilfe spezifischer siRNAs in ähnlichem Ausmaß herunterreguliert werden (Verminderung der Ausgangs-Proteinmenge um mindestens 80 %). Dies führte im Fall von Importin $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$ zu einer drastisch reduzierten Zellzahl am Versuchsende (meistens weniger als 30 %, verglichen mit der Zahl an Kontrollzellen). Zwei Ursachen kommen für dieses Resultat in Frage: Entweder starben die Zellen bei Unterschreitung einer bestimmten Menge des jeweiligen α -Importins ab, oder der Zellzyklus wurde bei einer zu geringen Konzentration des Importins blockiert bzw. verlangsamte sich deutlich. Es konnte kein signifikanter Zuwachs an Apoptose durch Importin $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ - oder $\alpha 7$ -siRNA-Behandlung gemessen werden. Ein vermehrtes Auftreten von nekrotischen Zellen wurde ebenfalls nicht beobachtet. Frau Dr. Quensel konnte jedoch auch keine definierte Veränderung des Zellzyklus an einem bestimmten Punkt detektieren. Es muss deshalb davon ausgegangen werden, dass die Herunterregulation von Importin $\alpha 3$, $\alpha 5$ oder $\alpha 7$

komplexe Auswirkungen auf die Zellen hatte, von denen alle Zellzyklus-Phasen mehr oder weniger stark inhibierend betroffen waren.

Die Auswirkung auf die Zellzahl durch die Verminderung bestimmter α -Importine belegt, dass zumindest diese Importin α-Isoformen spezifische Funktionen in lebenden Zellen erfüllen. Korreliert die Beobachtung, dass nicht alle Importin α -Reduktionen den gleichen Effekt hatten, mit unterschiedlichen absoluten Proteinmengen der einzelnen α-Importine in den Zellen? Die absoluten Mengen der verschiedenen Importin α-Isoformen variieren signifikant in HeLa-Zellen, wobei Importin α 1 die am meisten vorhandene Isoform ist und Importin α 4 die in geringstem Maße exprimierte Isoform (Köhler et al., 2002). Die Herunterregulation der Expression von Importin $\alpha 1$ führte also zu dem höchsten molaren Verlust der zellulären Importin α -Gesamtmenge verglichen mit der siRNA-vermittelten Proteinverminderung jeder anderen Importin α -Isoform. Wären die einzelnen Importin α -Isoformen redundant und käme es nur auf die Gesamt-Importin α -Menge in der Zelle an, hätte die Importin α 1-Mengenreduktion den stärksten zellschädigenden Effekt zeigen sollen. Dies war nicht der Fall, womit wiederum das Vorhandensein von Importin α -Spezifität betont wird. Auf der anderen Seite ist die absolute Menge des übrig gebliebenen Importin α1 nach erfolgter Herunterregulierung größer als die nach siRNA-Behandlung vorhandenen absoluten Mengen der anderen α-Importine. Es ist daher möglich, dass eine noch stärkere Importin α 1-Mengenreduktion den Effekt auf das Zellwachstum vergrößert hätte. Interessanterweise hat die effektive Herunterregulation der am geringsten vorhandenen Importin α -Isoform, Importin α 4, das Zellwachstum nicht beeinflusst. Importin α 4 wird in HeLa-Zellen also nicht oder nur in äußerst geringer Menge benötigt. Die Tatsache, dass die Verminderung der Expression der am meisten und am geringsten vorhandenen Importin α -Isoform keinen oder nur einen geringen Einfluss auf das Zellwachstum hatte, zeigt, dass die drastischen Auswirkungen durch Importin α 3-, Importin α 5- und Importin α 7-Herunterregulation nicht mit Unterschieden in den absoluten Proteinmengen der Isoformen erklärt werden können.

Die Reduktion der Expression von Importin β hatte ebenfalls einen deutlichen Effekt auf die Zellproliferation. Importin β ist ein essentieller Transportfaktor, der nicht nur für den Importin α/β -vermittelten Kernimportweg benötigt wird, sondern auch in Importin α -unabhängigem Kerntransport involviert ist (Huber *et al.*, 1998; Jakel *et al.*, 1999; Jakel und Görlich, 1998; Muhlhausser *et al.*, 2001; Truant und Cullen, 1999). Zudem ist die absolute Menge an Importin β in HeLa-Zellen deutlich geringer als die absolute Menge der gesamten Importin α -Proteinfamilie (Köhler *et al.*, 2002). Die Importin β -Herunterregulation sollte demzufolge schon bei geringerer Proteinverminderung als die individuellen Importin α -Herunterregulationen einen schädlichen Effekt auf die HeLa-

Zellen haben. Dies wurde durch das Ergebnis bestätigt, dass in den am Versuchsende noch vorhandenen Zellen die Importin β -Menge weniger deutlich reduziert war (um maximal 50 %) als die Proteinmenge an Importin α 3, α 5 oder α 7 in den entsprechend siRNA-behandelten Zellen.

Die Auswirkungen der Herunterregulierungen von Importin α 3, α 5 und α 7 haben gezeigt, dass diese Isoformen spezifische Funktionen in lebenden Zellen erfüllen. Welche nicht mehr oder nicht ausreichend transportierten Substrate jedoch in den $\alpha 3$ -, α 5- und α 7-siRNA-behandelten Zellen für den Effekt auf die Zellzahl am Versuchsende direkt verantwortlich waren, kann nicht festgelegt werden. Sie müssen jedoch zentrale Regulatoren bedeutender zellulärer Prozesse sein. Ein Beispiel für ein einflussreiches, Importin α -spezifisches Substrat ist RCC1, das als Guaninnukleotid-Austauschfaktor der GTPase Ran für die Aufrechterhaltung des RanGTP/RanGDP-Gradienten über die Kernmembran verantwortlich ist. Die RanGTP-Generierung im Kern durch RCC1 ist nicht nur wichtig für die meisten Kerntransportwege, sondern auch für den Aufbau der Mitose-Spindel und die Assemblierung der Kernmembran, Prozesse, in denen RanGTP ebenfalls eine Rolle spielt (als Reviews s. Hetzer et al., 2002; Quimby und Dasso, 2003). Frau Dr. Quensel konnte zeigen, dass mikroinjiziertes RCC1 in Importin α3siRNA-transfizierten HeLa-Zellen verlangsamt in den Kern importiert wird, womit eine Importin α-Spezifität beim nukleozytoplasmatischen Proteinimport in lebenden Zellen direkt auf Substrat-Ebene bewiesen wurde. Ob jedoch der gestörte Kernimport von RCC1 verantwortlich war für die drastisch reduzierte Zellzahl am Ende von α3-siRNA-Versuchen, kann nur vermutet aber nicht sicher bestimmt werden.

Es besteht ebenfalls die Möglichkeit, dass die reduzierten Zellzahlen nach der Transfektion mit den entsprechenden Importin-siRNAs durch gestörte, Kerntransport- unabhängige Funktionen der Importine verursacht oder mit verursacht wurden. In den vergangenen Jahren hat sich herausgestellt, dass sowohl Importin α als auch Importin β in weitere nukleäre Prozesse involviert sind, welche Spindel-Formierung und Kernmembran-Assemblierung einschließen (Gruss *et al.*, 2001; Hachet *et al.*, 2004; Harel *et al.*, 2003; Nachury *et al.*, 2001; Wiese *et al.*, 2001).

3.2 Strukturelle Eigenschaften von Kernimportsubstraten bestimmen Importin α -Spezifität

Nachdem das Vorhandensein von Importin α -Spezifität in lebenden Zellen durch die siRNA-Studie bestätigt wurde, sollten die Determinanten für eine spezifische Substratbindung an bevorzugte α -Importine bestimmt werden.

Für die Analyse wurden zwei gut charakterisierte Substrate als Modell ausgewählt: RCC1, das eine ausgeprägte Importin α -Präferenz besitzt, und Nucleoplasmin, das durch diverse α -Importine transportiert werden kann.

3.2.1 Die bipartite NLS von RCC1

Während die Nucleoplasmin-NLS eine der am besten charakterisierten bipartite NLS darstellt (Conti und Kuriyan, 2000; Fontes et al., 2000; Robbins et al., 1991), gab es bisher keine genauen Informationen über den Importin α-Bindungsmodus der RCC1-NLS. Die hier vorgestellten Ergebnisse bestätigten jedoch die schon früher geäußerten Vermutungen (Talcott und Moore, 2000), dass es sich auch bei der RCC1-NLS um eine bipartite NLS handelt, da beide basische Sequenzabschnitte an der Importin α -Bindung beteiligt sind. Das N-terminale basische Cluster der RCC1-NLS liefert hierbei einen geringeren Beitrag zu der hochaffinen Importin α-Bindung als das C-terminale basische Cluster, da die Deletion des N-terminalen Clusters die Importin α -Bindung deutlich schwächte, während die Mutation des C-terminalen Clusters unter den getesteten experimentellen Bedingungen eine signifikante Bindung verhinderte. Die essentielle Lysin-Dublette (K21, K22) des C-terminalen basischen Sequenzabschnitts interagiert vermutlich mit der größeren NLS-Bindungsstelle von Importin α. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass alle bisher kristallographisch untersuchten bipartite NLS mit ihrem C-terminalen basischen Cluster an die größere NLS-Bindungsstelle binden (Conti und Kuriyan, 2000; Fontes et al., 2003a; Fontes et al., 2000). Darüber hinaus besitzt das C-terminale basische Cluster der RCC1-NLS (KSKKVK) eine auffällige Ähnlichkeit zu dem C-terminalen basischen Cluster von einer der kristallographisch untersuchten NLS, der N1N2-NLS (KAKKSK). Welche basischen Reste des N-terminalen Clusters der RCC1-NLS die größte relative Bedeutung für die Bindung an Importin α haben. lässt sich aus den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen leider nicht vorhersagen. In der Regel bindet eine KR-Dublette des N-terminalen basischen Sequenzabschnitts einer bipartite NLS an zwei definierte Bindungstaschen in der kleineren NLS-Bindungsstelle von Importin α (Conti und Kuriyan, 2000; Fontes et al., 2003a; Fontes et al., 2000). Da individuelle Mutationen der einen oder der anderen KR-Dublette in dem N-terminalen basischen Cluster der RCC1-NLS denselben Effekt auf die Importin α-Bindung hatten, kann über die relative Bedeutung dieser KR-Dubletten und ihre genaue Bindung an die kleinere NLS-Bindungsstelle von Importin α keine Aussage gemacht werden.

3.2.2 Die Importin α -Spezifität des RCC1

In bisherigen Kernimportstudien (Köhler et al., 1999; Quensel et al., 2004) hatte sich eine Präferenz des RCC1 für Importin α 3 herausgestellt. Importin α 3 wurde selbst gegenüber dem derselben Importin α -Subfamilie angehörenden und in hohem Maße sequenzähnlichen Importin α 4 bevorzugt. Dies konnte in den durchgeführten Einzelsubstrat-Bindungsassays in Abwesenheit von Importin β bestätigt werden, in denen RCC1 und zzRCC1 eine bessere Bindung an Importin α 3 zeigten als an Importin $\alpha 4$. Dieser Bindungsunterschied zwischen Importin $\alpha 3$ und $\alpha 4$ konnte jedoch in Importin β nicht mehr Gegenwart von gemessen werden, auch Einzelsubstratassays mit verdünnten Reaktionspartnern oder in Kompetitionsassays. Da in den oben erwähnten Transportstudien, in denen sich eine Präferenz für Importin $\alpha 3$ gezeigt hatte, Importin β ebenfalls vorhanden war (rekombinant zugesetzt in Kernimportassays oder endogen in Mikroinjektions-Versuchen), liegt eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz in einer unzureichenden Sensitivität der hier verwendeten Bindungsassays.

Interessanterweise unterscheidet sich die autoinhibitorische Domäne von Importin α 4 von der autoinhibitorischen Domäne von Importin $\alpha 3$ und von denen der anderen α -Importine. Wie in der Einleitung erläutert, bindet die autoinhibtorische Domäne in Abwesenheit von Importin β und/oder Substrat an die größere NLS-Bindungsstelle von Importin α , wodurch sich die Substrat-Affinität für Importin α in Abwesenheit von Importin β verringert. Alle humanen α -Importine mit Ausnahme von Importin α 4 besitzen die autoinhibitorische Kernsequenz KRRNV, für die eine Bindung an die große NLS-Bindungsstelle von Importin α in einer Strukturanalyse bewiesen wurde (Kobe, 1999). Bei Importin α 4 existiert eine leichte Variation dieses Sequenz-Motivs, da das erste Arginin durch Lysin ersetzt ist, wodurch sich die Seguenz KKRNV ergibt. Dadurch könnte auch die Affinität dieser Sequenz für die NLS-Bindungsstelle leicht verändert dies Einfluss auf die Importin α -Spezifität sein. Inwieweit einen von Kernimportsubstraten hat, ist allerdings offen.

3.2.3 Die Funktion der autoinhibitorischen Domäne

Sowohl die Namensgebung der autoinhibitorischen Domäne als auch die Tatsache, dass sie an die größere NLS-Bindungsstelle von Importin α bindet, legen nahe, dass die vorrangige Funktion der Domäne die Inhibition der Bindung von Substraten an freie α -Importine ist. Diese Hypothese wurde bisher dadurch gestützt, dass Substrate eine erhöhte Affinität für Importin α in Gegenwart von Importin β haben (Catimel *et al.*, 2001; Fanara *et al.*, 2000; Rexach und Blobel, 1995). Tatsächlich ist jedoch bisher nicht

bekannt, ob in der Zelle zuerst Substrat oder Importin β an Importin α binden (s. Review Goldfarb et al., 2004). In den Bindungsexperimenten dieser Arbeit stellte sich heraus, dass sich auch die Affinität des Importin β für Importin α in Gegenwart eines Importsubstrates erhöht. Des Weiteren wurde in früheren Biocore-Studien (Köhler et al., 1999) errechnet, dass die Affinität von z.B. RCC1 für Importin α 3 höher ist ($K_D \approx 9$ nM) als die Affinität von Importin β für Importin $\alpha 3$ ($K_D \approx 18$ nM). Dies läßt die Möglichkeit zu, dass zumindest hochaffine Substrate zuerst an Importin α binden, bevor es zur Assoziation mit Importin β kommt. Diese Hypothese wird durch weitere Ergebnisse aus früheren Versuchsreihen unterstützt: Importin $\alpha 3$ ist in humanen Zelllinien eines der am niedrigsten exprimierten α -Importine (~1 nmol/g Geamtprotein), Importin α 1 ist die am meisten vorhandene Isoform (~10 nmol/g Geamtprotein) (Köhler et al., 2002). Wenn von einem durchschnittlichen Zellvolumen von 2000 μm^3 ($10^{12} \mu m^3 = 1 \text{ cm}^3 = 1 \text{ ml}$) für Säuger-Zellen ausgegangen wird und von einer Total-Proteinkonzentration von etwa 2 mg pro 10⁷ Zellen (Harlow und Lane, 1999), dann ergibt sich daraus eine zelluläre Importin α 3-Konzentration von etwa 100 nM und eine Importin α 1-Konzentration von etwa 1 μ M. Da die α -Importine zu ähnlichen Teilen im Zytoplasma und im Nukleoplasma nachweisbar sind (Quensel *et al.*, 2004), könnte die Konzentration der α -Importine im Zytoplasma abhängig von lokalen Konzentrationsunterschieden, dem Anteil an freien Importinen und der zur Verfügung stehenden Menge an Substrat ausreichen, um zumindest hochaffine Substrate direkt, ohne vorherige Assoziation mit Importin β, zu binden. Des Weiteren wurde in der damaligen Studie in allen untersuchten humanen Zelllinien ein deutlicher molarer Überschuss der Importin α-Gesamtmenge gegenüber Importin β gemessen (Köhler et al., 2002). Unter Berücksichtigung des schon diskutierten Umstands, dass Importin β auch noch in weiteren Kerntransportwegen sowie in Transport-unabhängigen zellulären Prozessen involviert ist, ist es unwahrscheinlich, dass die α -Importine im Zytoplasma in einem "Präkomplex" mit Importin β vorliegen, bevor es zur Substratbindung kommt.

Aus den Ergebnissen dieser Arbeit und auf Grundlage der in den früheren Studien erhaltenen Daten läßt sich eine neue, mögliche Funktion der autoinhibitorischen Domäne von Importin α ableiten: Die autoinhibitorische Domäne könnte dazu beitragen, die Bindung des Importin β an Substrat-unbeladene α -Importine zu unterbinden und damit einen unproduktiven Kernimport der Importin α/β -Dimere zu verhindern.

3.2.4 Bedeutung von NLS und Gesamtproteinkontext eines Importsubstrates für Importin α -Spezifität

Um die Beteiligung von NLS und Proteinkontext eines Kernimportsubstrates an der Ausprägung von Importin α -Spezifität zu untersuchen, wurde zum einen die NLS des RCC1 durch die Nucleoplasmin-NLS ersetzt und zum anderen der die NLS beinhaltende N-Terminus des RCC1 N-terminal an die Nucleoplasmin Core-Domäne fusioniert. Die RCC1-NLS war zwar in der Lage, die Importin α -Spezifität des RCC1 in gewissem Ausmaß auf die Nucleoplasmin Core-Domäne zu übertragen, dies konnte jedoch nur mit Hilfe der sensitiveren Kompetitionsassays detektiert werden (Kompetition NLS(R)-Core/NLS(N)-Core, s. Abb. 15C und Abb. 18B). Dadurch wurde ein starker Einfluss des Proteinkontextes auf die Ausbildung von Importin α-Spezifitäten nahe gelegt. Des Weiteren überzeugte die Tatsache, dass identische NLS, die entweder an die Nucleoplasmin Core-Domäne oder an den RCC1-Propeller fusioniert vorlagen, im Kontext des Propellers immer eine höhere Affinität für Importin $\alpha 3/\alpha 4$ hatten als im Kontext der Core-Domäne. Dieser starke Einfluss des Proteinkontextes auf die Importin α -Spezifität wurde sowohl in Kompetitions-Bindungs- als auch in Kompetitions-Importassays deutlich und wurde auch dann beobachtet, wenn zwei artifizielle Fusionsproteine (NLS(N)-Prop und NLS(N)-Core) miteinander konkurrierten (s. Abb. 16B und Abb. 19B). Das letztgenannte Ergebnis schließt die Möglichkeit aus, dass der beobachtete Effekt von Sequenzen verursacht wird, die in Wildtyp-Proteinen unmittelbar an die NLS anschließen und im Sinne einer "erweiterten NLS" bei der Substratbindung mitwirken könnten.

3.2.4.1 Der Proteinkontext und Importin α -Spezifität

Die vorliegenden Ergebnisse haben gezeigt, dass zumindest im Fall der hier verwendeten Modell-Substrate der Proteinkontext einen großen Einfluss auf die Ausbildung von Importin α -Bindungspräferenzen hat. Einige Versuche, besonders die Kompetition der RCC1-NLS mit dem RCC1-Propeller (NLS(\mathbf{R})-Core/NLS(\mathbf{N})-Prop, s. Abb. 22), haben belegt, dass dieser Einfluss gegenüber dem der NLS überwiegt.

Wie kann der Gesamtproteinkontext eines Substrates die Importin α -Bindung beeinflussen? Wie könnte z.B. der RCC1-Propeller eine bevorzugte Bindung an Importin $\alpha 3$ und $\alpha 4$ bewirken? Eine Möglichkeit ist, dass Affinitäten zwischen dem Propeller und Importin $\alpha 3/\alpha 4$ für diesen Effekt verantwortlich sind. Da der Propeller in Abwesenheit einer NLS überhaupt keine Bindung an die α -Importine zeigt, müssten diese Wechselwirkungen entweder sehr schwach sein oder erst nach NLS-vermittelter Präformierung des Importin α -Substrat-Komplexes durch leichte Konformationsänderungen der Bindungspartner entstehen, ähnlich zu den in der *induced fit*-

Hypothese formulierten Prinzipien. Wahrscheinlich würden die schwachen Interaktionen zwischen dem Propeller und Importin α nicht die konkave Innenfläche der ARM-Domäne von Importin α betreffen, in der sich die beiden NLS-Bindungsstellen befinden. Diese konkave Grube kann NLS-Peptide und flankierende Sequenzen aufnehmen, lässt dabei jedoch keinen ausreichenden Platz für weitere Wechselwirkungen mit ferner liegenden Bereichen eines Importsubstrates (Conti und Kuriyan, 2000; Fontes *et al.*, 2003b; Fontes *et al.*, 2000). Jedoch wäre es denkbar, dass Interaktionen zwischen dem Propeller und Importin $\alpha 3/\alpha 4$ leichte Konformationsänderungen im Bereich der NLS-Bindungsstellen hervorrufen, die in Folge die Affinität zwischen den NLS-Bindungsstellen und der NLS erhöhen.

Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass nach diesen oder ähnlichen Prinzipien auch "negative" Einflüsse der Proteinhauptteile das Importin α -Bindungsverhalten beeinflussen oder bestimmen. So könnte der RCC1-Propeller die Bindung an Importin α 1, α 5 und α 7 erschweren oder die Nucleoplasmin Core-Domäne könnte die Bindung an Importin α 3 und α 4 behindern und somit in Kompetitionen mit dem Propeller einen Nachteil für die entsprechende NLS bei der Bindung an diese α -Importine zur Folge haben.

3.2.4.2 Die NLS und Importin α -Spezifität

Ersetzen der RCC1-NLS durch die Nucleoplasmin-NLS die Kompetitionsexperimente mit den Proteinen, die sich nur in ihrer NLS unterscheiden, haben gezeigt, dass auch die NLS zur Ausprägung von Importin α -Spezifität beiträgt. Wie kann die RCC1-NLS eine bevorzugte Bindung an Importin α 3 und α 4 vermitteln? Das N-terminale basische Cluster verstärkt die Affinität für alle getesteten α -Importine, ist aber nicht essentiell für die Bindung an bestimmte Isoformen. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass das N-terminale basische Cluster an der Ausbildung der Importin α -Präferenz der RCC1-NLS beteiligt ist. Hingegen zeigte der C-terminale Teil des RCC1 N-Terminus ein ähnliches kontextabhängiges Importin α -Bindungsverhalten wie die komplette RCC1-NLS, mit einer Präferenz für Importin $\alpha 3/\alpha 4$ im Kontext des RCC1-Propellers. Deshalb ist es wahrscheinlich, dass Aminosäuren des zweiten basischen Clusters der RCC1-NLS und/oder die Aminosäuren, die sich in der Linker-Region zwischen den beiden basischen Sequenzabschnitten der RCC1-NLS befinden, an der Ausbildung der Importin α -Spezifität beteiligt sind. Wird die RCC1-NLS mit der Nucleoplasmin-NLS verglichen, so fallen besonders deutliche Unterschiede in den Linker-Regionen auf. Durch die Mutation in der Linker-Region der Nucleoplasmin-NLS konnte gezeigt werden, dass sich Importin α -Bindungspräferenzen durch Modulationen der Linker-Regionen von bipartite NLS verändern lassen. Durch Austauschen der

beiden basischen Lysine (K161, K162) im NLS-Linker des Wildtyp-Nucleoplasmin durch Alanin und Aspartat (Aminosäuren, die sich an der entsprechenden Stelle des RCC1-NLS-Linkers befinden, A14 und D15) konnte das Importin α -Bindungsverhalten des Nucleoplasmin dem des RCC1 angenähert werden: Die Affinität für die der gleichen Subfamilie angehörenden Importine $\alpha 5$ und $\alpha 7$ wurde verringert, während die relative Affinität für die Importin $\alpha 3/\alpha 4$ -Subfamilie erhöht wurde. Das saure Aspartat (D15) in der RCC1-NLS, das einen deutlichen Gegensatz zu dem an der entsprechenden Stelle Nucleoplasmin-NLS befindlichen basischen Lysin darstellt, höchstwahrscheinlich an dem Spezifität vermittelnden Beitrag der RCC1-NLS beteiligt. augenfälliger Unterschied zwischen der RCC1-NLS und Nucleoplasmin-NLS ist das Vorhandensein mehrerer Proline in der Linker-Region der RCC1-NLS. Proline führen aufgrund ihrer Ringstruktur zum Abknicken von Peptidketten und werden deshalb auch als "Helixbrecher" bezeichnet. Da nicht nur Aminosäure-Seitenketten von *bipartite* NLS-Linker-Regionen mit Importin α wechselwirken, sondern auch deren Peptid-Rückgrate (Conti und Kuriyan, 2000; Fontes et al., 2003a), könnten die Proline in der RCC1-NLS zu einer anderen Sekundärstruktur als die der Nucleoplasmin-NLS führen und somit ebenfalls die Importin α -Bindungsspezifität beeinflussen.

Wie lässt sich die unterschiedliche Importin α -Präferenz verschiedener NLS nun mit den bekannten Importin α -Strukturen vereinbaren? Bisher existieren bisher Kristallstrukturen nur für das Bäckerhefe-Importin α und das Maus Importin α 1 im Komplex mit einigen NLS-Peptiden (Conti und Kuriyan, 2000; Conti et al., 1998; Fontes et al., 2003a; Fontes et al., 2000). Die meisten Importin α -Aminosäuren jedoch, die sich als bedeutend für die Interaktionen mit den basischen Clustern und den Linker-Regionen von bipartite NLS herausgestellt haben, sind in allen humanen Importin α-Isoformen konserviert (s. Abb. 24, entsprechende Aminosäuren sind mit einem Punkt markiert). Nur wenige Importin α -Aminosäuren, die in den bisherigen Strukturanalysen in NLS-Bindungen involviert waren, zeigen leichte Variationen zwischen den humanen Importin α -Isoformen und könnten zur Ausbildung von Importin α -Spezifitäten auf Seiten der α -Importine beitragen (s. Abb. 24, entsprechende Aminosäuren sind mit einem Stern markiert). Es könnten jedoch auch andere Abweichungen zwischen den Importin α -Sequenzen die Importin α -Spezifität beeinflussen, z.B. indem sie die Position oder die Flexibilität von konservierten, an der NLS-Bindung beteiligten Resten in der konkaven NLS-Bindungsgrube verändern. Besonders umfassende Variationen in den humanen Importin α-Sequenzen, die die an der NLS-Bindung beteiligten ARM-Motive betreffen, sind in den ARM-Motiven eins, vier und fünf zu finden (s. Abb. 24).

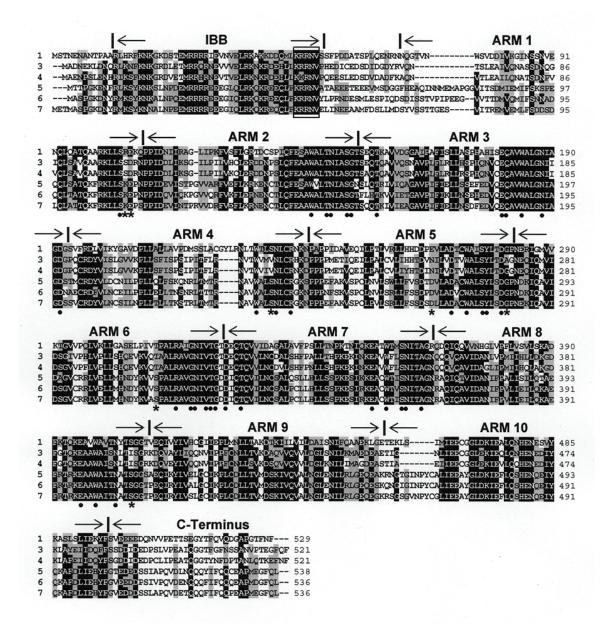


Abb. 24: Vergleich der humanen Importin α-Proteinsequenzen. Das multiple Alignment wurde mit Clustal W (Version 1.83) unter Verwendung einer PAM-Matrix und Standardparametern für gap costs erstellt (gap open: 10, end gaps: -1, gap extension: 0.2, gap distances: 4). Ähnliche und iden-Aminosäuren wurden mittels BioEdit (Version 7.0.5.3) unter Vewendung Standardparametersetzung grau bzw. schwarz hinterlegt. Dabei wurden die Aminosäuren nur dann hervorgehoben, wenn in einer Position des Alignments mindestesn 60% ähnliche bzw identische Aminosäuren vorhanden waren. Die linksseitig vorhandenen Zahlen entsprechen den Importin α-Isoformen, die rechtsseitig angegebenen Zahlen geben Aminosäure-Positionen innerhalb der Sequenzen wieder. Die Regionen der IBB-Domäne, der ARM-Motive und des C-Terminus sind oben gekennzeichnet. Die autoinhibitorische Kernseguenz ist durch ein Kästchen markiert. Aminosäuren, die nach bisherigen Strukturanalysen (Conti und Kuriyan, 2000; Fontes et al., 2003a; Fontes et al., 2000) in Bindungen von bipartite NLS involviert und in allen Importin α -Isoformen vorhanden sind, sind durch einen Punkt markiert. Aminosäuren, die an NLS-Bindungen beteiligt sind, aber eine leichte Variation zwischen den humanen Importin-α-Isoformen zeigen, sind mit einem Stern markiert. Zugangsnummern für die Proteinsequenzen in der NCBI Datenbank: P52292 (Importin α 1), O00629 (Importin α 3), O00505 (Importin α 4), P52294 (Importin α 5), O15131 (Importin α 6), AAC15233 (Importin α 7).

Die in dieser Arbeit präsentierten Daten zeigen, dass im Gegensatz zu den bisherigen Vermutungen nicht nur die Kernlokalisationssignale von nukleären Proteinen zur Ausbildung von Importin α-Substrat-Komplexen beitragen, sondern dass unterschiedliche Domänen der Importsubstrate bei der selektiven Importin α -Bindung mitbestimmend sind. Dies bedeutet, dass Ergebnisse, die bei der Analyse von Kernimportwegen auf NLS-Reporterprotein-Konstrukten beruhen, mit Vorsicht zu interpretieren sind. Des Weiteren ist deutlich geworden, dass die genauen Mechanismen, die der Ausbildung von spezifischen Importin α -Substrat-Komplexen zugrunde liegen, nur durch Strukturanalysen von kompletten Komplexen aufgeklärt werden können. Nur die Kenntnis über die exakte Gestalt von Importin α-Substrat-Komplexen kann Auskunft darüber geben, in welcher Weise NLS und weitere Sequenzen oder strukturelle Einheiten von Importsubstraten bei der Bindung beteiligt sind. Es ist zu erwarten, dass bei solchen Strukturanalysen substratspezifische Interaktionen sichtbar werden, die für den effizienten Import des jeweiligen Substrates notwendig sind. Das Wissen über diese spezifischen Interaktionen könnte neue Möglichkeiten für die Entwicklung von Medikamenten eröffnen, die den Kernimport und damit die Aktivierung einzelner nukleärer Regulatoren, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, hemmen sollen.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 siRNAs

Tabelle I: In dieser Studie verwendete siRNAs.

Name Sequenz (5'→3')		Zielprotein	
α1	GUG UUC CGA GAC UUG GUU A	Importin α1	
α3.1	α3.1 GUC UUG GAG UUG UGA AAC C Imp		
α3.2	GUC CAA UGC UGU GCC ACU U	Importin α3	
α4 CUA ACA UAG CAU CAG GAA C		Importin α4	
α5	UGU GCU UUC CUG GUU GCU G	Importin α5	
α7	CUG UUC CAU CCU UAA UCC U	Importin α7	
β	β UGG AUU UGG CCA UUG AAG C Impor		
Trap α	GGC AAC UUU UGA GUA CUC U	Trap α	

Die siRNAs wurden als Duplices mit überhängenden dTdT-Dinukleotiden an den 3'-Enden synthetisiert (Dharmacon).

4.1.2 Primer

Tabelle II: Primer dieser Studie.

Nr.	Name	Sequenz (5'→3')	Verwendungszweck
1	alpha4_BamHI_ forw	CTCTGCAGGAATAAAGATCCCCC ACCGCC	Entfernung der BamHI-Schnittstelle im α 4-Gen (stille Mutation)
2	alpha4_BamHI_ rev	GGCGGTGGGGGATCTTTATTCCT GCAGAG	Entfernung der BamHI-Schnittstelle im α 4-Gen (stille Mutation)
3	a4_Ncol_forw	CGCCATGGCCGAGAACCCCAGC	Amplifikation der Importin α4 cDNA
4	a4_BamHI_rev	GCGGATCCAAAATTAAATTCTTTT GTTTGAAGG	Amplifikation der Importin α4 cDNA
5	mut_a4/GST_ forw	CAAAAGAATTTAATTTTATCAAGG GCGAGC	Deletion von 2 Basen im Linker zwischen α4 und GST

6	mut_a4/GST_ rev	GCTCGCCCTTGATAAAATTAAATT CTTTTG	Deletion von 2 Basen im Linker zwischen α4 und GST
7	alpha7_HindIII_ forw	CCGGAAGGAAGCCTGCTGGACTA TTTC	Entfernung der HindIII-Schnittstelle im α 7-Gen (stille Mutation)
8	alpha7_HindIII_ rev	GAAATAGTCCAGCAGGCTTCCTT CCGG	Entfernung der HindIII-Schnittstelle im α 7-Gen (stille Mutation)
9	impb_Ncol_ forw	CGCCATGGAGCTGATCACCATTC TCG	Amplifikation der Importin β cDNA
10	impb_BamHI_ rev	GCGGATCCAGCTTGGTTCTTCAG TTTCCTC	Amplifikation der Importin β cDNA
11	rcc1_mut1_ forw	CCATGGCACCCGCTGCCATAGCT AAAAGAAGG	Aminosäure-Substitution im RCC1 N- Terminus (K4A, R5A)
12	rcc1_mut1_rev	CCTTCTTTTAGCTATGGCAGCGG GTGCCATGG	Aminosäure-Substitution im RCC1 N- Terminus (K4A, R5A)
13	rcc1_mut2b_ forw	CCCAAGCGCATAGCTGCCGCAAG GTCCCCCCAGC	Aminosäure-Substitution im RCC1 N- Terminus (K8A, R9A)
14	rcc1_mut2b_ rev	GCTGGGGGGGACCTTGCGGCAG CTATGCGCTTGGG	Aminosäure-Substitution im RCC1 N- Terminus (K8A, R9A)
15	rcc1_mut3b_ forw	GCCATCCCCAAAAGCGCCGCTGT GAAGGTCTCACACAGG	Aminosäure-Substitution im RCC1 N- Terminus (K21A, K22A)
16	rcc1_mut3b_ rev	CCTGTGTGAGACCTTCACAGCGG CGCTTTTGGGGATGGC	Aminosäure-Substitution im RCC1 N- Terminus (K21A, K22A)
17	rcc1_ab25_ Ncol_forw	CGCCATGGTCTCACACAGGTCCC AC	Herstellung von RCC1∆24, Amplifikation RCC1 AS 25-77
18	rcc1_ab25_ Sphl_rev	GGTGTGCATGCCCCCAGC	Herstellung von RCC1∆24, Amplifikation RCC1 AS 25-77
19	rcc1_ab14_ Ncol_forw	CGCCATGGCAGATGCCATCCCCA AAAG	Herstellung von RCC1∆13, Amplifikation RCC1 AS 14-77
20	npl-nls-prop _forw	CGCCATGGCTCCACCCAAAGCTG TAAAG	Herstellung von NLS(N)-Prop, Amplifikation Nucleoplasmin-NLS
21	npl-nls-prop _rev	CGCCATGGCTTTCTTCTTTGC CTGGCC	Herstellung von NLS(N)-Prop, Amplifikation Nucleoplasmin-NLS
22	npl-nls_mut _forw	GGCCTGCGGCTACCGCAGATGCA GGCCAGGCAAAG	Aminosäure-Substitution in der Nucleoplasmin-NLS (K161A, K162D)
23	npl-nls_mut _rev	CTTTGCCTGGCCTGCATCTGCGG TAGCCGCAGGCC	Aminosäure-Substitution in der Nucleoplasmin-NLS (K161A, K162D)

24	npl-nls-core _forw	CGGCATGCCACCCAAAGCTGTAA AGAGG	Herstellung von NLS(N)-Core, Amplifikation Nucleoplasmin-NLS
25	npl-nls-core _rev	CGGCATGCCTTTCTTCTTTGC CTGGCC	Herstellung von NLS(N)-Core, Amplifikation Nucleoplasmin-NLS
26	rcc1_Nterm_ forw	CCGCATGCATGTCACCCAAGCGC ATAGC	Herstellung von NLS(R)-Core, Amplifikation RCC1 N-Terminus
27	rcc1_Nterm_ rev	CCGCATGCCGGGTTCTGTGCTGT GG	Herstellung von NLS(R)-Core, Amplifikation RCC1 N-Terminus
28	rcc1_start_mut_ forw	GAGGAGAAATTAAGCATGTCACC CAAGCGC	Herstellung von NLS(R)-Core, Deletion ATGC
29	rcc1_start_mut_ rev	GCGCTTGGGTGACATGCTTAATTT CTCCTC	Herstellung von NLS(R)-Core, Deletion ATGC
30	rcc1-15_forw	GCCTCGAGAAATCATAAAAAATTT ATTTG	Herstellung von NLS(R ∆16-35)-Core, Amplifikation Vektor + RCC1 AS 1-15
31	rcc1-15_rev	CCGCATGCCATCTGCTGGGGGG GACC	Herstellung von NLS(R ∆16-35)-Core, Amplifikation Vektor + RCC1 AS 1-15
32	rcc1_13/35_ core_forw	CGGCATGCCAGCAGATGCCATCC CC	Herstellung von NLS(R ∆12)-Core, Amplifikation RCC1 AS 13-35
33	rcc1_13/35_ core_rev	GAGCATGCCGGGTTCTGTG	Herstellung von NLS(R ∆12)-Core, Amplifikation RCC1 AS 13-35

Oligonukleotide (ab einer Länge von 30 Basen mittels HPLC gereinigt) wurden von der Firma BioTeZ synthetisiert.

4.1.3 Plasmide

Tabelle III: Plasmide dieser Studie.

Name	Beschreibung/Konstruktion	Referenz/ Herkunft
pQE60	Vektor zur Protein-Überexpression mit C-terminalem 6xHis- Tag	Qiagen
pQE70	Vektor zur Protein-Überexpression mit C-terminalem 6xHis- Tag	Qiagen
pJW10	Vektor zur Protein-Überexpression mit C-terminalem GST-Tag (der His-Tag im pQE60 wurde mittels PCR durch einen GST-Tag ersetzt, über die Schnittstellen BamHI/HindIII).	Dr. Jan Walter

pBAD TOPO TA	Vektor zur direkten Klonierung von PCR-Produkten und zur Protein-Expression	Invitrogen
pQE70/α1	enthält Importin α 1 mit C-terminalem His-Tag (α 1 über Sphl/Bglll in pQE70 kloniert)	(Görlich <i>et al.</i> , 1995)
pQE60/α3	enthält Importin $\alpha 3$ mit C-terminalem His-Tag ($\alpha 3$ über Ncol/BamHI in pQE60 kloniert)	(Köhler <i>et al.</i> , 1999)
pQE60/α4	enthält Importin α 4 mit C-terminalem His-Tag (α 4 über Ncol/BgIII in pQE60 kloniert)	(Köhler <i>et al</i> ., 1999)
pQE60/α5	enthält Importin α 5 mit C-terminalem His-Tag (α 5 über Ncol/BamHI in pQE60 kloniert)	(Köhler <i>et al</i> ., 1999)
pQE70/α7	enthält Importin α 7 mit C-terminalem His-Tag (α 7 über Sphl/BamHI in pQE70 kloniert)	(Köhler <i>et al</i> ., 1999)
pQE60/β	enthält Importin β mit N-terminalem His-Tag in pQE60 (C-terminales His deletiert)	Prof. Dirk Görlich
pJW10/α1	enthält Importin α 1 mit C-terminalem GST-Tag (α 1 mittels PCR amplifiziert und über Ncol/BamHI in pJW10 kloniert)	(Melen <i>et al.</i> , 2003)
pJW10/α3	enthält Importin α 3 mit C-terminalem GST-Tag (α 3 mittels PCR amplifiziert und über Ncol/BamHI in pJW10 kloniert)	(Melen <i>et al.</i> , 2003)
pJW10/α4	enthält Importin $\alpha 4$ mit C-terminalem GST-Tag (BamHI-Schnittstelle der Importin $\alpha 4$ -cDNA [Plasmid pQE60/ $\alpha 4$] durch Mutagenese zerstört [Primer 1/2], danach $\alpha 4$ mit den Primern 3/4 amplifiziert und in pBAD-Vektor ligiert, anschließend über Ncol/BamHI in pJW10 kloniert. Durch fehlerhaften Primer 4 war die gewünschte BamHI-Stelle zerstört, dadurch enthielt das $\alpha 4$ -GST im pJW10 einen Linker zwischen $\alpha 4$ und GST aus dem pBAD-Vektor [pBAD enthält selbst eine BamHI-Schnittstelle], wodurch sich der Protein-Leserahmen verschob. Deshalb Deletion von 2 Basen im Linker [Primer 5/6], womit $\alpha 4$ und GST wieder im gleichen Leserahmen waren. Das finale $\alpha 4$ -GST hat damit folgenden 10 AS-Linker zwischen $\alpha 4$ und GST: IKGELVIVITGSGG)	diese Arbeit
pJW10/α5	enthält Importin α 5 mit C-terminalem GST-Tag (α 5 aus pQE60/ α 5 über Ncol/BamHI in pJW10 umkloniert)	diese Arbeit
pJW10/α7	enthält Importin α 7 mit C-terminalem GST-Tag (HindIII-Schnittstelle der Importin α 7-cDNA [Plasmid pQE70/ α 7] durch Mutagenese zerstört [Primer 7/8], danach His-Tag durch GST-Tag aus pJW10 über BamHI/HindIII ersetzt)	diese Arbeit

	_	
pJW10/β	enthält Importin β mit C-terminalem GST-Tag (Importin β aus pQE60/ β mit den Primern 9/10 amplifiziert, danach über Ncol/BamHI in pJW10 kloniert)	diese Arbeit
pQE60/RCC1	enthält RCC1 mit C-terminalem His-Tag (RCC1 über Ncol/BamHl in pQE60 kloniert)	(Köhler <i>et al.</i> , 1999)
pQE60/zzRCC1	enthält RCC1 mit N-terminalem zz-Tag und C-terminalem His- Tag	Prof. Dirk Görlich
pQE70/NPL	enthält Nucleoplasmin mit C-terminalem His-Tag (Nucleoplasmin über Sphl/BamHI in pQE70 kloniert)	(Görlich <i>et al.</i> , 1994)
pQE70/Core	enthält die Nucleoplasmin Core-Domäne mit C-terminalem His-Tag (Core über Sphl/BamHl in pQE70 kloniert)	(Görlich <i>et al.</i> , 1994)
pQE60/RCC1mt1	enthält RCC1 mit C-terminalem His-Tag und zwei mutierten Aminosäuren im N-Terminus (K4A, R5A, Mutagenese mit Primern 11/12)	diese Arbeit
pQE60/RCC1mt2	enthält RCC1 mit C-terminalem His-Tag und zwei mutierten Aminosäuren im N-Terminus (K8A, R9A, Mutagenese mit Primern 13/14)	diese Arbeit
pQE60/RCC1mt3	enthält RCC1 mit C-terminalem His-Tag und zwei mutierten Aminosäuren im N-Terminus (K21A, K22A, Mutagenese mit Primern 15/16)	diese Arbeit
pQE60/RCC1∆24	enthält ein N-terminal verkürztes RCC1 (AS 25-421) mit C-terminalem His-Tag (Genregion für RCC1 AS 25-77 mit Primern 17/18 aus pQE60/RCC1 amplifiziert, dann über Ncol/SphI in pQE60/RCC1 kloniert)	diese Arbeit
pQE60/RCC1∆13	enthält ein N-terminal verkürztes RCC1 (AS 14-421) mit C-terminalem His-Tag (Genregion für RCC1 AS 14-77 mit Primern 18/19 aus pQE60/RCC1 amplifiziert, dann über Ncol/SphI in pQE60/RCC1 kloniert)	diese Arbeit
pQE60/NLS(N)-Prop	enthält den C-terminal His-getaggten RCC1-Propeller mit N-terminal fusionierter Nucleoplasmin NLS (Amplifikation der NPL-NLS Genregion mit Primern 20/21 aus pQE70/NPL, dann über Ncol/Ncol in pQE60/RCC1 Δ 24 kloniert)	diese Arbeit
pQE70/NPLmt	enthält Nucleoplasmin mit C-terminalem His-Tag und zwei mutierten Aminosäuren im NLS-Linker (K161A, K162D, Mutagenese mit Primern 22/23)	diese Arbeit
pQE70/NLS(N)-Core	enthält C-terminal His-getaggtes Core mit N-terminal fusionierter Nucleoplasmin NLS (Amplifikation der NPL-NLS Genregion mit Primern 24/25 aus pQE70/NPL, dann über Sphl/Sphl in pQE70/Core kloniert)	diese Arbeit

pQE70/NLS(R)-Core	enthält C-terminal His-getaggtes Core mit N-terminal fusioniertem RCC1 N-Terminus (Amplifikation des RCC1 N-Terminus [AS 1-35] mit Primern 26/27 aus pQE60/RCC1, dann über Sphl/Sphl in pQE70/Core kloniert. Basen ATGC in der ersten Sphl-Schnittstelle wurden unter Verwendung der Primer 28/29 deletiert, um das Start-Codon in die richtige Position für die Expression zu bringen).	diese Arbeit
pQE70/NLS(R ∆16- 35)-Core	enthält C-terminal His-getaggtes Core mit N-terminal fusionierten RCC1 AS 1-15 (114 bp Vektor und 3' angrenzende RCC1-Region wurden aus pQE70/NLS(R)-Core mittels Primern 30/31 amplifiziert und über Xhol/Sphl in pQE70/Core kloniert)	diese Arbeit
pQE70/NLS(R ∆12)- Core	enthält C-terminal His-getaggtes Core mit N-terminal fusionierten RCC1 AS 13-35 (Amplifikation der entsprechenden RCC1 Genregion mittels Primern 32/33 aus pQE70/NLS(R)-Core, dann über Sphl/Sphl in pQE70/Core kloniert)	diese Arbeit

Die Protein-kodierenden Sequenzen in den während dieser Arbeit generierten Plasmiden wurden durch DNA-Sequenzierung überprüft (Invitek).

4.1.4 Antikörper

Tabelle IV: In dieser Studie verwendete Antikörper.

Antikörper	Тур	Verdünnung im Westernblot	Referenz/Herkunft
Anti-Importin α 1 (human)	polyklonal, Kaninchen	1:2000 in 1 % Milch/TBT	(Köhler <i>et al.</i> , 1997)
Anti-Importin $\alpha 3$ (human)	polyklonal, Kaninchen	1:5000 in 1 % BSA/PBS	(Köhler <i>et al.</i> , 1997)
Anti-Importin α 4 (human)	polyklonal, Kaninchen	1:1000 in 1 % Milch/TBT	(Köhler <i>et al.</i> , 1997)
Anti-Importin α 5 (human)	polyklonal, Kaninchen	1:1000 in 1 % BSA/PBS	(Köhler <i>et al.</i> , 1997)
Anti-Importin α 6/ α 7 (human)	polyklonal, Kaninchen	1:10.000 in 1 % BSA/PBS	(Köhler <i>et al.</i> , 1999)
Anti-Importin α 7 (human)	polyklonal, Kaninchen	1:10.000 in 1 % Milch/TBT	(Köhler <i>et al.</i> , 1999)

Anti-Importin β (human)	polyklonal, Kaninchen	1:10.000 in 1 % BSA/PBS	(Görlich <i>et al.</i> , 1995)
Anti-Trap α (Hund)	polyklonal, Kaninchen	1:2000 in 1 % BSA/PBS	Prof. Enno Hartmann
Anti-PARP (human)	polyklonal, Kaninchen	1:500 in 1 % BSA/PBS	Santa Cruz
Anti-RCC1 (human)	monoklonal, Maus	1:250 in 1 % BSA/PBS	BD Biosciences
Anti-Penta-His	monoklonal, Maus	1:2000 in 1 % Milch/TBT	Qiagen
Anti-GST	polyklonal, Ziege	1:2000 in 1 % Milch/TBT	Rockland
Anti-Maus-IgG	Peroxidase-konjugiert, polyklonal, Ziege	1:3000 in 10 % Milch/TBT	Sigma
Anti-Kaninchen-IgG	Peroxidase-konjugiert, polyklonal, Ziege	1:10.000 in 10 % Milch/TBT	Sigma
Anti-Ziegen-IgG	Peroxidase-konjugiert, polyklonal, Esel	1:10.000 in 10 % Milch/TBT	Santa Cruz
Anti-Kaninchen-IgG	Alexa 594-gekoppelt, polyklonal, Ziege		Molecular Probes

4.1.5 Bakterienstämme

Der *Escherichia coli* Stamm XL1-Blue (Stratagene) wurde zur Plasmid-Vervielfältigung eingesetzt. Die *E.coli* Stämme BL21/pRep4 und JM101 (Stratagene) wurden für die Überexpression von Proteinen verwendet.

4.1.6 Humane Zelllinien

HeLa-Zellen: epitheliale Zervix-Adenokarzinom-Zellen, DSMZ Nr. ACC 57, Braunschweig.

4.1.7 Chemikalien und Lösungen

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich, Merck, Fluka oder BD in analytischer Qualität (p.a.) bezogen. Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser hergestellt und über einen Celluloseacetat-Membranfilter (Porengröße 0,22 µm, Millipore) filtriert.

4.2 Methoden

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Anzucht von Bakterien

E. coli-Zellen wurden im Allgemeinen in LB-Medium bei 37 °C angezogen. Bei der Amplifikation von Plasmiden wurden entsprechende Antibiotika (50 μg/ml Ampicillin, 20 μg/ml Kanamycin) zur Selektion zugesetzt. Für das Wachstum auf Festmedium wurde LB zuzüglich 1,6 % Agar verwendet.

LB-Medium 1 % Bacto-Trypton 0.5 % Hefe-Extrakt

1 % NaCl

4.2.1.2 Klonierungen

Das in einen Vektor zu ligierende DNA-Fragment wurde entweder durch Restriktionsverdau eines anderen Plasmids (~ 5 µg) oder durch Restriktionsverdau eines PCR-Produktes, dem während der PCR durch die Primer die entsprechenden Restriktions-Schnittstellen angefügt worden waren, erhalten. Der Verdau erfolgte für 2-3 h bei 37 °C. Der Zielvektor (2-5 µg) wurde mit den gleichen Enzymen verdaut, wobei dem Verdau-Ansatz während der letzten Stunde ein Enzym zur Dephosphorylierung des Vektors beigefügt wurde (SAP, Shrimp Alkaline Phosphatase, USB). Der geschnittene Vektor und das geschnittene Fragment wurden aus einem Agarosegel mit Hilfe des Wizard Gel and PCR Clean-Up System (Promega) nach Hersteller-Angaben aufgereinigt. Die anschließende Ligation erfolgte bei 16 °C über Nacht. Die Ligationsansätze hatten ein Volumen von je 20 µl und enthielten ca. 50 ng geschnittenen Vektor, die etwa dreifache molare Menge des geschnittenen DNA-Fragmentes, 0,5 µl Ligase (T4 DNA-Ligase [400 U/µl], NEB) und 1x Ligations-Puffer (NEB). Vor der Transformation in *E. coli* wurden die Ligationsansätze zwecks Entsalzung auf einer schwimmenden Dialyse-Membran (Porengröße 0,2 µm, Millipore) gegen Wasser dialysiert.

Die genaue Konstruktion der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide ist in Tabelle III aufgeführt.

4.2.1.3 Transformation von *E. coli*

E. coli-Zellen wurden mittels Elektroporation transformiert. 50 μl elektrokompetente Zellen (1 Aliquot) wurden auf Eis aufgetaut. 1 μl verdünnte Plasmid-DNA-Lösung

(~ 50 ng DNA) bzw. 5 μl eines Ligationsansatzes wurden mit den Zellen vermischt, wonach die Elektroporation bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 μF erfolgte (Bio-Rad *Gene Pulser*). Anschließend wurden die Zellen in 0,5 ml SOC-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert, bevor 50-100 μl der Zellsuspension auf LB-Platten mit entsprechenden Antibiotika-Zusätzen ausplattiert wurden. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

SOC-Medium 2 % Bacto-Trypton

0,5 % Hefe-Extrakt

10 mM NaCl

2,5 mM KCI

10 mM MgCl₂

10 mM MgSO₄

20 mM Glucose

4.2.1.4 Herstellung elektrokompetenter *E. coli-*Zellen

2x 500 ml 2xTY-Medium (versetzt mit 12 μg/ml Tetracyclin) wurden mit einer Übernacht-Kultur des $E.\ coli$ -Stammes XL1-Blue auf eine OD_{600} von maximal 0,1 angeimpft. Die Bakterien-Kulturen wurden bei 37 °C bis zu einer OD_{600} = 0,9 geschüttelt (250 rpm) und dann kurz auf Eis gekühlt. Nach einer Zentrifugation (10 min, 4 °C, 5000 rpm, Sorvall GS-3 Rotor) wurden die pelletierten Bakterien mit gekühltem (4 °C) destilliertem Wasser gewaschen (200 ml pro Zentrifugen-Becher) und erneut zentrifugiert. Danach wurden die Bakterien mit gekühltem (4 °C) 10 %-igem Glycerol gewaschen (120 ml pro Zentrifugen-Becher), die aufgeschwemmten Bakterien von je zwei Bechern wurden vereint und wieder zentrifugiert. Anschließend wurden die Bakterien mit je 20 ml gekühltem 10 %-igem Glycerol gewaschen, in 50 ml Falcon-Gefäße überführt und nochmals zentrifugiert. Abschließend wurden die Pellets in jeweils 1 ml 10 %-igem Glycerol gelöst, und 50 μl Aliquots wurden in vorgekühlten 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen verteilt, mit Hilfe von flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2xTY-Medium 1,6 % Bacto-Trypton

1 % Hefe-Extrakt

0,5 % NaCl

4.2.1.5 PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten

Bei der PCR-Amplifikation von DNA-Fragmenten für die anschließende Herstellung neuer Plasmide wurde das *Expand High Fidelity PCR System* (Roche) verwendet. Ein PCR-Ansatz (50 µl) enthielt 1x Puffer (Roche), je 20 pmol *forward* und *reverse* Primer, 0,2 mM dNTP-Mix (je 0,2 mM dATP, dTTP, dGTP und dCTP), 3,5 U *Expand*-Taq-Mix (Roche) und 5-10 ng Plasmid-Template. Das PCR-Programm bestand aus einem anfänglichen Denaturierungs-Schritt (95 °C für 5 min), den darauf folgenden 25-30 PCR-Zyklen (94 °C für 1 min, X °C [Primer-Schmelztemperatur minus ~ 5 °C] für 30 s, 72 °C für 1 min/kb) und einer abschließenden Elongations-Phase für 5 min bei 72 °C. 5 µl jedes Ansatzes wurden in einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Wenn sich ein Restriktionsverdau anschloss, wurde das PCR-Produkt mit dem *Wizard Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) nach Hersteller-Angaben gereinigt.

4.2.1.6 Kolonie-PCR

Um nach erfolgter Plasmid-Konstruktion und Transformation zu überprüfen, ob die Bakterien-Klone das Plasmid mit dem gewünschten DNA-Fragment enthielten, wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt, in der das DNA-Insert (soweit vorhanden) amplifiziert wurde. Hierbei wurde jeder PCR-Ansatz mit einer Bakterien-Kolonie (bzw. einem Teil davon) als Template versetzt. Für die PCR wurde die Taq DNA-Polymerase von Invitrogen mit dazugehörigem Puffer verwendet. Ein PCR-Ansatz (15 µl) enthielt 1x Puffer (Invitrogen), 2 mM MgCl₂, je 6 pmol *forward* und *reverse* Primer, 0,2 mM dNTP-Mix, 1,5 U Taq-Polymerase (Invitrogen) und das "Kolonie-Template". Es wurde das übliche PCR-Programm angewendet, mit dem Unterschied, dass der initiale, vor den eigentlichen Zyklen erfolgende Denaturierungsschritt eine Dauer von 10 min anstatt von 5 min hatte. Abschließend wurden die PCR-Ansätze in einer Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

4.2.1.7 Gezielte PCR-Mutagenese von Plasmiden

Mutationen (Substitutionen oder Deletionen) einzelner oder mehrerer (bis zu sechs) Basen in Plasmiden wurden mit Hilfe des *QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene) durchgeführt. Primer, die die gewünschte Mutation enthielten, wurden nach Hersteller-Angaben konstruiert. Mit dem nicht mutierten Plasmid als Template wurden in einer PCR die mutierten Plasmide hergestellt, die mangels Ligation Einzelstrangbrüche an den 5'-Enden der Primer aufwiesen. Nicht mutierte Template-Plasmidstränge wurden anschließend in einem Restriktionsverdau mit Dpn I (schneidet methylierte [aus *E. coli* präparierte] DNA) eliminiert. Die amplifizierten mutierten Plasmide mit den beiden versetzten Einzelstrangbrüchen wurden in chemisch

kompetente *E. coli-*Zellen (XL1-Blue, *supercompetent, QuikChange* Kit) transformiert, in denen die Einzelstrangbrüche ligiert und die Plasmide vermehrt wurden. Einzelne Bakterien-Kolonien wurden für DNA-Isolierungen herangezogen, und der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung (Invitek) überprüft.

4.2.1.8 Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten

DNA-Fragmente ≥ 500 bp wurden in 1 %-igen Agarosegelen (1 % Agarose in TAE) elektrophoretisch bei 100 V aufgetrennt (Hoefer HE33 DNA-Gelelektrophorese-Kammern). Bei kleineren Fragmenten wurden 2 %-ige Agarosegele verwendet. Die DNA wurde in 1x Probenpuffer auf die Gele aufgetragen, als Laufpuffer für die Elektrophorese diente 1x TAE. Als DNA-Längenstandards wurden die 1 kb DNA-Leiter (Gibco) oder die *SmartLadder* (Eurogentec) verwendet. Die Gele enthielten 0,5 µg/ml Ethidiumbromid und wurden unter UV-Licht ausgewertet.

5x Probenpuffer 0,25 % Orange G

50 % Glycerin

5 mM EDTA pH 8,0

50x TAE (1 I) 242 g Tris-Base

72 ml Eisessig

50 mM EDTA pH 8,0

4.2.1.9 Plasmidisolierungen

Plasmidisolierungen aus XL1-Blue-Bakterien erfolgten mit Hilfe des JETSTAR Plasmid-Präparations-Kits (Genomed). Plasmide wurden in der Mini- oder Midi-Präparationsmenge mit Hilfe der entsprechenden Lösungen und Säulen nach Hersteller-Angaben präpariert. Die Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der Plasmide erfolgte anschließend photometrisch (OD₂₆₀ und OD₂₆₀/OD₂₈₀).

4.2.2 Zellbiologische Methoden

4.2.2.1 Kultivierung von Zellen

HeLa-Zellen wurden bei 37 °C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und bei 90 % Luftfeuchtigkeit adhärent angezogen. Als Kulturmedium wurde DMEM (mit Glutamin und 1 g/l Glucosegehalt, PAA) verwendet, das zusätzlich mit 10 % FCS (*FCS Gold* von PAA), 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin (100x Penicillin/Streptomycin-Mix von PAA) versetzt wurde.

4.2.2.2 Passagieren von Zellen

Ein Passagieren der Zellen erfolgte, wenn diese eine ~ 90 %-ige Konfluenz erreicht hatten (etwa 3 Tage nach der letzten Passage). Die Zellen wurden mit PBS (*Dulbecco's PBS*, PAA) gewaschen und mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (PBS mit 0,5 mg/ml Trypsin und 0,22 mg/ml EDTA, PAA) versetzt. Die Endoprotease Trypsin greift die Oberflächenproteine der Zellen an, die für die Adhärenz benötigt werden. Nach 3-5 minütiger Inkubation ließen sich die Zellen durch leichtes Schlagen gegen die Kulturflaschen-Seite vom Flaschenboden ablösen. Durch die darauf folgende Medien-Zugabe wurde das Trypsin inaktiviert (verdünnt und durch den Protein-Überschuss abgesättigt). Die Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren suspendiert und 1:7 verdünnt wieder in Zellkulturflaschen ausgelegt.

4.2.2.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Konservierung wurden HeLa-Zellen in einer großen Zellkulturflasche (150 cm²) bis zu ~ 90 %-iger Konfluenz angezogen, dann wurden die Zellen trypsiniert, sedimentiert und in 10 ml 10 % DMSO/FCS resuspendiert. Je 1 ml wurde in einem 1,5 ml Kryoröhrchen eingefroren. Zum Einfrieren wurden die Röhrchen in ein Papiertuch eingewickelt und für mehrere Tage bei -80 °C gelagert, bevor sie in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt wurden.

Zum Auftauen wurde die eingefrorene Zellsuspension im Kryoröhrchen im 37 °C-Wasserbad geschwenkt, bis die Zellen fast gänzlich aufgetaut waren, dann wurden die Zellen in mittelgroße (75 cm²) oder kleine (25 cm²) Kulturflaschen mit vorgewärmtem Medium überführt.

4.2.2.4 Zellaufschluss

Zur Lysatgewinnung wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend in RIPA-Puffer für 10 min auf Eis lysiert. Nach einer Zentrifugation (4 °C, 20.000 g, 10 min) wurde der Zentrifugationsüberstand bei -80 °C eingefroren.

RIPA-Puffer

50 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 1 % Igepal 0,5 % Natriumdesoxychelat 0,1 % SDS Ergänzung mit einem EDTA-freien Protease-Inhibitor-Mix (*Complete, EDTA-free*, Roche)

4.2.2.5 Cycloheximid-Abbauexperiment

Es wurden 6 cm Schalen mit 10⁶ HeLa-Zellen pro Schale ausgesät. Einen Tag darauf wurden die Zellen mit Medium versetzt, das den Translationsinhibitor Cycloheximid (25 μg/ml) enthielt. Zu den Zeitpunkten 0 h, 3 h, 6 h, 24 h und 48 h wurden Lysate gewonnen (von noch längeren Cycloheximid-Inkubationen wurde abgesehen, da die zellschädigende Wirkung des Cycloheximid nach zwei Tagen in erhöhtem Maße zum Absterben der Zellen führte). In einen Ansatz wurde zusätzlich zu Cycloheximid der Proteasom-Inhibitor ALLN (50 μg/ml, Calbiochem) zugegeben. Von diesem Ansatz wurde schon nach 6 h das Lysat gewonnen, da die Zellen zu einem späteren Zeitpunkt durch das ALLN zu stark geschädigt gewesen wären. Es wurden die Proteinkonzentrationen der Lysate bestimmt und je 10 μg Lysat in einer SDS-PAGE/Westernblot-Analyse mit den Importin-spezifischen Antikörpern untersucht.

4.2.2.6 Transfektion von HeLa-Zellen mit siRNAs

24-Lochplatten wurden mit 3,5 x 10⁴ Zellen pro well bestückt. Am nächsten Tag (Tag 0) wurde morgens das Medium durch Antibiotika-freies Medium ersetzt (0,5 ml pro well). Nachmittags wurden die Zellen mittels Oligofectamine (Invitrogen) mit den entsprechenden siRNAs transfiziert: Für jedes well wurden 3 µl einer 20 µM siRNA-Lösung mit 50 µl Opti-MEM I-Medium (Invitrogen) vermischt sowie separat 3 µl Oligofectamine-Reagenz mit 12 µl Opti-MEM vermengt. Beide Mischungen wurden für 7-10 min bei Raumtemperatur inkubiert, dann vereinigt, gemischt (nicht gevortext!) und für weitere 20-25 min bei Raumtemperatur inkubiert. Diese Mixtur wurde dann mit Opti-MEM auf 100 µl aufgefüllt und tropfenweise in dem entsprechenden well verteilt. Drei Tage später (Tag 3) wurden die Zellen trypsiniert, gezählt, und ein Teil der Zellen wurde neu ausgesät (3,5 x 10⁴ Zellen/well einer 24-Lochplatte), während aus einem anderen Teil Lysat gewonnen wurde. Einen Tag später (Tag 4) wurden die frisch ausgesäten Zellen erneut mit siRNAs transfiziert und nach weiteren drei Tagen (Tag 7) trypsiniert, gezählt und lysiert. Kontrollzellen wurden mit Oligofectamine ohne siRNAs behandelt. Es wurden die Proteinkonzentrationen der Lysate bestimmt und je 10 µg Lysat in einer SDS-PAGE/Westernblot-Analyse untersucht. In dem Kontrollversuch mit Trap α -siRNA wurden die Zellen nicht nur für die Gewinnung von Lysaten verwendet, sondern auch in einer indirekten Immunfluoreszenzanalyse mit dem spezifischen anti-Trap α -Antikörper untersucht (sowohl nach drei als auch nach sieben Tagen).

4.2.2.7 Apoptose-Induktion mit Staurosporin

Es wurden zwei 6 cm Schalen mit 10⁶ HeLa-Zellen pro Schale ausgesät. Zwei Tage später wurde das Medium gewechselt, wobei eine Schale mit Staurosporin-haltigem

Medium (5 μ M) versetzt wurde. Acht Stunden später wurden Lysate aus den unbehandelten und den Staurosporin-behandelten Zellen gewonnen. Es wurden die Proteinkonzentrationen der Lysate bestimmt und je 10 μ g Lysat in einer SDS-PAGE/Westernblot-Analyse mit einem PARP-spezifischen Antikörper untersucht.

4.2.3 Proteinbiochemische Methoden

4.2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten und aufgereinigten rekombinanten Proteinen erfolgte mit dem *DC Protein Assay* von Bio-Rad, in dem die Nachweisreaktion an die Lowry-Methode (Lowry *et al.*, 1951) angelehnt ist. Die Durchführung erfolgte nach Hersteller-Angaben, mit dem Unterschied, dass die Proben und Reagenzien nur in einem Viertel der in der Beschreibung angegebenen Volumina eingesetzt wurden. Die Lysat- und Protein-Proben wurden meistens in einer 1:5-Verdünnung eingesetzt. Eine BSA-Eichreihe mit definierten Konzentrationen zwischen 0 und 1,6 mg/ml wurde in dem entsprechenden Puffer mitgeführt.

Rekombinante aufgereinigte Proteine wurden zusätzlich noch zur Mengenabschätzung in einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert, wobei ebenfalls definierte Mengen anderer Proteine als Vergleich mitgeführt wurden.

4.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Proteine wurden entsprechend ihrer molekularen Masse unter denaturierenden Bedingungen in 12 %-igen oder 15 %-igen Gelen aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei ~ 25 mA pro Gel (Bio-Rad Apparatur). Vor dem Auftragen wurden die Proteine in Probenpuffer für 10 min bei 95 °C denaturiert. Eine Mischung von Proteinen mit definierten molekularen Massen wurde als Größenstandard mitgeführt (*Precision Plus Protein Standards*, Bio-Rad).

4x Probenpuffer 0,2 M Tris-HCl, pH 6,8

40 % Glycerin

8 % SDS

0,4 % Bromphenolblau

0,4 M DTT

5x Elektrophorese-Puffer (2 I) 60,55 g Tris-Base

288 g Glycin 10 % SDS Trenngel-Lösung 12 % (10 ml, für 5 ml H₂O

~2 Gele) 1,9 ml Tris-HCl, pH 8,8 (2 M)

3 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1, 40 %

w/v)

50 μl SDS (20 %) 100 μl APS (10 %)

10 µl TEMED

Sammelgel-Lösung 4,5 % (für ~2 4,2 ml H₂O

Gele) 2 ml Tris-HCl, pH 6,8 (0,5 M)

0,9 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung (29:1,

40 % w/v)

30 μl SDS (20 %) 60 μl APS (10 %) 10 μl TEMED

4.2.3.3 Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Sollten die aufgetrennten Proteine im SDS-Polyacrylamidgel nach der Elektrophorese durch Färbung sichtbar gemacht werden, wurde das Gel in Coomassie-Färbelösung inkubiert. Hierfür wurde die Färbelösung samt Gel in der Mikrowelle erhitzt, danach wurde für 10 min schwenkend gefärbt. Anschließend wurde das Gel in Entfärbelösung entfärbt, wobei Lösung samt Gel ebenfalls anfänglich in der Mikrowelle erhitzt wurden. Nach 10-20 minütigem Schwenken wurde die Entfärbelösung durch frische (nicht erhitzte) Entfärbelösung ersetzt und das Gel wurde bis zur gewünschten Farbintensität weiter darin geschwenkt.

Das Coomassie-gefärbte Gel wurde zweimal kurz in Wasser gewaschen und auf Whatman-Filterpapier für 2 h bei 80 °C unter Vakuum getrocknet (Bio-Rad *Gel Dryer*).

Coomassie-Färbelösung 40 % Methanol

10 % Essigsäure

0,1 % Coomassie Brillantblau R 250

Entfärbelösung 40 % Methanol

10 % Essigsäure

4.2.3.4 Westernblot-Analyse

Um die in einer SDS-PAGE aufgetrennten Proteine für eine Immunodetektion mit Antikörpern zugänglich zu machen, wurden sie im Nass-Verfahren auf eine PVDF-Membran (Millipore) geblottet (Bio-Rad Apparatur). Hierfür wurde eine mit Methanol benetzte PVDF-Membran luftblasenfrei auf das Gel gelegt. Gel und Membran wurden zwischen in Blotpuffer getränkten Whatman-Papieren und Schwämmen in die entsprechenden Halterungen geklemmt und in die mit Puffer gefüllte Blotkammer gehängt. Es wurde unter Kühlen für 75 min bei 110 V geblottet. Um den Erfolg des Transfers sicherzustellen und die Proteine auf der Membran zu fixieren, wurde die Membran nach dem Blotten für ca. 3 Minuten mit Ponceau S (0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure, Sigma) gefärbt. Die Farbe wurde danach durch zwei bis drei Waschschritte mit TBT wieder entfernt. Anschließend wurden die noch auf der Membran vorhandenen Proteinbindungsstellen durch eine einstündige Inkubation in 10 % Milch/TBT abgesättigt. Danach wurde die Membran über Nacht mit dem primären Antikörper inkubiert, wobei der Antikörper entweder in einer 1 % Milch/TBT-Lösung oder in einer 1 % BSA/PBS-Lösung verdünnt wurde (s. Tabelle IV). Nicht gebundener Antikörper wurde am nächsten Tag durch 4-maliges Waschen für jeweils 10 min mit TBT entfernt, bevor der Blot für 30 min mit dem sekundären, Peroxidase-gekoppelten Antikörper (verdünnt in 10 % Milch/TBT, s. Tabelle IV) inkubiert wurde. Überschüssiger Antikörper wurde durch Waschen mit TBT (4 x 10 min) entfernt. Die Entwicklung des Blots erfolgte in den beiden zu gleichen Volumenteilen gemischten ECL-Reagenzien für 1-2 Minuten (Western Lightning, Perkin Elmer) und anschließendem Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak XAR Filme). Darüber hinaus wurden bei Bedarf die bei der ECL-Reaktion emittierten Lichtquanten mittels eines Fujifilm LAS-1000 Imager quantifiziert.

Blotpuffer (2 I) 22 g Glycin

4,8 g Tris-Base 25 % Methanol 0,01 % SDS

TBT 50 mM Tris-HCl, pH 7,5

150 mM NaCl 0,1 % Tween-20

4.2.3.5 Überexpression und Reinigung von GST-getaggten Proteinen

Die Expression der C-terminal GST-getaggten Proteine erfolgte in *E. coli* BL21/pRep4-(Importin α 1 und α 7) oder in *E. coli* JM101-Zellen (Importin α 3, α 4, α 5 und Importin β).

Nach der Transformation des jeweiligen Plasmids in den entsprechenden Bakterienstamm wurde der gesamte Transformationsansatz zum Animpfen in eine Übernacht-Kultur gegeben (nach der einstündigen Inkubation in SOC-Medium bei 37 °C). Am nächsten Tag wurden 4 x 800 ml LB-Medium + Antibiotika (Ampicillin bei JM101 und Ampicillin/Kanamycin bei BL21/pRep4) mit der Übernacht-Kultur auf eine $OD_{600} = 0,15-0,2$ angeimpft. Die Bakterien-Kulturen wurden bei 37 °C bis zu einer $OD_{600} = 1,0$ geschüttelt (250 rpm). Dann wurde jede 800 ml Kultur mit 200 ml kaltem, Antibiotika-haltigem LB-Medium sowie mit Ethanol (reinst, Endkonzentration 2 %) und IPTG zur Induktion der Proteinexpression (1 mM Endkonzentration) versetzt. Die Kulturen wurden 3 h bei 15 °C unter Schütteln (180 rpm) inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch mehrere Zentrifugationen (10 min, 4 °C, 5000 rpm, Sorvall GS-3 Rotor) in zwei Pellets vereinigt, die bis zur Protein-Aufreinigung bei -80 °C gelagert wurden.

Zur Protein-Aufreinigung wurde jedes Pellet in 20 ml PBS-KMT-Puffer, welcher zusätzlich noch 20 mg Lysozym, 1 mM EDTA und einen Protease-Inhibitor-Mix (Complete, EDTA-free, Roche) enthielt, resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine Ultraschall-Behandlung (4x 20 Pulse [0,7 s], Output Control 4. Branson Sonifier 450). Nach einer Zentrifugation (1 h. 4 °C, 20.000 rpm, Sorvall SS34-Rotor) wurden die Zentrifugations-Überstände mit equilibrierter Glutathion (GSH)-Sepharose-4B (Amersham) in einem 50 ml Falconröhrchen gemischt. Zur Equilibrierung waren 3.5 ml GSH-Sepharose dreimal mit je 30 ml PBS-KMT-Puffer gewaschen worden (Wasch-Zentrifugationen: 1000 g, 5 min, 4 °C). Die Bindung der GST-Fusionsproteine an die Sepharose erfolgte für 2-2,5 h auf einem Drehrad im Kühlraum. Danach wurde die Sepharose zweimal mit je 30 ml PBS-KMT-Puffer gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose in 15 ml PBS-KM-Puffer aufgeschwemmt und in eine Säulenvorrichtung (Econo Column, Bio-Rad) gegeben, in der die abgesetzte Sepharose noch zweimal mit je 15 ml PBS-KM-Puffer gewaschen wurde. Zur Protein-Elution wurde mehrmals je 1 ml Elutionspuffer auf die Sepharose gegeben, die Sepharose darin aufgeschwemmt und für 10 min darin inkubiert, bevor das Eluat in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen wurde. Von den ca. 8 Eluaten wurde je 1 µl auf eine Nitrocellulose-Membran getropft. Die Membran wurde zum Zweck der Protein-Färbung für 2 min in einer Amidoschwarz-Lösung geschwenkt und anschließend mit Wasser entfärbt, bis die proteinhaltigen Eluate identifiziert werden konnten. Die entsprechenden Eluate wurden vereint und im Kühlraum für 2x 1.5 h in Dialvsepuffer (je 800 ml) dialvsiert (Slide-A-Lyzer Dialysekassette, 10.000 MWCO, Pierce). Die dialysierte Proteinprobe wurde in einem Centriprep-Zentrifugengefäß (YM-50, Millipore) nach Firmenprotokoll eingeengt (3 Zentrifugationen für 10 min bei 1500 g und 4 °C) und anschließend über einen Celluloseacetat-Filter (0,22 µm) filtriert (Zentrifugation für 30 s bei 4 °C und 20.000 g im

Spin-X, Centrifuge Tube Filter, Costar). Die filtrierte Proteinlösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Zur Bestätigung der Vollständigkeit der C-terminal GST-getaggten Importine wurden diese mit Trypsin verdaut, die Spaltpeptide wurden mittels HPLC separiert und die N-terminalen Peptide wurden über Massenspektrometrie nachgewiesen (Durchführung von Herrn Albrecht Otto und Frau Eva-Christina Müller, MDC Berlin). Des Weiteren wurden die Protein-Termini in einer Westernblot-Analyse mit dem spezifischen anti-GST-Antikörper und den entsprechenden spezifischen anti-Importin α -Antikörpern (gegen die Protein-N-Termini gerichtet) detektiert.

10x PBS (2 I) 160 g NaCl

4 g KCl

4,7 g KH₂PO₄

28,8 g Na₂HPO₄x2H₂O auf pH 7,2 einstellen

PBS-KM 1x PBS

1 mM MgCl₂ 3 mM KCl

PBS-KMT 1x PBS

1 mM MgCl₂ 3 mM KCl

0,1 % Tween-20

Elutionspuffer 50 mM Tris-HCl, pH 8,0

10 mM reduziertes Glutathion

Amidoschwarz-Färbelösung 0,5 % Amidoschwarz

50 % Methanol 10 % Essigsäure

Dialysepuffer 50 mM HEPES-KOH, pH 7,5

200 mM NaCl 5 % Glycerin

4.2.3.6 Überexpression und Reinigung von His-getaggten Proteinen

Die Expression der His-getaggten Proteine erfolgte in *E. coli* BL21/pRep4-Zellen. Transformation und Protein-Überexpression wurden wie für die GST-getaggten Proteine

beschrieben durchgeführt, mit der Ausnahme, dass die Expression für 2 h bei 37 °C erfolgte (RCC1∆24) oder für 3,5 h bei 22 °C (andere Proteine).

Zur Protein-Aufreinigung wurde jedes Pellet in 20 ml Lysepuffer, welcher zusätzlich einen Protease-Inhibitor-Mix (Complete, EDTA-free, Roche) enthielt, auf Eis resuspendiert. Anschließend erfolgte eine Ultraschall-Behandlung (4x 20 Pulse [0,7 s], Output Control 4, Branson Sonifier 450). Nach einer Ultrazentrifugation (1 h, 4 °C, 70.000 rpm, 70Ti-Rotor, Beckman XL-90 Ultrazentrifuge) wurden die Zentrifugations-Überstände mit equilibriertem Talon-Säulenmaterial (Talon Metal Affinity Resin, Cobalt-Chelat-Säulenmaterial, BD Biosciences) in einem 50 ml Falconröhrchen gemischt. Zur Equilibrierung waren 4 ml *Talon* dreimal mit je 30 ml Lysepuffer gewaschen worden (Wasch-Zentrifugationen: 500 g, 5 min, 4 °C). Die Bindung der His-getaggten Proteine an die Matrix erfolgte für 2 h auf einem Drehrad im Kühlraum. Danach wurde das Säulenmaterial zweimal mit je 30 ml Lysepuffer gewaschen. Anschließend wurde die Talon-Matrix in 15 ml Lysepuffer aufgeschwemmt und in eine Säulenvorrichtung (Econo Column, Bio-Rad) gegeben. Wenn der Puffer bis ca. 1 cm über dem Säulenmaterial abgelaufen war, wurde ein Adapter (Econo Column Flow Adaptor, Bio-Rad) eingesetzt und die Säule an eine gespülte (Lysepuffer/20 mM Imidazol) Gradienten-Anlage (Econo Pump, Bio-Rad) angeschlossen. Zuerst wurde das Säulenmaterial für 30 min mit Lysepuffer/20 mM Imidazol gewaschen (Durchfluss-Geschwindigkeit 0,3 ml/min). Dann wurde innerhalb von 70 min die Imidazol-Konzentration kontinuierlich bis auf 400 mM erhöht und der Durchlauf in 0,9 ml-Fraktionen gesammelt. In weiteren 10 min wurde die Imidazol-Konzentration auf 1 M angehoben, um artifiziell gebundene/aggregierte Proteine von der Matrix zu eluieren. Von den gesammelten Fraktionen wurde jeweils 1 µl auf eine Nitrocellulose-Membran getropft und die Membran wie für die Aufreinigung der GST-getaggten Proteine beschrieben in einer Amidoschwarz-Lösung gefärbt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereint und im Kühlraum für 2x 1,5 h in Dialysepuffer (je 800 ml) dialysiert (Slide-A-Lyzer Dialysekassette, 10.000 MWCO, Pierce). Die dialysierte Proteinprobe wurde in einem *Centriprep-*Zentrifugengefäß (YM-10, Millipore) nach Firmenprotokoll eingeengt (2 Zentrifugationen für 22 min bei 3000 g und 4 °C) und anschließend über einen Celluloseacetat-Filter (0,22 µm) filtriert (Zentrifugation für 30 s bei 4 °C und 20.000 g im Spin-X, Centrifuge Tube Filter, Costar). Die filtrierte Proteinlösung wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 C gelagert.

Im Fall der Aufreinigung des His-getaggten Importin β wurden leicht veränderte Puffer verwendet, die ATP und/oder β -Mercaptoethanol enthielten (der Waschpuffer wurde nach der Protein-Bindung an die *Talon*-Matrix zum Waschen und zum Eluieren des Proteins verwendet).

Lysepuffer 50 mM Tris-HCl, pH 7,5

200 mM NaCl 5 mM Mg(OAc)₂ 5 % Glycerin

Lysepuffer Importin β 50 mM Tris-HCl, pH 7,5

500 mM NaCl 5 mM Mg(OAc)₂

5 mM β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)

Waschpuffer Importin β 50 mM Tris-HCl, pH 7,5

200 mM NaCl 1 mM Mg(OAc)₂

5 mM β-Mercaptoethanol (frisch zugeben)

1 mM ATP (frisch zugeben)

Imidazol-Stammlösung 1 M Imidazol

Amidoschwarz-Färbelösung 0,5 % Amidoschwarz

50 % Methanol 10 % Essigsäure

Dialysepuffer 50 mM HEPES-KOH, pH 7,5

200 mM NaCl 5 % Glycerin

4.2.3.7 Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen

Die zu markierende Proteinprobe wurde mit Markierungspuffer auf ein Volumen von 100-200 μ l und eine Proteinkonzentration von ~ 100 μ M verdünnt. Anschließend wurde der Fluoreszenzfarbstoff (Fluorescein [Fluorescein-5-Maleimid von Molecular Probes] oder Texas Red [Texas Red C2 Maleimid von Molecular Probes]) zugegeben (Endkonzentration 200 μ M). Das Gemisch wurde für 2 h im Dunkeln auf Eis inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde mittels Gelfiltration abgetrennt: Eine mit 2 ml Markierungspuffer gewaschene Sephadex G-25-Säule (NAP 5, Amersham) wurde mit der markierten Probe beladen. Die Elution erfolgte mit 1 ml Markierungspuffer, wobei jeweils zwei Tropfen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen wurden. Von den Eluaten wurde je 1 μ l auf eine Nitrocellulose-Membran getropft und die Membran wie für die Aufreinigung der GST-getaggten Proteine beschrieben in einer Amidoschwarz-Lösung gefärbt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereint, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 C gelagert.

Markierungspuffer 50 mM HEPES-KOH, pH 7,5

200 mM NaCl

Fluoreszenzfarbstoff 20 mM Fluorescein bzw. Texas-Red in

(Stammlösung) Dimethylformamid (DMF)

4.2.3.8 *In vitro* Kernimportassay

Der Importassay wurde auf Basis des beschriebenen Assays (Adam *et al.*, 1990) durchgeführt. HeLa-Zellen wurden auf 3-Loch-Objektträgern (Roth) bis zu einer 60-80 %-igen Konfluenz angezogen. Die Zellen wurden zweimal in eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in Import-Puffer, der mit 30 μ g/ml Digitonin versetzt war, für 8 min auf Eis permeabilisiert. Nach einem kurzen und zwei 10-minütigen Waschschritten in Import-Puffer auf Eis wurden die Zellen mit 20 μ l Import-Mix, der unter anderem eines der α -Importine und fluoreszenzmarkierte(s) Substrat(e) enthielt, versetzt und für 8 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit Import-Puffer wurde einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 3,7 % Formaldehyd/PBS für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach zwei Waschungen mit PBS wurde die DNA mit dem Farbstoff Hoechst (1 μ g/ml) für 3 min bei Raumtemperatur gefärbt. Es folgten 4 Waschschritte mit PBS und 3 Waschschritte mit H₂O, worauf die Objektträger mit Mowiol (auf 40-45 °C vorgewärmt) eingedeckelt wurden. Die Proben wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan 2) mit einem 40x Objektiv und einer angeschlossenen 16 Bit CCD-Kamera (Zeiss Axiocam) analysiert.

Import-Puffer 20 mM HEPES-KOH, pH 7,5

100 mM KOAc 5 mM Mg(OAc)₂ 0,5 mM EGTA

250 mM Saccharose

Core-Puffer 2 mg/ml Nucleoplasmin Core-Domäne

in Import-Puffer

20x Energie-Mix 10 mM ATP

10 mM GTP

200 mM Kreatinphosphat 1 mg/ml Kreatinkinase

10x Ran-Mix 30 μM RanGDP

(von Prof. Dirk Görlich zur 2 μM Rna1p

Verfügung gestellt) 3 μM RanBP1

4 µM NTF2

Import-Mix (20 µI) 1x Ran-Mix

1x Energie-Mix 0,5 mM EGTA

10 % Retikulozyten-Lysat

1 μ M Importin β 0,4 μ M Importin α

0,6 µM fluoreszenzmarkierte(s) Substrat(e)

mit Core-Puffer auf 20 µl aufgefüllt

4.2.3.9 Importin α -Bindungsassay

Pro Ansatz wurden 100 µl Glutathion (GSH)-Sepharose-4B (Amersham) dreimal mit je 1 ml Import-Puffer gewaschen (Sepharose + Puffer im Eppi aufgeschüttelt [nicht gevortext!], dann für 30 s bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert). 800 µl Import-Puffer, welcher zusätzlich einen Protease-Inhibitor-Mix (Complete, EDTA-free, Roche) enthielt, wurden auf die gewaschene Sepharose jedes Ansatzes gegeben. Es folgte die Zugabe der GST-Fusionsproteine (~ 100 pmol pro Ansatz) und eine Inkubation für 1 h auf einem Drehrad im Kühlraum. Anschließend wurde zweimal mit je 1 ml Import-Puffer gewaschen. In jeden Ansatz wurden 800 µl Import-Puffer, der neben den Protease-Inhibitoren diesmal noch 2 mg/ml BSA enthielt, sowie der/die Bindungspartner (~ 300 pmol) gegeben. Wurde His-getaggtes Importin β als eine zusätzliche Komponente in der Bindungsreaktion eingesetzt, wurden ~ 100 pmol Protein in jeden (mit Ausnahme des Importin β-GST-Kontrollansatzes) Ansatz aeaeben. Bindungsreaktion erfolgte wiederum für 1 h auf dem Drehrad im Kühlraum. Nach drei Wasch-Zentrifugationen mit je 1 ml Import-Puffer wurden die gebundenen Proteine durch Zugabe von 65 µl 4x Probenpuffer und anschließendes Aufkochen eluiert. 15-20 µl jedes Ansatzes wurden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert.

Import-Puffer 20 mM HEPES-KOH, pH 7,5

100 mM KOAc 5 mM Mg(OAc)₂ 0,5 mM EGTA

250 mM Saccharose

4x Probenpuffer 0,2 M Tris-HCl, pH 6,8

40 % Glycerin

8 % SDS

0,4 % Bromphenolblau

0,4 M DTT

4.2.3.10 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung

Ein Teil der HeLa-Zellen, die mit der Trap α-siRNA transfiziert worden waren, waren für die Immunfluoreszenzanalyse auf Deckgläschen angezogen worden. Für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung wurden die Zellen zuerst zweimal mit PBS gewaschen und mit 3,7 % Formaldehyd/PBS für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach zwei Waschungen mit PBS wurden sie mit 0,1 % Triton-X100/PBS für 10 min permeabilisiert. Es folgten drei Waschschritte mit PBS und eine 30-minütige Absättigung unspezifischer Antikörper-Bindungsstellen mit Proteinen aus Fischhaut Gelatine (0,4 % fish skin gelatin [FSG] in PBS). Nach fünfmaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit dem spezifischen anti-Trap α-Antikörper (Verdünnung 1:200 in 0,2 % FSG/PBS) für eine Stunde inkubiert. Es wurde wiederum fünfmal mit PBS gewaschen, bevor die Zellen mit dem zweiten, Alexa 594-gekoppelten Antikörper (Ziege anti-Kaninchen, Molecular Probes) in einer 1:1000-Verdünnung in 0,2 % FSG/PBS für 30 min unter Lichtausschluss inkubiert wurden. Nach abermals fünf Waschungen mit PBS wurde die DNA mit dem Farbstoff Hoechst (1 µg/ml) für 5 min gefärbt. Es folgten 4 Waschschritte mit PBS und 3 Waschschritte mit H₂O, worauf die Zellen mit Mowiol (auf 40-45 °C vorgewärmt) eingedeckelt wurden. Die Proben wurden unter einem Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioplan 2) mit einem 40x Objektiv und einer angeschlossenen 16 Bit CCD-Kamera (Zeiss Axiocam) analysiert.

5 REFERENZEN

- **Adam E.J. und Adam S.A.** (1994) Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope. *J. Cell Biol.*, **125**, 547-555.
- Adam S.A., Marr R.S. und Gerace L. (1990) Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J. Cell Biol.*, **111**, 807-816.
- Catimel B., Teh T., Fontes M.R., Jennings I.G., Jans D.A., Howlett G.J., Nice E.C. und Kobe B. (2001) Biophysical characterization of interactions involving importinal pha during nuclear import. *J. Biol. Chem.*, **276**, 34189-34198.
- Chi N.C., Adam E.J., Visser G.D. und Adam S.A. (1996) RanBP1 stabilizes the interaction of Ran with p97 nuclear protein import. *J. Cell Biol.*, **135**, 559-569.
- Cingolani G., Petosa C., Weis K. und Muller C.W. (1999) Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature*, **399**, 221-229.
- **Conti E. und Izaurralde E.** (2001) Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**, 310-319.
- **Conti E. und Kuriyan J.** (2000) Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. *Structure Fold Des*, **8**, 329-338.
- Conti E., Uy M., Leighton L., Blobel G. und Kuriyan J. (1998) Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell*, **94**, 193-204.
- **Cortes P., Ye Z.S. und Baltimore D.** (1994) RAG-1 interacts with the repeated amino acid motif of the human homologue of the yeast protein SRP1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 7633-7637.
- Cuomo C.A., Kirch S.A., Gyuris J., Brent R. und Oettinger M.A. (1994) Rch1, a protein that specifically interacts with the RAG-1 recombination-activating protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 6156-6160.
- **Dingwall C. und Laskey R.A.** (1991) Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 478-481.
- **Dingwall C., Sharnick S.V. und Laskey R.A.** (1982) A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus. *Cell*, **30**, 449-458.
- Dutta S., Akey I.V., Dingwall C., Hartman K.L., Laue T., Nolte R.T., Head J.F. und Akey C.W. (2001) The crystal structure of nucleoplasmin-core: implications for histone binding and nucleosome assembly. *Mol. Cell*, **8**, 841-853.
- Earnshaw W.C., Honda B.M., Laskey R.A. und Thomas J.O. (1980) Assembly of nucleosomes: the reaction involving X. laevis nucleoplasmin. *Cell*, **21**, 373-383.

- **Efthymiadis A., Shao H., Hubner S. und Jans D.A.** (1997) Kinetic characterization of the human retinoblastoma protein bipartite nuclear localization sequence (NLS) in vivo and in vitro. A comparison with the SV40 large T-antigen NLS. *J. Biol. Chem.*, **272**, 22134-22139.
- Fagerlund R., Kinnunen L., Köhler M., Julkunen I. und Melen K. (2005) NF-{kappa}B is transported into the nucleus by importin {alpha}3 and importin {alpha}4. *J. Biol. Chem.*, **280**, 15942-15951.
- **Fanara P., Hodel M.R., Corbett A.H. und Hodel A.E.** (2000) Quantitative analysis of nuclear localization signal (NLS)-importin alpha interaction through fluorescence depolarization. Evidence for auto-inhibitory regulation of NLS binding. *J. Biol. Chem.*, **275**, 21218-21223.
- **Fontes M.R., Teh T., Jans D., Brinkworth R.I. und Kobe B.** (2003a) Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importinalpha. *J. Biol. Chem.*, **278**, 27981-27987.
- Fontes M.R., Teh T., Toth G., John A., Pavo I., Jans D.A. und Kobe B. (2003b) Role of flanking sequences and phosphorylation in the recognition of the simian-virus-40 large T-antigen nuclear localization sequences by importin-alpha. *Biochem. J.*, **375**, 339-349.
- **Fontes M.R., Teh T. und Kobe B.** (2000) Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha. *J. Mol. Biol.*, **297**, 1183-1194.
- **Gilchrist D., Mykytka B. und Rexach M.** (2002) Accelerating the rate of disassembly of karyopherin.cargo complexes. *J. Biol. Chem.*, **277**, 18161-18172.
- Goldfarb D.S., Corbett A.H., Mason D.A., Harreman M.T. und Adam S.A. (2004) Importin alpha: a multipurpose nuclear-transport receptor. *Trends Cell Biol.*, **14**, 505-514.
- **Görlich D. und Kutay U.** (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**, 607-660.
- **Görlich D., Henklein P., Laskey R.A. und Hartmann E.** (1996a) A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin- beta and hence transit into the nucleus. *EMBO J.*, **15**, 1810-1817.
- **Görlich D., Pante N., Kutay U., Aebi U. und Bischoff F.R.** (1996b) Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J.*, **15**, 5584-5594.
- Görlich D., Kostka S., Kraft R., Dingwall C., Laskey R.A., Hartmann E. und Prehn S. (1995) Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr. Biol.*, **5**, 383-392.

- **Görlich D., Prehn S., Laskey R.A. und Hartmann E.** (1994) Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell*, **79**, 767-778.
- Gruss O.J., Carazo-Salas R.E., Schatz C.A., Guarguaglini G., Kast J., Wilm M., Le Bot N., Vernos I., Karsenti E. und Mattaj I.W. (2001) Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell*, 104, 83-93.
- **Hachet V., Kocher T., Wilm M. und Mattaj I.W.** (2004) Importin alpha associates with membranes and participates in nuclear envelope assembly in vitro. *EMBO J.*, **23**, 1526-1535.
- Hannon G.J. (2002) RNA interference. Nature, 418, 244-251.
- Harel A., Chan R.C., Lachish-Zalait A., Zimmerman E., Elbaum M. und Forbes D.J. (2003) Importin beta negatively regulates nuclear membrane fusion and nuclear pore complex assembly. *Mol. Biol. Cell*, **14**, 4387-4396.
- **Harlow E. und Lane D.** (1999) Using Antibodies A Laboratory Manual. *CSHL Press*, New York, **1st edition**, Appendix III.
- **Hetzer M., Gruss O.J. und Mattaj I.W.** (2002) The Ran GTPase as a marker of chromosome position in spindle formation and nuclear envelope assembly. *Nat Cell Biol*, **4**, E177-184.
- Hieda M., Tachibana T., Yokoya F., Kose S., Imamoto N. und Yoneda Y. (1999) A monoclonal antibody to the COOH-terminal acidic portion of Ran inhibits both the recycling of Ran and nuclear protein import in living cells. *J. Cell Biol.*, **144**, 645-655.
- Hogarth C.A., Calanni S., Jans D.A. und Loveland K.L. (2006) Importin alpha mRNAs have distinct expression profiles during spermatogenesis. *Dev. Dyn.*, **235**, 253-262.
- **Hu W. und Jans D.A.** (1999) Efficiency of importin alpha/beta-mediated nuclear localization sequence recognition and nuclear import. Differential role of NTF2. *J. Biol. Chem.*, **274**, 15820-15827.
- Huber J., Cronshagen U., Kadokura M., Marshallsay C., Wada T., Sekine M. und Luhrmann R. (1998) Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *EMBO J.*, **17**, 4114-4126.
- Ilmarinen T., Melen K., Kangas H., Julkunen I., Ulmanen I. und Eskelin P. (2006) The monopartite nuclear localization signal of autoimmune regulator mediates its nuclear import and interaction with multiple importin alpha molecules. *Febs J*, **273**, 315-324.
- **Izaurralde E., Kutay U., von Kobbe C., Mattaj I.W. und Görlich D.** (1997) The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J.*, **16**, 6535-6547.

- Jakel S., Albig W., Kutay U., Bischoff F.R., Schwamborn K., Doenecke D. und Görlich D. (1999) The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *EMBO J.*, **18**, 2411-2423.
- **Jakel S. und Görlich D.** (1998) Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J.*, **17**, 4491-4502.
- **Kalderon D., Roberts B.L., Richardson W.D. und Smith A.E.** (1984) A short amino acid sequence able to specify nuclear location. *Cell*, **39**, 499-509.
- Kaufmann S.H., Desnoyers S., Ottaviano Y., Davidson N.E. und Poirier G.G. (1993) Specific proteolytic cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an early marker of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res.*, **53**, 3976-3985.
- **Kobe B.** (1999) Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 388-397.
- Köhler M., Fiebeler A., Hartwig M., Thiel S., Prehn S., Kettritz R., Luft F.C. und Hartmann E. (2002) Differential expression of classical nuclear transport factors during cellular proliferation and differentiation. *Cell. Physiol. Biochem.*, **12**, 335-344.
- Köhler M., Buchwalow I.B., Alexander G., Christiansen M., Shagdarsuren E., Samoilova V., Hartmann E., Mervaala E.M. und Haller H. (2001) Increased importin alpha protein expression in diabetic nephropathy. *Kidney Int.*, **60**, 2263-2273.
- Köhler M., Speck C., Christiansen M., Bischoff F.R., Prehn S., Haller H., Görlich D. und Hartmann E. (1999) Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 7782-7791.
- Köhler M., Ansieau S., Prehn S., Leutz A., Haller H. und Hartmann E. (1997) Cloning of two novel human importin-alpha subunits and analysis of the expression pattern of the importin-alpha protein family. *FEBS Lett.*, **417**, 104-108.
- Kutay U., Bischoff F.R., Kostka S., Kraft R. und Görlich D. (1997) Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell*, **90**, 1061-1071.
- **Lanford R.E., Kanda P. und Kennedy R.C.** (1986) Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal. *Cell*, **46**, 575-582.
- Lazebnik Y.A., Kaufmann S.H., Desnoyers S., Poirier G.G. und Earnshaw W.C. (1994) Cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase by a proteinase with properties like ICE. *Nature*, **371**, 346-347.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L. und Randall R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.

- **Macara I.G.** (2001) Transport into and out of the nucleus. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65**, 570-594, table of contents.
- Mason D.A., Mathe E., Fleming R.J. und Goldfarb D.S. (2003) The Drosophila melanogaster importin alpha3 locus encodes an essential gene required for the development of both larval and adult tissues. *Genetics*, **165**, 1943-1958.
- **Mason D.A., Fleming R.J. und Goldfarb D.S.** (2002) Drosophila melanogaster Importin alpha1 and alpha3 Can Replace Importin alpha2 During Spermatogenesis but Not Oogenesis. *Genetics*, **161**, 157-170.
- **Matsuura Y. und Stewart M.** (2005) Nup50/Npap60 function in nuclear protein import complex disassembly and importin recycling. *EMBO J.*, **24**, 3681-3689.
- Melen K., Fagerlund R., Franke J., Köhler M., Kinnunen L. und Julkunen I. (2003) Importin alpha nuclear localization signal binding sites for STAT1, STAT2, and influenza A virus nucleoprotein. *J. Biol. Chem.*, **278**, 28193-28200.
- Mirski S.E., Sparks K.E., Friedrich B., Köhler M., Mo Y.Y., Beck W.T. und Cole S.P. (2007) Topoisomerase II binds importin alpha isoforms and exportin/CRM1 but does not shuttle between the nucleus and cytoplasm in proliferating cells. *Exp. Cell Res.*, **313**, 627-637.
- Miyamoto Y., Imamoto N., Sekimoto T., Tachibana T., Seki T., Tada S., Enomoto T. und Yoneda Y. (1997) Differential modes of nuclear localization signal (NLS) recognition by three distinct classes of NLS receptors. *J. Biol. Chem.*, **272**, 26375-26381.
- Muhlhausser P., Muller E.C., Otto A. und Kutay U. (2001) Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones. *EMBO Rep*, **2**, 690-696.
- Nachury M.V., Maresca T.J., Salmon W.C., Waterman-Storer C.M., Heald R. und Weis K. (2001) Importin beta is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly. *Cell*, **104**, 95-106.
- Nadler S.G., Tritschler D., Haffar O.K., Blake J., Bruce A.G. und Cleaveland J.S. (1997) Differential expression and sequence-specific interaction of karyopherin alpha with nuclear localization sequences. *J. Biol. Chem.*, **272**, 4310-4315.
- **Nemergut M.E. und Macara I.G.** (2000) Nuclear import of the ran exchange factor, RCC1, is mediated by at least two distinct mechanisms. *J. Cell Biol.*, **149**, 835-850.
- Nishinaka Y., Masutani H., Oka S., Matsuo Y., Yamaguchi Y., Nishio K., Ishii Y. und Yodoi J. (2004) Importin alpha1 (Rch1) mediates nuclear translocation of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3)-up-regulated protein 1. *J. Biol. Chem.*, **279**, 37559-37565.
- **Peifer M., Berg S. und Reynolds A.B.** (1994) A repeating amino acid motif shared by proteins with diverse cellular roles. *Cell*, **76**, 789-791.

- Quensel C., Friedrich B., Sommer T., Hartmann E. und Köhler M. (2004) In vivo analysis of importin alpha proteins reveals cellular proliferation inhibition and substrate specificity. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 10246-10255.
- **Quimby B.B. und Dasso M.** (2003) The small GTPase Ran: interpreting the signs. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**, 338-344.
- Renault L., Nassar N., Vetter I., Becker J., Klebe C., Roth M. und Wittinghofer A. (1998) The 1.7 A crystal structure of the regulator of chromosome condensation (RCC1) reveals a seven-bladed propeller. *Nature*, **392**, 97-101.
- **Rexach M. und Blobel G.** (1995) Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell*, **83**, 683-692.
- Robbins J., Dilworth S.M., Laskey R.A. und Dingwall C. (1991) Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, **64**, 615-623.
- Seino H., Hisamoto N., Uzawa S., Sekiguchi T. und Nishimoto T. (1992) DNA-binding domain of RCC1 protein is not essential for coupling mitosis with DNA replication. *J. Cell Sci.*, **102 (Pt 3)**, 393-400.
- **Seki T., Tada S., Katada T. und Enomoto T.** (1997) Cloning of a cDNA encoding a novel importin-alpha homologue, Qip1: discrimination of Qip1 and Rch1 from hSrp1 by their ability to interact with DNA helicase Q1/RecQL. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **234**, 48-53.
- **Sekimoto T., Imamoto N., Nakajima K., Hirano T. und Yoneda Y.** (1997) Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. *EMBO J.*, **16**, 7067-7077.
- **Talcott B. und Moore M.S.** (2000) The nuclear import of RCC1 requires a specific nuclear localization sequence receptor, karyopherin alpha3/Qip. *J. Biol. Chem.*, **275**, 10099-10104.
- **Truant R. und Cullen B.R.** (1999) The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 1210-1217.
- **Tsuji L., Takumi T., Imamoto N. und Yoneda Y.** (1997) Identification of novel homologues of mouse importin alpha, the alpha subunit of the nuclear pore-targeting complex, and their tissue-specific expression. *FEBS Lett.*, **416**, 30-34.
- **Weis K.** (2003) Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, **112**, 441-451.
- **Weis K., Ryder U. und Lamond A.I.** (1996) The conserved amino-terminal domain of hSRP1 alpha is essential for nuclear protein import. *EMBO J.*, **15**, 1818-1825.

- Weis K., Mattaj I.W. und Lamond A.I. (1995) Identification of hSRP1 alpha as a functional receptor for nuclear localization sequences. *Science*, **268**, 1049-1053.
- Welch K., Franke J., Köhler M. und Macara I.G. (1999) RanBP3 contains an unusual nuclear localization signal that is imported preferentially by importin-alpha3. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 8400-8411.
- Wiese C., Wilde A., Moore M.S., Adam S.A., Merdes A. und Zheng Y. (2001) Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. *Science*, **291**, 653-656.
- Yano R., Oakes M.L., Tabb M.M. und Nomura M. (1994) Yeast Srp1p has homology to armadillo/plakoglobin/beta-catenin and participates in apparently multiple nuclear functions including the maintenance of the nucleolar structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **91**, 6880-6884.
- Yano R., Oakes M., Yamaghishi M., Dodd J.A. und Nomura M. (1992) Cloning and characterization of SRP1, a suppressor of temperature- sensitive RNA polymerase I mutations, in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 5640-5651.

6 ANHANG

6.1 Abkürzungen

AIRE Autoimmune regulator

ALLN N-Acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal

APS Ammoniumpersulfat

ARM Armadillo

AS Aminosäure(n)

ATP Adenosintriphosphat

bp Basenpaare

BSA Bovine serum albumin

cDNA Complementary DNA

C-Terminus Carboxyterminus

dATP Desoxyadenosintriphosphat

dCTP Desoxycytidintriphosphat

dGTP Desoxyguanosintriphosphat

DMEM Dulbecco's modified eagle medium

DMF Dimethylformamid

DMSO Dimethylsulfoxid

DNA Desoxyribonucleic acid

dNTP Desoxynukleosidtriphosphat

DSMZ Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

DTT Dithiothreitol

dTTP Desoxythymidintriphosphat

E. coli Escherichia coli

ECL Enhanced chemiluminescence

EDTA Ethylendiamintetraacetat

EGTA Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)-tetraacetat

ER Endoplasmatisches Retikulum

et al. Et alii, und andere

FACS Fluorescence-activated cell sorter

FCS Fetal calf serum

FSG Fish skin gelatin

GAP GTPase-activating protein

GDP Guanosindiphosphat

GEF Guanine nucleotide exchange factor

GSH Glutathion

GST Glutathion-S-Transferase

GTP Guanosintriphosphat

h Stunden

HEAT Proteinfaltungsmotiv, das in den Proteinen Huntingtin,

elongation factor 3, A-Untereinheit der Phosphatase 2A und

TOR1 zuerst gefunden wurde

HeLa "Helen Lane" Humanzelllinie

HEPES 4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure

His Histidin

HPLC High-pressure liquid chromatography

IBB-Domäne Importin β-Bindungsdomäne

IgG Immunglobulin G

IPTG Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid

kb Kilo Basen

kDa Kilo Dalton

LB "Luria Bertani"-Medium

min Minuten

mRNA Messenger-RNA

NCBI National center for biotechnology information

NES Nuclear export sequence

NF- κ B Nuclear factor κ B

NLS Nuclear localization sequence

NPC Nuclear pore complex

NPL Nucleoplasmin

N-Terminus Aminoterminus

NTP Nukleosidtriphosphat

OD₆₀₀ Optische Dichte bei 600 nm

p.a. Pro analysi

PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese

PARP Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase

PBS Phosphate buffered saline

PCR Polymerase chain reaction

PVDF Polyvinylidendifluorid

RCC1 Regulator of chromosome condensation 1

RIPA Radioimmunoprecipitation assay-Puffer

RISC RNA-induced silencing complex

RNA Ribonucleic acid

RNP Ribonukleoprotein

rpm Rotations per minute

SAP Shrimp alkaline phosphatase

SDS Sodiumdodecylsulfat

siRNA Small interfering RNAs

STAT Signal transducer and regulator of transcription

SV40 Simian Virus 40

TAE Tris-Acetat-EDTA-Puffer

T-Ag Tumorantigen

TBT Tris buffered Tween-Puffer

TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

Tris Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

U Units

UV-Licht Ultraviolettes Licht

v/v Volume per volume

w/v Weigth per volume

6.2 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Matthias Köhler für die Überlassung des interessanten Themas, für sein reges Interesse am Fortgang der Arbeit, seine Freude an den einzelnen Ergebnissen und seinen motivierenden Optimismus! Ich danke ihm dafür, dass er mir sehr viel Freiraum und Eigenständigkeit zugestanden hat!

Genauso herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. Enno Hartmann für seine Betreuung bedanken! Er hat sich stets Zeit genommen, wenn ich seiner fachlichen Unterstützung bedurfte, war immer diskussionsbereit, und er fand alle meine Ergebnisse spannend und interessant (auch wenn sie zuvor aufgestellte Hypothesen zum Einsturz brachten und ein Umdenken erforderten). Besonders bedanken möchte ich mich bei ihm für sein Engagement und seine Hilfe beim Schreiben des Papers!

Prof. Dr. Thomas Sommer hat mir den Labor- und Schreibplatz in seiner Arbeitsgruppe am Max-Delbrück-Centrum in Berlin zur Verfügung gestellt. Er hatte immer eine offene Tür und ein offenes Ohr, hat mich beraten, unterstützt und angespornt, wann immer es erforderlich war. 1000 Dank dafür!

Bei Christina Quensel möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit im Labor bedanken, für die Weitergabe ihres Wissens bezüglich vieler Methoden und Tricks, und für die vielen fachlichen Diskussionen und privaten Gespräche, die auch nach ihrem Verlassen des Labors nicht ausblieben.

Brigitte Nentwig, Angelika Wittstruck und Corinna Volkwein sei herzlich für ihre technische Hilfe gedankt! Ein ganz besonderer Dank gilt hierbei Brigitte Nentwig, von deren Beistand ich in erhöhtem Maße profitieren durfte, als sie noch im Labor war!

Den anderen lieben Laborkollegen Katrin Bagola, Edgar Benko, Holger Brendebach, Robert Gauss, Christian Hirsch, Sabine Horn, Ernst Jarosch, Birgit Meußer, Anja & Oliver Neuber und Katrin Stade möchte ich für die vielen schönen und lustigen Stunden im Laboralltag danken, für die vielen Geburtstage und die vertrauten Runden freitags nach dem Essen!

Prof. Dr. Dirk Görlich danke ich für die großzügige Bereitstellung des "Ran-Mixes" und für die Plasmide, die er uns zur Verfügung gestellt hat. Eva-Christina Müller und Albrecht Otto danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analyse.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem lieben Stefan, der immer für mich da war, immer geduldig und verständnisvoll war, mir immer gerne bei computertechnischen Fragen geholfen hat, und der vor allem immer an mich geglaubt hat!

Für die weitere persönliche Unterstützung sei meinen Eltern gedankt, die ebenfalls immer für mich da waren und mir diesen Weg ermöglicht haben!

6.3 Lebenslauf

Name Beate Friedrich

Geburtsdatum 06.09.1975

Geburtsort Berlin

SCHULBILDUNG

1982 – 1995 Rudolf Steiner Schule Berlin

1995 Abitur

PRAKTIKUM

11/1995 – 01/1996 Krankenpflegerisches Praktikum

<u>STUDIUM</u>

04/1996 – 11/2001 Studium der Biochemie an der Freien Universität Berlin

10/1998 – 11/1998 Wissenschaftliche Mitarbeit am Weizmann Institute of

Science, Dept. of Immunology, Rehovot, Israel, in der

Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Ben-Nun

03/1999 – 04/1999 Wissenschaftliche Mitarbeit am Deutschen

Krebsforschungszentrum, Angewandte Tumorvirologie,

Heidelberg, in der Arbeitsgruppe von Dr. M. Tommasino

01/2000 - 02/2000 und

03/2000 – 05/2000 Molekulare Genetik, Berlin, in der Arbeitsgruppe von Prof.

Dr. J. Walter, in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe

Wissenschaftliche Mitarbeit am Max-Planck-Institut für

von Prof. Dr. A. Radbruch, Deutsches Rheuma-

forschungszentrum, Berlin

03/2001 - 10/2001 Diplomarbeit am Robert Koch Institut, Berlin, in der

Arbeitsgruppe von Dr. E. Hildt

Thema der Diplomarbeit: "Untersuchung des Einflusses von Hepatitis-B-Viren auf den TNF-Rezeptor-I und auf den

EGF-Rezeptor"

11/2001 Diplom in Biochemie

01/2002 – 02/2002 Weiterführende Arbeiten zum Thema der Diplomarbeit am

Robert Koch Institut, Berlin, in der Arbeitsgruppe von Dr.

E. Hildt

Seit 03/2002 Doktorarbeit am Max-Delbrück-Centrum, Berlin, in der

Arbeitsgruppe von Prof. Dr. T. Sommer, unter der Betreuung von PD Dr. M. Köhler und Prof. Dr. E.

Hartmann (Universität zu Lübeck)

Thema der Doktorarbeit: Charakterisierung der Importin α -

Spezifität von Kernimportsubstraten

6.4 Publikationen und Vorträge

6.4.1 Publikationen

- Mirski S.E., Sparks K.E., Friedrich B., Köhler M., Mo Y.Y., Beck W.T. und Cole S.P. (2007) Topoisomerase II binds importin alpha isoforms and exportin/CRM1 but does not shuttle between the nucleus and cytoplasm in proliferating cells. *Exp. Cell Res.*, **313**, 627-637.
- Friedrich B., Quensel C., Sommer T., Hartmann E. und Köhler M. (2006) Nuclear localization signal and protein context both mediate importin alpha specificity of nuclear import substrates. *Mol. Cell. Biol.*, **26**, 8697-8709.
- Tykocinski L.O., Hajkova P., Chang H.D., Stamm T., Sozeri O., Lohning M., Hu-Li J., Niesner U., Kreher S., Friedrich B., Pannetier C., Grutz G., Walter J., Paul W.E. und Radbruch A. (2005) A critical control element for interleukin-4 memory expression in T helper lymphocytes. *J. Biol. Chem.*, **280**, 28177-28185.
- Friedrich B., Wollersheim M., Brandenburg B., Foerste R., Will H. und Hildt E. (2005) Induction of anti-proliferative mechanisms in hepatitis B virus producing cells. *J. Hepatol.*, **43**, 696-703.

Quensel C., Friedrich B., Sommer T., Hartmann E. und Köhler M. (2004) In vivo analysis of importin alpha proteins reveals cellular proliferation inhibition and substrate specificity. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 10246-10255.

6.4.2 Vorträge

Importin alpha specificity of nuclear import substrates is mediated by both, NLS and protein context

<u>Friedrich B</u>, Quensel C, Sommer T, Hartmann E und Köhler M. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, 29.03. - 01.04.2006

6.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur mit den angegebenen Hilfsmitteln angefertigt habe.

Die Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat darüber hinaus noch nicht zu Prüfungszwecken gedient.

Berlin, Februar 2007