

Viola Maria Baumgärtel

KINETISCHE IN VITRO-ANALYSE
NUKLEOCYTOPLASMATISCHER
TRANSPORTREZEPTOREN UND RETROVIRALER
SUBSTRATE

2008

Westfälische Wilhelms-Universität Münster

**KINETISCHE IN VITRO-ANALYSE
NUKLEOCYTOPLASMATISCHER
TRANSPORTREZEPTOREN UND
RETROVIRALER SUBSTRATE**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
im Fachbereich Chemie und Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

vorgelegt von
Dipl.-Biochem. Viola Maria Baumgärtel
aus Schwabach

Münster 2008

Diese Arbeit wurde angefertigt im Zeitraum Januar 2005 bis August 2008 in der Abteilung Medizinische Physik und Biophysik des Universitätsklinikums Münster unter der Anleitung von Prof. Dr. Reiner Peters und Prof. 'in Dr. Monika Schönhoff. Im letzten Jahr wurde sie von der Westfälischen Wilhelms-Universität finanziell durch ein Doktorandenstipendium gefördert.

Dekan:	Prof. Dr. F. Ekkehardt Hahn
Erste Gutachterin:	Prof. 'in Dr. Monika Schönhoff
Zweiter Gutachter:	Prof. Dr. Reiner Peters
Tag der mündlichen Prüfung:
Tag der Promotion:

Danksagung

Professor Dr. Reiner Peters danke ich sehr herzlich für die Überlassung des anspruchsvollen und interessanten Themas, für das stetige Interesse an meinen Experimenten sowie für die Möglichkeit, bei zahlreichen Konferenzen meine wissenschaftlichen Arbeiten vorzustellen. Selbstverständlich danke ich auch der Westfälischen Wilhelms-Universität für die finanzielle Unterstützung in Form eines Promotionsstipendiums von März 2007 bis August 2008.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls unseren Kooperationspartnern, ohne deren bereitwilliges Engagement die Umsetzung vieler Projekte nicht möglich gewesen wäre. Professor Dr. Andreas Wieck, Privatdozent Dr. Dirk Reuter und Rolf Wernhardt vom Lehrstuhl für Angewandte Festkörperphysik der Universität Bochum danke ich für die Bereitstellung des FIB Gerätes und die Herstellung qualitativ hochwertiger Messarray-Prototypen in TeflonAF und Cytop. Die Herstellung weiterer Prototypen aus verschiedenen Teflonmaterialien mit Hilfe des Nanoimprint-Verfahrens verdanke ich der Erfahrung und dem Engagement von Dr. Daniel Schondelmaier und Dipl.-Ingenieur Josef Kouba vom Bessy AZM in Berlin.

Des Weiteren möchte ich Professorin Dr. Ulrike Protzer, Privatdozentin Dr. Ruth Brack-Werner und Dr. Kamyar Hadian vom Institut für Molekulare Virologie am GSF Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit in Neuherberg für die hervorragende Kooperation und die Lieferung des pLRedR Expressionsplasmids, sowie des rekombinant hergestellten Fusionsproteins RevGFP danken.

Zu Dank verpflichtet bin ich auch den Mitarbeitern des Max-Planck Instituts für Molekulare Physiologie in Dortmund, vor allem Christine Nowak, die mir die Nutzung der dortigen HPLC Anlage ermöglichten und mir aufgereinigtes RanGTP zukommen ließen.

Den von mir betreuten Diplomanden Nina Quiskamp und Nico Bredendiek danke ich für ihre Begeisterung für das Thema und die Unterstützung bei dem ein oder anderen Experiment, wie der Durchführung einiger Arx1 Transportmessungen, der Dichtigkeitstests sowie einiger Klonierungen.

Herzlichen Dank auch an die gesamte Arbeitsgruppe, ohne deren mental-geistige Unterstützung, sowie lustigen Aktivitäten ich mich nach so manchem Experiment in den Laborgängen verkrochen hätte. Unseren Postdocs Martin und Jana danke ich dafür, dass sie immer ein offenes Ohr für die alltäglichen Laborprobleme hatten und jederzeit zu einer Diskussion bereit waren. Ramona und Julia danke für manches erheiternde Gespräch und jede Menge Labor-Inspiration. Selbstverständlich darf hier auch der Dank an unsere TA Katja Zerf nicht fehlen, deren langjährige Erfahrung und guter Überblick

über geheime Verstecke besonderer Laborutensilien mir so manches Experiment gerettet haben. Es war eine wirklich tolle Atmosphäre und Zeit mit Euch allen !

Zu guter Letzt möchte ich all diejenigen Menschen nennen, deren Freundschaft und Unterstützung mir oftmals geholfen haben, in schwierigen Zeiten nicht aufzugeben oder den Mut zu verlieren.

Allenvoran mein Freund Andreas, dem ich besonders für den Glauben an meine Fähigkeiten, sein Verständnis und sein psychologisches Einfühlungsvermögen danken möchte. Erwähnen will ich auch meine langjährigen Freunde Stefan, Meike, Steffi, Jürgen und Sina, die immer für tiefgehende Gespräche über Gott und die Welt zu haben sind und an meinem Leben so regen Anteil nehmen. Dankbar bin ich auch meinen Studienkollegen Matthias und Andy für inspirierende wissenschaftlichen Diskussionen über Latein, Astronomie, Photographie, Archäologie, Geschichte und Philosophie, die mein Leben bereichern.

Großer Dank gebührt auch meinen Eltern, die meinen Forscherdrang und meine Wissbegierde immer förderten und mir ein interessantes Biochemie-Studium ermöglichten, das den Grundstein zu dieser Arbeit legte.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht als:

- Bradatsch B., Katahira J., Kowalinski E., Bange G., Yao W., Sekimoto T., Baumgärtel V., Boese G., Bassler J., Wild K., Peters R., Yoneda Y., Sinning I., Hurt E.
Arx1 Functions as an Unorthodox Nuclear Export Receptor for the 60S Preribosomal Subunit
Molecular Cell 27(5), 767-779, September 2007

Teile dieser Arbeit wurden durch folgende Projekte und Stipendien finanziert:

- Membranproteine - Funktionelle Dynamik und Kopplung an Reaktionsketten [P21 - DFG SFB 431]
- Promotionsstipendium der Westfälischen-Wilhelms Universität Münster [März 2007 - August 2008]

Konferenzbeiträge:

- Baumgärtel V.M., Quiskamp N., Peters R.
Kinetic Analysis of Nuclear Export Processes
Poster beim Symposium "Intracellular Transport and Trafficking", SFB 523, 3./4. April 2008, MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen, Deutschland
- Baumgärtel V.
Fluorescence technique for the kinetic analysis of membrane transport processes
Vortrag auf Einladung von Dr. Rolf Vermeij beim Frontiers Annual Meeting, 23.-25. Oktober 2007, Leuven, Belgien
- Baumgärtel V., Quiskamp N. Peters R.
Kinetic Analysis of Nuclear Export Processes
Poster beim Frontiers Annual Meeting, 23.-25. Oktober 2007, Leuven, Belgien
- Baumgärtel V., Böse G., Peters R.
Optical Single Transporter Recording - Kinetic Analysis of Nuclear Export
Poster beim Internationalen Symposium "Membrane Proteins and Cellular Dynamics", 2.-5. November 2006, Universität Osnabrück, Deutschland
- Baumgärtel V.
Optical Recording of Nuclear Export
Vortrag beim Symposium des SFB 431/472 "Membrane Proteins 2006", 11.-13. Oktober 2006, Naurod Wiesbaden, Deutschland

Abstract

The basis of this work lies in the analysis of membrane transport processes by adopting the formerly developed Optical Single Transporter Recording. This fluorescence technique mainly uses isolated nuclear envelopes from *Xenopus laevis* oocytes, containing nuclear pore complexes, which are attached on top of an array with well-defined cavities. Transport of added fluorescently labelled substrates into those cavities is monitored by confocal microscopy. Additional improvements of this technique like surface coating, which were achieved in this work, led to tighter adhesion of isolated nuclear membranes on the array-surface. Furthermore several new materials were tested in terms of membrane adhesion and optical properties enabling the production of arrays with much smaller cavities and thus with a broader application spectrum. By analysing the passive diffusion of GFP through nuclear pore complexes it was possible to determine the relative error of the technique, whereby two different rate constants can only be distinguished properly from each other if they are doubled.

All those evaluating experiments finally opened the way to analyse cellular transport processes on a substantiated basis. Arx1, a yeast protein, came into focus as former experiments pointed towards a potential function in the nuclear export of pre60S ribosomal particles. Transport experiments, included in this work, could directly prove the ability of Arx1 to shuttle between the nuclear and the cytoplasmic compartment without any additional cofactor involvement. This underlines its export receptor function, because only receptors, directly interacting with nuclear pore proteins, can overcome the permeability barrier for proteins with molecular weights larger than 40 kDa. Finally the establishment of a transport assay based on three different fluorescent dyes, made it possible to investigate nucleocytoplasmic transport of retroviral RNA-substrates. Those are recognised by the Rev-protein from HIV-1 through a specific secondary structure called rev responsive element (RRE) and are exported out of the nucleus by utilizing the cellular export machinery. The minimal system necessary for export of unspliced retroviral RRE-RNAs could be identified by measurements on isolated nuclear envelopes and included the Rev-protein as adaptor, the Crm1 as karyopherin and RanGTP as major cofactor. RanGTP was not only essential for the transport process, but could also block the diffusion from the cavities back into the nucleus. It therefore determined the unidirectionality of Crm1 mediated RRE-RNA transport.

Inhaltsverzeichnis

I. Theoretischer Hintergrund	1
1. Einleitung	3
2. Der Kernporenkomplex	5
2.1. Struktur und Funktion des NPCs	5
2.2. Modelle zur Beschreibung des NPC Transportmechanismus	7
2.2.1. „Selective Phase“	8
2.2.2. „Virtual Gating“	9
2.2.3. „Affinity Gradient“	11
2.2.4. „Reduction of Dimensionality“	12
3. Optische Einzeltransporter Analyse (OSTR)	15
4. Der Kerntransportrezeptor Crm1	23
4.1. Strukturelle Merkmale	25
4.2. Export ribosomaler Untereinheiten	26
4.2.1. Arx1 Protein	28
4.2.2. Exportmechanismus	30
4.3. Export retroviraler RNA am Beispiel von HIV	30
4.3.1. Rev Protein	31
4.3.2. RRE-RNA	32
4.3.3. Postulierter Exportmechanismus für RRE-RNA	33
5. Ziele der Arbeit	37
II. Experimentelle Methoden	39
6. Materialien	41
7. Molekularbiologische Methoden	47
7.1. Plasmidisolierung aus <i>Escherichia coli</i>	47
7.2. Restriktion der DNA durch Endonukleasen	47
7.3. Auftrennung der Nucleinsäuren durch Agarosegelelektrophorese	48
7.4. Ligation von DNA-Fragmenten	49
7.5. Fällung von DNA mit Ammoniumacetat	49
7.6. Sequenzierung	50

7.7.	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> für Hitzeschocktransformationen	50
7.8.	Hitzeschocktransformation von Plasmid-DNA	50
7.9.	Blau-Weiß Selektion zur Identifikation positiver Klone	51
7.10.	<i>in vitro</i> -Transkription zur Herstellung von RNA	52
7.11.	RNA-Fällung mit Lithiumchlorid	52
7.12.	Konzentrationsbestimmung von Nukleotiden	53
8.	Proteinbiochemische Methoden zur Charakterisierung von Proteinen	55
8.1.	Bradford Konzentrationsbestimmung von Proteinen	55
8.2.	Fluoreszenzmarkierung von Cysteinresten mit Farbstoff-Maleimid	56
8.3.	Gelfiltration zur Abtrennung des freien Farbstoffs	57
8.4.	Bestimmung des Markierungsgrades	57
8.5.	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	58
8.6.	Native Polyacrylamid Elektrophorese - Tris/Glycin System	59
8.7.	Gel-Shift Assay als Bindungsnachweis	60
9.	Herstellung und Reinigung rekombinanter Proteine	63
9.1.	Prokaryotische Proteinexpression mit Hilfe des Lac-Promotors	63
9.2.	Zellaufschluss mit Ultraschall	63
9.3.	Affinitätschromatographie mit Ni-NTA Agarose	64
9.4.	Gelfiltration	65
9.5.	Anionenaustausch-Chromatographie	65
9.6.	Ammoniumsulfatfällung	66
9.7.	Expression und Reinigung von Crm1	66
10.	Durchführung der Optischen Einzeltransporter Analyse (OSTR)	69
10.1.	Herstellung einer Messkammer	69
10.2.	Beschichtung der Polykarbonatoberfläche mit SMCC	70
10.3.	Isolation der Oozyten Nuclei aus <i>Xenopus laevis</i>	71
10.4.	Präparation der Kernmembran in der Messkammer	72
10.5.	Messung des Membrantransportes mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)	72
10.6.	Auswertung der Zeitserien	74
10.7.	Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten und des molekularen Flusses	74
11.	Herstellung neuer Messarrays aus Teflonmaterialien	77
11.1.	Spincoating von TeflonAF TM und Cytop	77
11.2.	Schichtdickenbestimmung	78
11.3.	Strukturierung durch Nanoimprinting und Focussed Ion Beam (FIB)	79
11.4.	Messung der Punktverwaschungsfunktion (PSF)	79
III.	Ergebnisse	83
12.	Evaluation der Transporteranalyse	85

12.1. Statistik der GFP Testmessungen	85
12.2. Untersuchung verschiedener Einflussgrößen	92
12.3. Entwicklung verbesserter Messarrays aus Teflonmaterialien	96
12.4. Diskussion und Ausblick	99
13. Analyse der Export-Kompetenz des ribosomal assoziierten Arx1	101
13.1. Geschwindigkeitskonstante k und molekularer Fluss Φ	101
13.1.1. Arx1-Export: Vom Nukleus ins Cytoplasma	102
13.1.2. Arx1-Import: Vom Cytoplasma zum Nukleus	106
13.2. Diskussion und Ausblick	108
14. Kinetische Charakterisierung des viralen RRE-RNA Transports	111
14.1. <i>In vitro</i> -Transkription der RRE-RNA	111
14.2. Bindungsnachweis zwischen RevGFP und Cy3-RRE/HH-Fragment	115
14.3. Analyse des Transportrezeptors Crm1	118
14.3.1. Expression, Reinigung und Markierung	119
14.3.2. Abhängigkeit von Energie liefernden Prozessen	120
14.4. Analyse des Exports und Imports viraler RRE/HH-RNA	127
14.4.1. Abhängigkeit von Energie liefernden Prozessen	128
14.4.2. Nachweis der Spezifität	135
14.5. Diskussion und Ausblick	137
15. Resümee	141
Abkürzungsverzeichnis	145
Literaturverzeichnis	149
Abbildungsverzeichnis	159
Tabellenverzeichnis	161

Teil I.
Theoretischer Hintergrund

1. Einleitung

Ein Mensch bleibt weise, solange er die Weisheit sucht, sobald er sie gefunden zu haben wähnt, wird er ein Narr

(Spruch aus dem Talmud)

Sowohl in Prokaryonten mit nur einem Kompartiment, als auch in den komplexeren Eukaryonten (griech. eu - echt und karyon - Kern) mit einem Zellkern und mehreren Kompartimenten werden vielfältige Membrantransportwege genutzt, um sich mit der Umgebung auszutauschen oder um die Vorgänge in den einzelnen durch Membranen abgetrennten Bereichen zu koordinieren. Aufgrund ihrer Funktionsweise lassen sich polytope Membranproteine oder Membranproteinkomplexe in Transporter (Carrier) oder Kanäle einteilen. Transporter, die sich im Gegensatz zu den Kanälen durch hohe Substratspezifität auszeichnen, erreichen durch eine bindungsinduzierte Konformationsänderung den Transport von der einen Seite der Membran auf die andere Seite. Kanäle dagegen formen eine hydrophile Membranpore, die für Ionen und kleinere Moleküle eine erleichterte, energetisch günstige Passage durch die hydrophobe Lipiddoppelschicht eröffnet. Folglich sind Kanäle weniger spezifisch als Transporter und besitzen nur eine Ladungs- oder Größenselektivität. Jeder Membrantransport kostet Energie, die vom zellulären System aufgebracht werden muss, um eine positive Energiebilanz (Gibbsenergie) zu erreichen. Ein negativer Enthalpiebeitrag wird unter anderem dadurch geleistet, dass zur Überwindung der hydrophoben Barriere die Hydrathülle der gelösten Stoffe abgelegt werden muss. Gleichzeitig verringert sich für die transportierte Spezies die Anzahl der zur Verfügung stehenden Freiheitsgrade und führt zu einer positiven Entropieänderung. Deshalb werden solche Transportvorgänge direkt oder indirekt an energieliefernde Prozesse, wie ATP-Hydrolyse (ABC-Transporter) oder elektrochemische Gradienten (Na^+ /Glucose Symport) gekoppelt. Dabei spielt vor allem das zelluläre Prinzip des Nichtgleichgewichts,²² in dem chemische Energie durch die asymmetrische Verteilung von Ionen und Molekülen gespeichert ist, eine wichtige Rolle. Denn ohne eine asymmetrische Anordnung von Ionen, wie beispielsweise der Na^+ oder K^+ Ionengradient bei der Nervenleitung oder von Proteinen, wie der RanGTP/RanGDP-Gradient beim nukleocytoplasmatischen Transport, wären viele Transportvorgänge nicht denkbar.

Membrantransporter und Kanäle werden nicht nur von 20-30 % aller Gene kodiert,³³ sondern zeigen auch eine ubiquitäre Verteilung in vielen Zellen und Geweben, so dass sich genetische Veränderungen besonders stark auswirken. Diese führen oftmals zu schweren Erkrankungen. Bei der Zystischen Fibrose (Mukoviszidose), einer Erbkrankheit, werden in Epithelzellen beispielsweise keine oder defekte Chloridionenakanäle gebildet, was zu zähflüssigen Sekretabsonderungen der exokrinen Drüsen vieler Schleimhäute führt. So-

gar bei der Alzheimer-Erkrankung, die durch Ablagerungen von Fibrillen der Amyloid-peptide gekennzeichnet ist, wird ein hemmender Einfluss kleinerer Amyloid- β Peptide auf Kaliumionenkanäle diskutiert.¹⁰⁸ Poren in der Kernmembran, die den Stoffaustausch vom Nukleus zum Cytoplasma ermöglichen, werden ursächlich mit einigen Leukämieformen oder der primären biliären Zirrhose, einer Autoimmunerkrankung, in Verbindung gebracht.¹⁶ Zudem müssen Membranbarrieren, sei es die Zellmembran oder die Kernmembran, nicht nur von zellulären Substraten, sondern auch von Viren überwunden werden.

Folglich sind Membrantransporter und Kanäle von großem pharmakologischen Interesse, wie auch eine systematische Analyse aller auf dem Markt verfügbaren pharmakologischen Substrate ergab, wonach 13.4% aller Pharmaka an Ionenkanälen angreifen.⁶⁴ Werden die G-Protein gekoppelten Rezeptoren noch dazu gerechnet, die aufgrund der Steuerung von Ionenkanälen indirekt auch am Membrantransport beteiligt sind, so würde der Anteil sogar bei 40.4% liegen.⁶⁴ Wegen ihrer hohen Hydrophobizität, ihrer Metastabilität und Komplexität können viele der Transporter und Kanäle bisher weder *in vitro* rekonstituiert noch strukturell vollständig charakterisiert werden. Dies erschwert sicherlich die Suche nach geeigneten Angriffspunkten für medikamentöse Therapien. Deshalb werden weiterhin proteinbiochemische und biophysikalische Methoden die einzige Möglichkeit bleiben, die molekularen Transportmechanismen zu analysieren und *in vitro*-Testsysteme für neue Pharmaka zu etablieren. In diesem Zusammenhang leistet diese Arbeit einen wichtigen Beitrag zum besseren Verständnis des nukleocytoplasmatischen Transportes von ribosomalen Vorstufen (Kapitel [13.1]) und retroviralen RNA-Substraten (Kapitel[14.4]).

2. Der Kernporenkomplex

Die Verknüpfung des nukleären Bereichs, der vornehmlich an der Genregulation, Transkription und Replikation beteiligt ist, mit dem cytoplasmatischen Bereich, der für die Verteilung von Stoffen, Translation und Stoffwechsel zuständig ist, erfolgt über nur einen einzigen zentralen Kanal, den Kernporenkomplex (NPC). Schon seit mehreren Jahrzehnten fasziniert dieser nicht nur aufgrund seiner komplexen Struktur und enormen Größe die Wissenschaft, sondern vor allem aufgrund seiner dualen Funktionsweise d.h. seiner Porenfunktion einerseits und seiner hohen Selektivität ähnlich einem Transporter andererseits. Trotz der Vielfalt an experimentellen Untersuchungsmethoden, die das Bild über die Funktionsweise des NPCs wie ein Mosaik immer weiter ergänzten - es seien hier nur einige wesentliche wie Elektronenmikroskopie,⁸⁶ Cryoelektronentomographie,⁸ Einzelmolekül-Fluoreszenzmethoden,^{61,109,117} 4 π -Mikroskopie,⁵² Einzeltransporteranalyse (OSTR)^{78,80,99,113} und verschiedene Transportassays genannt - wird die molekulare Funktionsweise des Kernporenkomplexes weiterhin kontrovers diskutiert.

2.1. Struktur und Funktion des NPCs

Der Kernporenkomplex durchspannt mit seiner zentralen, wie eine Sanduhr geformten Kanalpore die doppelte Lipidmembran der Kernhülle, deren äußere Membran in das rauhe endoplasmatische Retikulum mit seinen zahlreichen Ribosomen übergeht und deren innere Membran über ein filamentartiges Gerüst aus Laminen mit dem Chromatin verankert wird.¹⁰⁵ Wie in Abbildung [2.1,links] schematisch dargestellt, lässt sich der NPC in drei wesentliche Struktur-Funktionsbereiche unterteilen, erstens in den cytoplasmatischen Bereich mit den Filamenten, zweitens in den zentralen Bereich mit den cytoplasmatischen, lumenalen und nukleären Ringstrukturen, inklusive dem zentralen Kanal und den verbindenden Speichen sowie drittens in den nukleären Bereich mit dem distalen Ring und der Korbstruktur.

Bereits um 1960 wurde erstmals angenommen, dass der zentrale Kanal der Kernporen im Querschnitt eine achtfache Rotationssymmetrie aufweist.²⁹ Im Laufe der Jahrzehnte lieferten zahlreiche Verbesserungen bei der elektronenmikroskopischen Bildgebung und der Einbettung der Proben immer bessere Bilder der Kernporen, wodurch sich die achtfache Symmetrie bestätigen ließ.^{3,106} Die bisher beste Auflösung von 8-9 nm, im Vergleich zu vorherigen Messungen mit etwa 12 nm Auflösung,¹⁰⁶ erreichte *M. Beck*⁸ bei kryoelektronenmikroskopischen Aufnahmen von *Dictyostelium discoideum* Kernen. Dort wird die maximale horizontale Ausdehnung des Kernporenkomplexes im Bereich des cytoplasmatischen Rings mit 125 nm angegeben. Der innere Durchmesser des lumenalen Rings von etwa 60 nm verkleinert sich durch die Korbstruktur auf der nukleären Seite

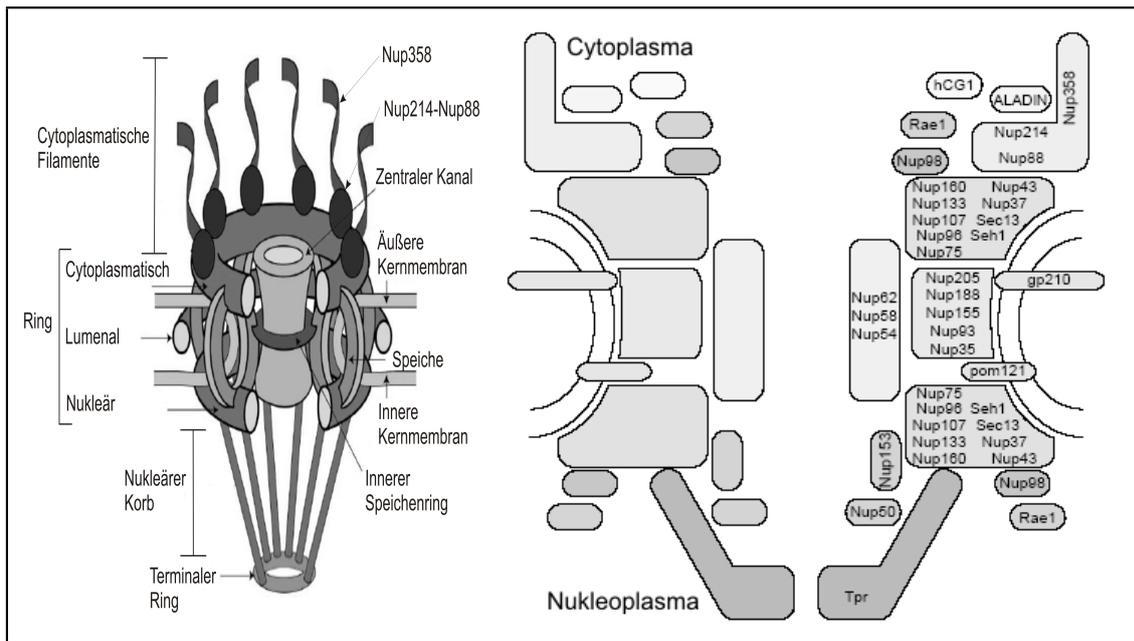


Abb. 2.1.: Struktureller Aufbau des NPCs mit Verteilung der Nukleoporine
links: Strukturell unterscheidbare Bereiche des Kernporenkomplexes, Schema übernommen aus *T.U. Schwartz*;⁹⁷ **rechts:** Verteilung der Nukleoporine innerhalb eines Vertebraten-NPCs, aus *M. Suntharalingam, S.R. Wente*¹¹⁰

bis auf 40 nm, dem Durchmesser des terminalen Rings.⁸ In lateraler Richtung erstreckt sich der NPC ausgehend von gestreckten cytoplasmatischen Filamenten mit einer Länge von etwa 50 nm¹⁰⁶ und einer nukleären Korbstruktur von 60 nm⁸ Länge über insgesamt etwa 160 nm.

Als effektiver Porendurchmesser wird derjenige innere Bereich der zentralen Pore definiert, den kleinere Moleküle und Ionen bis zu einem Molekulargewicht von 40 kDa etwa 3.1 nm (31 Å) ungehindert und passiv ohne zusätzliche Transportfaktoren passieren können. Dieser liegt bei lediglich 5-10 nm.^{55, 76, 79} Der funktionale Durchmesser des zentralen NPC-Kanals ergibt sich dagegen aus dem maximalen Durchmesser derjenigen Komplexe, die unter Mitwirkung von Karyopherinen gerade noch durch den NPC transportiert werden können. *N. Pante* verwendete zur Bestimmung des funktionalen Durchmessers mit Kernlokalisationssequenzen (NLS) beschichtete Goldpartikel,⁷⁷ die bis zu einem Durchmesser von 39 nm durch die Kernporen transportiert wurden. Daneben gibt es mehrere Hinweise darauf, dass sich dieser maximale Durchmesser je nach Transportsubstrat durch ein Aufweiten des zentralen Rings noch vergrößert,⁵⁷ wie spätere Strukturuntersuchungen von *I. Melcak*⁷² bestätigten. Dort wurde aufgrund der strukturell belegbaren hohen Flexibilität des tetrameren Nup58/45 Paares als Teil des zentralen Rings auf eine Variation des NPC-Durchmessers geschlossen, woraus sich möglicherweise eine Vergrößerung des Kanals um maximal 30 Å d.h. 3 nm ergibt.

Die Struktur des Kernporenkomplexes ist zwar innerhalb der Eukaryoten von Hefe

bis über Vertebraten hoch konserviert, jedoch hinsichtlich Komplexität und Zusammensetzung deutlich verschieden,⁸⁴ denn mit einer Gesamtmasse von etwa 66 MDa ist der NPC aus *Saccharomyces cerevisiae*⁹³ um die Hälfte kleiner als der etwa 125 MDa große NPC aus *Xenopus laevis*.⁸⁶ Dabei können die Nukleoporine im Hinblick auf ihre Verteilung innerhalb des Kernporenkomplexes in zwei Gruppen, die symmetrisch Angeordneten und die asymmetrisch Angeordneten unterteilt werden, von denen letztere die strukturellen und funktionellen Unterschiede der cytoplasmatischen und nukleären Regionen bedingen. Die Nukleoporinverteilung im Vertebraten-NPC in Abbildung [2.1, rechts] verdeutlicht, dass Nup214, Nup88, Nup358 asymmetrisch angeordnet sind und ausschließlich im Bereich der cytoplasmatischen Filamente vorliegen. Sie übernehmen, wie in den folgenden Abschnitten erläutert, wichtige Funktionen beim karyopherinvermittelten Exportprozess. Ebenfalls asymmetrisch angeordnet sind die Bestandteile der nukleären Korbstruktur, die vor allem aus dem Nukleoporin Tpr gebildet wird. Dazu gehören die im Bereich des Korbes liegenden Nukleoporine Nup50 und Nup153, dessen flexibles C-terminales Ende möglicherweise auch cytoplasmatisch vorkommen kann.^{6,60} Hingegen werden sowohl cytoplasmatischer als auch nukleärer Ring von denselben symmetrisch angeordneten Nukleoporinkomplexen gebildet und über das zentrale Nukleoporin Pom121 in der Membran verankert.

Einige dieser Nukleoporine, wie Nup62, Nup58 und Nup54 im zentralen Kanal oder beispielsweise Nup358 in der Peripherie, besitzen als gemeinsames Strukturelement phenylalaninreiche, hydrophobe Bereiche, sogenannte „FG-repeats“ mit FxFG, GLFG und PSFG Wiederholungsmotiven, die jeweils von hydrophilen Aminosäureresten flankiert bzw. getrennt werden. Im Zuge von CD- und FT-IR Spektroskopieuntersuchungen konnte deren native Sekundärstruktur als ungefaltet bestimmt werden,²³ was bedeutet, dass sie eine hohe Flexibilität, sowie große hydrodynamische Radien besitzen und somit relativ weit, d.h. mehrere Nanometer, in das Innere des NPC-Kanals hineinragen. Dies bewirkt, dass der bereits genannte effektive Porendurchmesser kleiner ist als der Durchmesser der meisten zellulären Proteine, wodurch die Ausschlussgrenze des NPCs bei etwa 40 kDa, entsprechend etwa *leq* 3.0 nm bei globulären Proteinen⁶² liegt. Neben ihrer strukturgebenden Wirkung sind die FG-Regionen vor allem funktionell von Bedeutung, da alle bisher bekannten Transportrezeptoren an diese Bereiche binden, wodurch der Transport größerer Substrate erst ermöglicht wird. Trotzdem ließen sich ungefähr die Hälfte aller phenylalaninreichen Sequenzen (von 5.5. MDa Gesamtmasse auf 2.5 MDa) entfernen ohne die Funktionsweise des NPCs so stark zu beeinträchtigen, dass die getesteten *Saccharomyces cerevisiae* Hefen nicht mehr lebensfähig waren.¹⁰⁷

2.2. Modelle zur Beschreibung des NPC Transportmechanismus

Im Laufe jahrzehntelanger Forschungsaktivität zu Kernporenkomplexen wurden mehrere Modelle zum Transportmechanismus postuliert, von denen die vier häufigsten das „Virtual Gating“- , das „Selective Phase“- , das „Affinity Gradient“- und schließlich das „Reduktion of Dimensionality“-Modell im Folgenden beschrieben werden. Jedes dieser

Modelle unterscheidet sich vorwiegend hinsichtlich der Eigenschaften des Poreninneren und somit auch hinsichtlich der Funktion der flexiblen ungefalteten FG-Regionen. Neben diesen Unterschieden lassen sich drei übereinstimmende Eigenschaften des NPC-Transportes angeben, die bisher als allgemeingültig akzeptiert sind. Dazu zählen:

1. Unidirektionalität
2. Energieabhängigkeit
3. Selektivität

Die Unidirektionalität des Transportes bezeichnet die Unfähigkeit zur sofortigen Umkehr der Transportrichtung, da ein bereits transportierter Export- oder Importkomplex aufgrund der stattfindenden Dissoziation nicht auf demselben Weg wieder rücktransportiert werden kann. Gleichzeitig sind alle aktiven Transportprozesse energieabhängig, da die meisten Substrate gegen eine hohe zelluläre Proteinkonzentration transportiert und im jeweiligen Kompartiment angereichert werden müssen. Die aus Stoffwechselfvorgängen stammende Energie wird dabei im GTP-bindenden Ranprotein gespeichert und steht in Form eines RanGTP/GDP-Gradienten dem System zur Verfügung, wobei RanGTP im Nukleoplasma und RanGDP im Cytoplasma lokalisiert ist. Die dritte Eigenschaft, die Selektivität, wird erreicht, indem, wie oben bereits beschrieben, alle größeren Substrate, die nicht passiv durch die Pore diffundieren, nur dann transportiert werden, wenn sie eine NLS oder NES als Markierung für die jeweiligen Transportrezeptoren enthalten. Des Weiteren erreichen sogenannte Adapterproteine, die vor dem Translokationsvorgang wirken, dass der Transport der jeweiligen Substrate, sei es Protein oder RNA, reguliert und kontrolliert wird. Diese vorgelagerten Kontroll- und Regulationsprozesse erhöhen damit auch die intrinsische Selektivität des Kernporenkomplexes.

2.2.1. „Selective Phase“

D. Görlich und *K. Ribbeck* formulierten 2001 zum ersten Mal das Modell der „Selective Phase“.^{87,88} In Experimenten mit digitonisierten Zellen konnten sie zeigen, dass ein NTF2-Dimer, ein kleiner, nur 29.5 kDa großer Transportrezeptor für Ran, zwar an die FG Nukleoporine bindet, aber dennoch deutlich langsamer mit einer Translokationsrate von 250 Molekülen pro NPC pro Sekunde durch den Kanal diffundiert, als wenn dieser nur mit einer wässrigen Lösung gefüllt wäre. Theoretisch läge die Translokationsrate für einen wässrigen Kanal mit 40 nm Durchmesser bei 850 Molekülen pro Pore pro Sekunde, jeweils berechnet für ein gleich großes Protein und bei derselben Konzentrationsdifferenz von 1 μ M.⁸⁷

Ausgehend von dieser experimentellen Beobachtung schlossen *D. Görlich* und *K. Ribbeck* auf ein homogenes Medium im Innern des zentralen NPC-Kanals, das wie ein Gel die Geschwindigkeit von inerten Molekülen einer bestimmten Größe vollständig hemmt und von bindenden Transportrezeptoren verlangsamt. Die siebartige Gelstruktur sollte durch hydrophobe Wechselwirkungen zwischen gegenüberliegenden oder benachbarten

FG-Sequenzen erzeugt werden, da diese aufgrund der erwähnten ungefalteten Sekundärstruktur ausreichend flexibel sind, um solche Interaktionen einzugehen. Diese werden als sehr schwach angesehen, mit Dissoziationskonstanten im millimolaren Bereich, da die Konzentration der Phenylalanin-Glycin-Wiederholungen bei etwa 50 mM liegt. Demnach wäre es für einen Transportrezeptor durchaus möglich, mit seiner FG-bindenden Domäne diese FG-FG Wechselwirkungen während der Diffusion durch den Kernporenkomplex zu unterbrechen, so dass er in der gelartigen Phase gelöst wird, woraus sich der Name dieses Modells ableitet. Dabei muss sich das Gel direkt hinter dem jeweiligen Transportsubstrat durch Ausbildung neuer FG-FG Interaktionen wieder schließen, um zu verhindern, dass Substrate, die nicht transportkompetent sind, zusammen mit den aktiv transportierten Proteinen durch den NPC schlüpfen. Genau darin liegt jedoch die Schwäche dieses Modells, denn es erklärt nicht wie in einer Zelle trotz dieser FG-Bindungen eine so hohe Anzahl an Proteinen, RNA-Protein Komplexen und Ribosomen, transportiert werden kann. *K. Ribbeck* und *D. Görlich* selbst schätzen den gesamten Massefluss pro NPC auf etwa 100 MDa/s,⁸⁷ während *A.E. Smith* aus einem systemanalytischen Modell allein nur für das Ran-Protein einen bidirektionalen Fluss von 260 Molekülen pro NPC pro Sekunde¹⁰² berechnete.

Zwar sprechen *D. Görlich* und *K. Ribbeck* von einer hohen Dynamik der FG-FG Interaktionen in einer Zeitskala von 100 μ s,²⁴ erklären jedoch nicht, wie diese Vorstellung mit einigen experimentellen Ergebnissen zu Translokationsraten und Bindungsaffinitäten einiger Rezeptoren zu vereinbaren ist. Die Affinität vieler Karyopherine für FG-Sequenzen liegt beispielsweise im nanomolaren Bereich.^{85,122} Sie müssten folglich bei einer nukleären Konzentration im mikromolaren Bereich vollständig gesättigt sein. Gleichzeitig liegen die höchsten experimentell bestimmten molekularen Flussraten bei mehreren 100 Molekülen pro NPC pro Sekunde,^{87,100} so dass von parallelen Transportprozessen ausgegangen werden muss. Deshalb haben *S. Frey* und *D. Görlich* nach Experimenten mit einem Hydrogel aus einem rekombinant hergestelltem Nsp1 Nukleoporin³⁶ ihr Modell so angepasst, dass Translokationszeiten von 10 ms für Importin- β -Cargo Komplexe möglich werden. Dafür müssen die Transportrezeptoren über eine assoziierte Zwischenstufe mit niedrigerer Aktivierungsenergie die Auflösung der hydrophoben Phenylalanin-Wechselwirkungen im Gel beschleunigen. Dies beantwortet jedoch nicht, wie angesichts der hohen Transportleistung des NPCs hydrophobe FG-FG Interaktionen zur Ausbildung eines Gels weiterhin aufrechterhalten werden können. Zudem erscheint die verwendete Konzentration des Hydrogels von 26 mg/ml aus FxFG-Domänen des Nsp1 relativ hoch, denn in *Saccharomyces cerevisiae* konnte, wie bereits erwähnt, die Gesamtmasse der FG-Bereiche teilweise fast um die Hälfte reduziert werden ohne Auswirkungen auf die Vitalität der Zellen zu haben.¹⁰⁷

2.2.2. „Virtual Gating“

Das Modell des „Virtual Gating“, auch bekannt als „Entropic Exclusion“, wurde von *M.P. Rout* entwickelt⁹² und beruht im wesentlichen auf einer energetischen Betrachtung des Translokationsmechanismus. Es wird davon ausgegangen, dass der NPC aufgrund

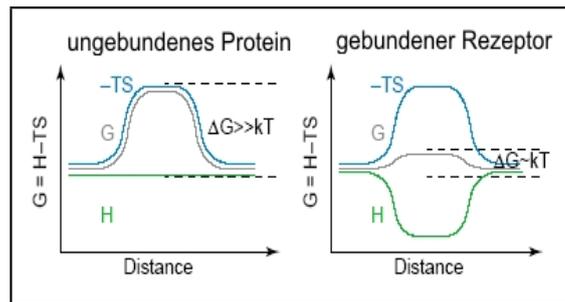


Abb. 2.2.: Energieschema in Abhängigkeit der Reaktionskoordinate, hier NPC-Länge dargestellt ist der Verlauf der freien Gibbs-Energie G , der Enthalpie H und der Entropie TS links: inertes, nicht bindendes Protein; rechts: bindender Transportrezeptor (entnommen aus *Rout M.P.*⁹²)

seines engen Kanals, der in hoher Dichte von FG-Schleifen durchzogen ist, nicht nur wie eine mechanische, sondern auch wie eine energetische Barriere wirkt. Denn jedes transportierte Molekül wird während der Translokation durch den NPC-Kanal in seinen translatorischen Freiheitsgraden eingeschränkt. Dies führt gemäß der statistischen Thermodynamik zu einer Reduktion der Entropie oder anders gesagt, Moleküle, die sich durch den Kernporenkomplex bewegen müssen, zahlen einen energetischen Preis, der mit der Größe des Moleküls ansteigt. Ist die Entropieänderung des isoliert betrachteten Translokationssystems negativ, d.h. erniedrigt sich die Entropie während der Translokation, so ergibt sich eine positive Gibbs-Energie, sofern sich die Enthalpie H als im System zur Verfügung stehende Energie nicht ändert. Genau dieser Zustand wird für ein passives Substrat erreicht, welches nicht mit den FG-Regionen interagiert, da in diesem Fall keine Bindungsenergie frei wird. Dagegen erreichen Transportrezeptoren durch ihre Bindung an FG-Nukleoporine und der daraus folgenden Energiefreisetzung eine negative Enthalpieänderung, so dass sich schließlich in summa die Gibbs-Energie im isolierten System des NPC-Kanals stark erniedrigt und eine Translokation energetisch begünstigt wird. Abbildung [2.2] verdeutlicht die beschriebene energetische Situation im Kernporenkomplex in Abhängigkeit von der jeweiligen Molekülposition ausgehend vom Eingang bis zum Ausgang der Pore.

Gleichzeitig spricht *M.P. Rout* in Anlehnung an enzymatische Reaktionen davon, dass die Kernpore wie ein Katalysator funktioniert. Sie erniedrigt über Bildung eines sogenannten Translokationszwischenzustands die Aktivierungsenergie für die Bindung der Transportrezeptoren an die FG-Nukleoporine. Diese Bindung darf jedoch nicht zu stark ausfallen, um ein Abdissoziieren von den FG-Bereichen und somit eine Diffusion des Transportrezeptors durch den NPC-Kanal zu ermöglichen. Ob in diesem Fall die freigesetzte Bindungsenergie ausreicht, um den Entropieverlust auszugleichen, wird nicht ausreichend geklärt. Ebensovienig wird berücksichtigt, dass eventuell auch die Hydrathülle um den Transportrezeptor und das Substrat entfernt werden muss, sofern diese in einer Umgebung mit sehr hoher Proteinkonzentration bzw. Moleküldichte und in Anwesenheit von Ionen noch vorhanden ist. Später erweiterte *R.Y.H. Lim*⁶⁷ das Modell, indem er annahm, dass die FG-Regionen der Nukleoporine sich wie langkettige Poly-

mere verhalten, die an einem Ende auf einer Oberfläche befestigt sind. Dies schloss er aus Rasterkraftmessungen, die neben einer sterischen Abstoßung ein elastisches Verhalten zeigten, welches Polymeren mit einer „Polymer Brush“-Konformation d.h. einer bürstenähnlichen Anordnung ähnelt. Denn der Abstand s zwischen zwei auf Gold immobilisierten Nup153 Ketten war kleiner als der doppelte End-zu-End Abstand, berechnet aus der Kontour- und Persistenzlänge („Worm-like chain modell“), was dem Kriterium für die „Polymer Brush“-Konformation entspricht. Gleichzeitig kollabierten diese FG-Filamente von Nup153 nach Zugabe von Hexandiol und nach Temperaturerniedrigung, was bereits *in vivo* an Kernporenkomplexen beobachtet werden konnte, deren Permeabilität nach Temperaturänderung und bei Zugabe von Alkoholen verändert wurde.^{67,88} Weitere Messungen mit Karyopherin- β 1 (Importin- β) ergänzten dieses Modell, wobei bereits bei 33 nM Karyopherin- β 1 Konzentration die FG-Filamente von Nup153 zum Kollabieren brachten, so dass sich eine verdichtete Struktur bildete. Wie bereits erwähnt sollte der Kernporenkomplex bei einer zellulären Karyopherin-Konzentration im mikromolaren Bereich, beispielsweise $3 \mu\text{M}$ für Importin- β ,⁸⁹ und einem K_D -Wert im nanomolaren Bereich vollständig gesättigt sein. Demnach wäre keine „Polymer Brush“-Konformation mehr möglich, da die gestreckten FG-Filamente zu einem dichteren Netzwerk kollabiert wären.

2.2.3. „Affinity Gradient“

Das „Affinity Gradient“-Modell entwickelte sich nach Experimenten von *I. Ben-Efraim* und *L. Gerace*,¹⁰ die anhand von Bindungsstudien zeigen konnten, dass die Affinität von Importin- β für Nukleoporine ausgehend von den Filamenten (Nup358) über den zentralen Kanal (Nup62, Nup58, Nup54) bis zum nukleären Korb (Nup153) kontinuierlich zunimmt. Die Dissoziationskonstanten wurden durch Titration immobilisierter Nukleoporine mit steigenden Konzentrationen an Importin- β und anschließendem Elisa-Antikörpertest bestimmt und stiegen von 210-225 nM über 100-105 nM bis auf 9 nM an. Gebundene Transportrezeptoren, die überwiegend zur gleichen Strukturfamilie wie das Importin- β gehören (siehe hierzu auch Abschnitt [4]) würden somit auf ihrem Weg durch den NPC von einer FG-Region mit niedriger Affinität zu einer benachbarten FG-Region mit höherer Affinität weitergereicht. Weitere Experimente mit Karyopherin 95 (Kap95) aus *Saccharomyces cerevisiae* bestätigen die Vorstellung eines Affinitätsgradienten innerhalb des Kernporenkomplexes. Denn Kap95 als Importrezeptor zeigte eine um den Faktor 4000 reduzierte Affinität für die Nukleoporine der cytoplasmatischen Filamente im Vergleich zu den Nukleoporinen des nukleären Korbes.⁸⁵ Trotz einiger Hinweise, die diese Theorie stützen, widersprechen die bereits mehrfach genannten Experimente von *L.A. Strawn*¹⁰⁷ dem „Affinity Gradient“-Modell. Hiernach sollen sich eine Vielzahl der asymmetrisch lokalisierten Nukleoporine an den Filamenten und im Bereich des Korbes entfernen lassen, ohne dass sich dies auf die Vitalität der jeweiligen Hefen auswirkt.

2.2.4. „Reduction of Dimensionality“

Das ROD-Modell („Reduction of Dimensionality“)⁷⁹ von *R. Peters* trägt vielen der bereits genannten experimentellen Ergebnissen Rechnung, sowohl der theoretischen Sättigung der FG-Nukleoporine mit Karyopherinen bei deren nanomolarer Bindungsaffinität,⁸⁵ als auch der großen Transportkapazität der NPCs und der hohen Translokationsgeschwindigkeiten.^{87,100} Beispielsweise liegen die molekularen Flussraten für Ntf2 im Bereich von 1500 Dimeren pro NPC pro Sekunde^{79,100} bei einer Konzentrationsdifferenz von $14.8 \mu\text{M}$, die im Vergleich zu den zellulären Konzentrationen als relativ gering angesehen werden kann. Angesichts der hohen Dichte an FG-Regionen von mehreren tausend entlang des gesamten Kernporenkomplexes wird von einem mittleren Abstand von etwa 3 nm ausgegangen.⁷⁹ Die FG-Motive bilden sozusagen eine Art hydrophobe phenylalaninreiche Oberfläche, auf der die Transportrezeptoren mit ihren FG-Bindestellen entlang gleiten und dabei ständig an FG-Bereiche gebunden bleiben. Dies reduziert die dreidimensionale Brownsche Molekularbewegung (Random-Walk) der Proteine in Lösung um eine Dimension, so dass sich die Transportrezeptoren mit einem zweidimensionalen „Random-Walk-Mechanismus“ auf dieser Oberfläche entlang bewegen. Nach diesem Modell würden die Transportrezeptoren im molekularen Sinne nicht unidirektional d.h. nicht vorwiegend in eine Richtung durch den NPC wandern, sondern den jeweiligen Ausgang des Kanals zufällig finden, wie auch bei *A. Zilman*¹²² angedeutet. Mikroskopisch findet sozusagen eine ungerichtete zweidimensionale Diffusion auf der FG-Oberfläche statt, die makroskopisch betrachtet aufgrund des nukleocytoplasmatischen RanGTP/GDP Gradienten dennoch eine bevorzugte Richtung erhält. Denn ein im Nukleus in Anwesenheit von RanGTP gebildeter Exportkomplex kann nur im Cytoplasma durch die RanGAP-vermittelte GTP-Hydrolyse aufgelöst werden. Zudem bewirken terminale hochaffine Bindestellen an den Ausläufern der FG-Oberfläche, wie z.B. das Nup1 am nukleären Korb ein Einfangen der zufällig diffundierenden Moleküle an einem der Ausgänge. Wie die FG-Oberfläche genau aussieht, wird in diesem Modell nicht erklärt, so dass durchaus eine Kombination aus Gel und Oberfläche denkbar wäre. Denn eine stark verdichtete Oberfläche ohne die flexiblen ungefalteten FG-Regionen, die in den Kanal ragen, würde den effektiven Porendurchmesser stark vergrößern und somit auch die Ausschlussgrenze für den NPC verändern. Allerdings wird durch die Vorstellung einer FG-Oberfläche der Widerspruch bei einigen Transportexperimenten gelöst, dass ein an die FG-Nukleoporine gebundenes Protein schneller den NPC durchquert als ein vergleichbares inertes Protein. Beispielsweise konnte für ntf2, den Ran-Transporter mit zwei Bindestellen für FG-Nukleoporine, eine um einen Faktor 125 erhöhte Translokationsrate ermittelt werden, als für das fast gleich große, inerte GFP-Kontrollprotein.⁸⁷

Trotz signifikanter Unterschiede haben alle Modelle Eines gemeinsam: Sie beschreiben den nukleocytoplasmatischen Transport mit Hilfe einer statischen Vorstellung vom Innern des NPC-Kanals. Tatsächlich jedoch laufen in einer Zelle viele Vorgänge und Transportprozesse parallel, so dass auch von einer hohen Dynamik innerhalb des NPC ausgegangen werden muss, die aufgrund ihrer Komplexität nur schwer durch ein einzelnes Modell beschrieben werden kann. Selbst Computersimulationen, die für dynamische Prozesse besonders geeignet erscheinen, können sich dem tatsächlichen Mechanismus

nur annähern.^{9,122} Es bleibt abzuwarten, ob eine verbesserte Technik bei Einzelmolekülmessungen sowie höher auflösende Mikroskope zusammen mit systemanalytischen Berechnungen einen tieferen Einblick in das Innere des NPCs erlauben, um ein verfeinertes Modell des Translokationsmechanismus aufzustellen.

3. Optische Einzeltransporter Analyse (OSTR)

In dieser Arbeit wurde die von *M. Tschödrich-Rotter* und *R. Peters* 1998 entwickelte OSTR-Methode¹¹³ zur Analyse von Molekülströmen durch Membranporen, Kanäle und Transporter verwendet, um den Transport durch den Kernporenkomplex quantitativ zu charakterisieren. Dies trägt letztendlich zu einem weitreichenderen Verständnis der zu Grunde liegenden zellulären Vorgänge des Kern-Cytoplasma Transportes bei. Der nukleocytoplasmatische Transport kann im Wesentlichen in drei Stufen unterteilt werden, die in Abbildung [3.1] ebenfalls dargestellt sind. In der ersten Stufe bindet der Exportkomplex, vermittelt durch ein Transportin, an die Phenylalanin reichen Regionen der Kernporenproteine ($T_R \rightarrow T_B$), anschließend diffundiert der gebundene Exportkomplex durch den NPC-Kanal. In der dritten Stufe löst sich im Zuge der RanGTP-Hydrolyse die Bindung an den NPC ($T_R \rightarrow T_{TC}$) und die einzelnen Komponenten des Exportkomplexes dissoziieren.

Die Dissoziation von der terminalen Bindestelle am NPC ist in dieser Betrachtung geschwindigkeitsbestimmend, jedoch wird vermutet, dass die Bildung eines transportkompetenten Komplexes noch langsamer verläuft. Bei allen hier gezeigten Transportmessungen werden alle benötigten Proteine und Cofaktoren mindestens 10 min vor der Zugabe gemischt, so dass sich der jeweilige Transportkomplex bereits gebildet hat. Wie in Abbildung [3.1] zu sehen, setzt sich die makroskopisch in den Vertiefungen („Test Chambers“, TCs) gemessene Kinetik aus einzelnen Reaktionsschritten mit jeweiligen Bindungsgleichgewichten zusammen. Die Diffusion innerhalb der TCs bis zur confokalen Ebene kann nach den Vorarbeiten von *N.I. Kisikin*⁵⁸ vernachlässigt werden, sofern sowohl große Vertiefungen, wie beispielsweise die hier verwendeten konischen Polykarbonat-Messarrays mit 50 μm Durchmesser und 50 μm Tiefe, als auch ausreichend langsame Flussraten im Bereich von < 5 Molekülen pro NPC pro Sekunde und 1 μM Konzentrationsdifferenz vorliegen. In diesem Fall unterscheiden sich die ermittelten Ratenkonstanten mit und ohne Berücksichtigung der Diffusion innerhalb der TCs nur geringfügig.⁵⁸ Damit werden bei den in dieser Arbeit durchgeführten Messungen nur diejenigen Prozesse miteinbezogen, die unmittelbar den nukleocytoplasmatischen Transport betreffen.

Das Reservoir oberhalb der isolierten Kernmembran ist mit einer Tiefe von 3.8 mm und einem Volumen von etwa 25 μl im Vergleich zu den TCs mit einer Tiefe von 50 μm und einem Volumen von nur 64.1 pl relativ groß, so dass die Diffusion zur Membran d.h. zu den Kernporen geschwindigkeitsbestimmend wäre. Allerdings wird diese Problematik umgangen, indem die Dichte der Transportlösung durch Zugabe von 100 mM Saccharose (siehe Abschnitt [10.5]) soweit erhöht wird, dass sich direkt nach Zugabe eine breite Schicht mit Transportsubstraten oberhalb der Membran bildet. Bei der Durchführung der Transportexperimente in dieser Arbeit, in Anlehnung an die OSTR-Methode nach

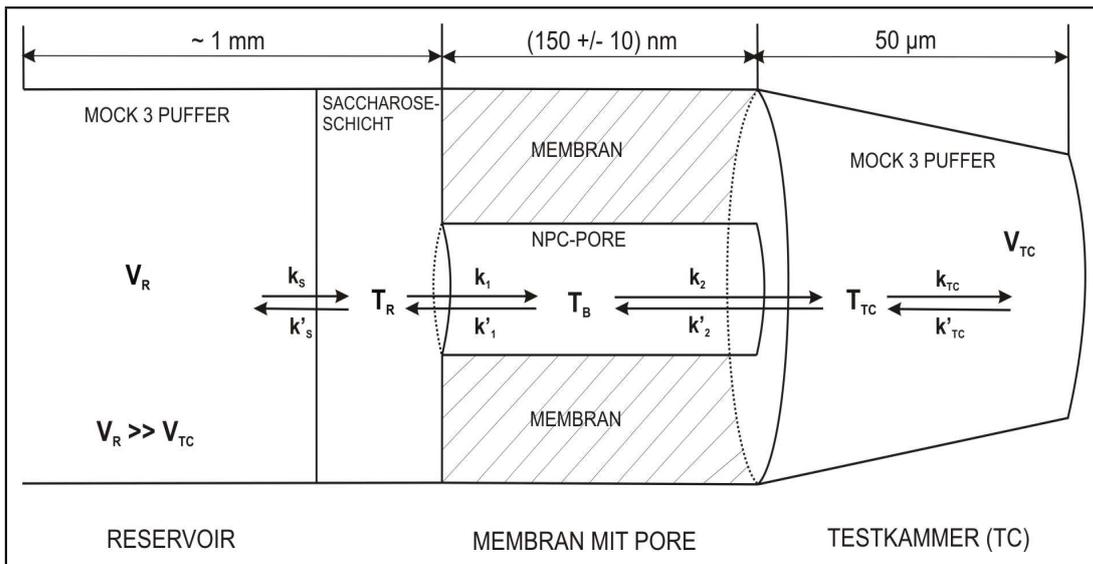


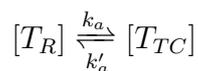
Abb. 3.1.: Reaktionsgleichgewichte während eines typischen nukleocytoplasmatischen Transportexperiments

Darstellung nicht maßstabsgetreu; Index(R) steht hier für das Pufferreservoir über der isolierten Kernmembran, Index(TC) für den Bereich der Vertiefung (Test Chamber), in der die confokale Ebene des Mikroskops $20\ \mu\text{m}$ unterhalb der Membranoberfläche positioniert wird, Index(B) für die gebundene Fraktion des jeweiligen Transportrezeptors T, teilweise im Komplex mit Substrat und RanGTP

R. Peters,^{78,80,113} wird die Fluoreszenzintensität eines markierten Transportrezeptors oder eines Substrates detektiert.

Die Konzentration des im NPC-Kanal gebundenen Transportins $[T_B]$ ist im Gegensatz zu den Konzentrationen der jeweiligen Moleküle im Reservoir oder im TC experimentell nicht zugänglich. Eine quantitative Analyse des Kerntransports kann somit nur erreicht werden, wenn die Änderung der Konzentration des markierten Transporters in den TCs detektiert wird. Zur Vereinfachung der molekularen Reaktionen wird eine apparente Geschwindigkeitskonstante k_a definiert, die sich aus den jeweiligen Konstanten der Hin- und Rückreaktionen k_1 , k'_1 und k_2 , k'_2 zusammensetzt. Wie bereits erwähnt wird dabei angenommen, dass für die Hinreaktion k_2 und die Rückreaktion k'_1 als geschwindigkeitsbestimmende Schritte gelten, da das Abdissoziieren von den FG-Nukleoporinen langsamer ist als die vorangegangene Bindung.

Der Transportprozess durch den NPC kann deshalb wie folgt beschrieben werden:



Das oben dargestellte Schema entspricht somit einem Zweikompartimentsystem. Dies zeichnet sich dadurch aus, dass eine dünne, semipermeable Membran mit Poren d.h. die *Xenopus laevis* Kernmembran mit den NPCs, zwei Kompartimente, wie das Reservoir

und die Vertiefungen, voneinander trennt. Es ergibt sich nun für die zeitliche Änderung der Konzentration der Transportine bzw. der Transportkomplexe $d[T_{TC}]/dt$ folgender Zusammenhang:

$$\frac{d[T_{TC}]}{dt} = k_a \cdot [T_R] - k'_a \cdot [T_{TC}] \quad (3.1)$$

Hierbei handelt es sich um eine homogene Differentialgleichung erster Ordnung, deren Lösung sich aus der Lösung des homogenen Teils plus einer speziellen Lösung der inhomogenen Gleichung ergibt. Der homogene Teil von Gleichung [3.1] lautet:

$$\frac{d[T_{TC}]}{dt} = -k'_a \cdot [T_{TC}] \quad (3.2)$$

Dieser lässt sich durch Integration einfach lösen und es ergibt sich:

$$\begin{aligned} \frac{d[T_{TC}]}{[T_{TC}]} &= -k'_a \cdot dt \\ \int_{[T_{TC}]_0}^{[T_{TC}]_t} \frac{1}{[T_{TC}]} \cdot d[T_{TC}] &= \int_0^t -k'_a \cdot dt \\ \ln [T_{TC}]_t - \ln [T_{TC}]_0 &= -k'_a \cdot t \\ \ln \left(\frac{[T_{TC}]_t}{[T_{TC}]_0} \right) &= -k'_a \cdot t \\ [T_{TC}]_t &= [T_{TC}]_0 \cdot e^{-k'_a \cdot t} \end{aligned} \quad (3.3)$$

Durch Variation der Konstanten $[T_{TC}]_0$ kann die spezielle Lösung der gesamten inhomogenen Gleichung [3.1] erhalten werden. Hierzu wird folgender Ansatz gewählt:

$$[T_{TC}]_t = g(t) \cdot e^{-k'_a \cdot t} \quad (3.4)$$

Nach Differenzierung von Gleichung [3.4] wird das Ergebnis für $d[T_{TC}]/dt$ in Gleichung [3.1] eingesetzt und man erhält:

$$\begin{aligned} \frac{dg(t)}{dt} \cdot e^{-k'_a \cdot t} + g(t) \cdot (-k'_a) \cdot e^{-k'_a \cdot t} &= k_a \cdot [T_R] - k'_a \cdot [T_{TC}] \\ \frac{dg(t)}{dt} \cdot e^{-k'_a \cdot t} + \frac{[T_{TC}]}{e^{-k'_a \cdot t}} \cdot (-k'_a) \cdot e^{-k'_a \cdot t} &= k_a \cdot [T_R] - k'_a \cdot [T_{TC}] \\ \frac{dg(t)}{dt} \cdot e^{-k'_a \cdot t} &= k_a \cdot [T_R] - k'_a \cdot [T_{TC}] + k'_a \cdot [T_{TC}] \\ \frac{dg(t)}{dt} &= \frac{k_a \cdot [T_R]}{e^{-k'_a \cdot t}} = k_a \cdot [T_R] \cdot e^{k'_a \cdot t} \end{aligned} \quad (3.5)$$

3. Optische Einzeltransporter Analyse (OSTR)

Unter der Annahme, dass sich die Konzentration der fluoreszenzmarkierten Substrate im Reservoir nicht signifikant ändert, weil im Vergleich zur Gesamtkonzentration nur geringe Mengen an Molekülen in die TCs transportiert werden, so kann die Konzentration $[T_R]$ als konstant und von der Zeit t unabhängig betrachtet werden. Es gilt also:

$$\begin{aligned} \int_{g(t)_0}^{g(t)} dg(t) &= k_a \cdot [T_R] \cdot \int_0^t e^{k'_a \cdot t} \cdot dt \\ g(t) - g(t)_0 &= k_a \cdot [T_R] \cdot \left(\frac{1}{k'_a} \cdot e^{k'_a \cdot t} - \frac{1}{k'_a} \cdot e^{k'_a \cdot 0} \right) \\ g(t) - g(t)_0 &= \frac{k_a}{k'_a} \cdot [T_R] \cdot (e^{k'_a \cdot t} - 1) \\ g(t) &= \frac{k_a}{k'_a} \cdot [T_R] \cdot (e^{k'_a \cdot t} - 1) + g(t)_0 \end{aligned} \quad (3.6)$$

Gleichung [3.6] wird nun in die allgemeine Lösung des homogenen Teils [3.4] eingesetzt. Als Lösung der inhomogenen Differentialgleichung erster Ordnung ergibt sich folglich:

$$\begin{aligned} [T_{TC}]_t &= \left[\frac{k_a}{k'_a} \cdot [T_R] \cdot (e^{k'_a \cdot t} - 1) + g(t)_0 \right] \cdot e^{-k'_a \cdot t} \\ [T_{TC}]_t &= \frac{k_a}{k'_a} \cdot [T_R] \cdot (1 - e^{-k'_a \cdot t}) + g(t)_0 \cdot e^{-k'_a \cdot t} \end{aligned} \quad (3.7)$$

Zu Beginn einer Transportmessung befindet sich zum Zeitpunkt $t = 0$ kein Fluoreszenz markiertes Substrat in den TCs und es gilt die Anfangsbedingung $[T_{TC}]$ zum Zeitpunkt $t = 0$ ist Null.

Dies ermöglicht die Bestimmung der Integrationskonstanten $g(t)_0$, wie folgt:

$$\begin{aligned} [T_{TC}](t = 0) &= \frac{k_a}{k'_a} \cdot [T_R] \cdot (1 - e^{-k'_a \cdot 0}) + g(t)_0 \cdot e^{-k'_a \cdot 0} = 0 \\ \Rightarrow g(t)_0 &= 0 \end{aligned} \quad (3.8)$$

Die allgemeine Gleichung für passiven und aktiven Transport durch den Kernporenkomplex lautet somit:

$$[T_{TC}]_t = \frac{k_a}{k'_a} \cdot [T_R] \cdot (1 - e^{-k'_a \cdot t}) \quad (3.9)$$

$$[T_{TC}]_t = A \cdot (1 - e^{-k'_a \cdot t}) \quad (3.10)$$

Für $t \rightarrow \infty$ geht die Transportinkonzentration in den TCs $[T_{TC}]$ gegen den Wert $k_a/k'_a \cdot [T_R]$ und wird somit durch den Quotienten der Geschwindigkeitskonstanten für die

Hin- und Rückreaktion bestimmt. Dies bedeutet, dass das Verhältnis zwischen Export- und Importgeschwindigkeit angibt, ob der Transportkomplex an- oder abgereichert wird. Ist k_a größer als k'_a werden die Transportkomplexe im Vergleich zur Gleichgewichtskonzentration $[T_R]$ in den Membran bedeckten TCs angereichert. Ist jedoch k'_a größer als k_a so werden die Transportkomplexe im Vergleich zur Gleichgewichtskonzentration $[T_R]$ abgereichert. Im Fall einer passiven Diffusion wird keine der beiden Richtungen bevorzugt, so dass sich die Werte der apparenten Geschwindigkeitskonstanten k_a und k'_a gleichen. Gleichung [3.10] vereinfacht sich somit zu:

$$[T_{TC}]_t = [T_R] \cdot (1 - e^{-k \cdot t}) \quad (3.11)$$

Die Konzentration $[T_R]$ entspricht dabei derjenigen Konzentration des Rezeptors die sich direkt zu Beginn einer Messung nach Zugabe der $10 \mu\text{l}$ Transportlösung in der Kammer über der Membran befindet. Sie wird in der bisherigen OSTR-Literatur^{58,78} als maximale Konzentration C_{max} bezeichnet. Experimentell zugänglich ist diese Konzentration nach Erreichen des Fließgleichgewichts über die in den offenen Referenz-TCs gemessene Fluoreszenz, deren Intensität dem Wert von $[T_R]$ bzw. C_{max} nach Verdünnung der Stammlösung in der Messkammer entspricht.

Im Experiment muss zudem davon ausgegangen werden, dass bedingt durch die Autofluoreszenz der Polykarbonatarrays und das Hintergrundrauschen der Photomultiplier ein höherer Hintergrund vorliegt, so dass zu Gleichung [3.10] noch ein Offset addiert werden muss.

Dementsprechend wird für die Auswertung der gemessenen Transportkurven eine allgemeine abfallende monoexponentielle Kurve folgender Form verwendet:

$$\begin{aligned} y &= A - A \cdot e^{-\frac{t}{T}} + y_0 \\ y &= (A + y_0) - A \cdot e^{-\frac{t}{T}} \\ y &= B - A \cdot e^{-\frac{t}{T}} \end{aligned} \quad (3.12)$$

Ein Koeffizientenvergleich mit Gleichung [3.10] ergibt dann:

$$B = A + y_0 = \frac{k_a}{k'_a} + \text{Offset} \quad (3.13)$$

$$T = \frac{1}{k'_a} \quad (3.14)$$

$$A = C_{max} = \frac{k_a}{k'_a} \cdot [T_R] \quad (3.15)$$

Die genannte Fitfunktion [3.12] kann sowohl zur Beschreibung von Export- als auch Importexperimenten herangezogen werden, da sie eine allgemeingültige Form besitzt, aus der sich jeder Spezialfall ableiten lässt. Die passive Diffusion als ein Spezialfall ist,

3. Optische Einzeltransporter Analyse (OSTR)

wie bereits erwähnt, charakterisiert durch gleiche Import- und Exportraten, so dass für $k_a = k'_a$ der exponentielle Vorfaktor A der Konzentration $[T_R]$ im Reservoir entspricht. Die drei Variablen A, B und T aus Gleichung [3.12] werden durch Annäherung des dazugehörigen Graphen an die experimentell gemessenen Daten bestimmt. Die Ergebnisse können anschließend verwendet werden, um den Molekülfluss durch einen einzelnen NPC zu berechnen, sofern die mittlere Dichte der NPCs auf der Oberfläche und die Länge der Vertiefungen bekannt ist. Allgemein gilt für den mittleren Gesamtfluss Φ durch eine Membran unter der Annahme eines quasistationären schnellen Gleichgewichts:

$$\Phi = P \cdot \Delta C \quad (3.16)$$

P : Permeabilitätskoeffizient
 ΔC : Konzentrationsdifferenz

Dabei setzt sich der Gesamtfluss Φ zusammen aus der Summe der molekularen Flüsse durch jeden einzelnen Kernporenkomplex. Der Permeabilitätskoeffizient als Maß für die Durchlässigkeit einer Membranfläche ist dabei direkt proportional zur Geschwindigkeitskonstanten des Membrandurchtritts.

Gleichung [3.17] lässt sich somit zu einer molekularen Flussgleichung umformen, die direkt mit der Geschwindigkeitskonstanten und dem exponentiellen Vorfaktor A aus dem Fit verknüpft ist:

$$\Phi_{NPC} = P_{NPC} \cdot N_A \cdot \Delta C \quad (3.17)$$

$$= \frac{P \cdot N_A \cdot \Delta C}{\rho_{NPC}}$$

$$= \frac{k'_a \cdot L_{TC} \cdot N_A \cdot [T_R]_0 \cdot \frac{k_a}{k'_a}}{\rho_{NPC}}$$

$$= \frac{L_{TC} \cdot N_A \cdot [T_R]_0 \cdot k_a}{\rho_{NPC}} \quad (3.18)$$

N_A : Avogadro-Konstante, mol^{-1}
 P_{NPC} : molekularer Permeabilitätskoeffizient je NPC
 ρ_{NPC} : NPC-Dichte, typischerweise, $50 \text{ NPC}/\mu m^2$
 k_a, k'_a : Geschwindigkeitskonstante, Hin- und Rückdiffusion, s^{-1}
 $\frac{k_a}{k'_a}$: Anreicherungsfaktor
 L_{TC} : Länge der TCs, μm

Zur Veranschaulichung der Transportexperimentes aus dieser Arbeit seien hier einige typische Werte, wie beispielsweise NPC-Dichte, Membranfläche und TC-Volumen ge-

nannt. Vorausgesetzt wird die Verwendung von *Xenopus laevis* Kernmembranen, sowie 50 x 50 μm großen Vertiefungen mit der Geometrie eines umgedrehten Kegelstumpfes, der eine Oberfläche mit Radius 25 μm und eine Grundfläche mit einem Radius von etwa 20 μm besitzt.

Tab. 3.1.: Typische Größen bei nukleocytoplasmatischen Transportmessungen

<i>Größe</i>	<i>Variable</i>	<i>Wert</i>
Membranfläche pro TC	A_M	1963 μm^2
NPC-Dichte (<i>Xenopus laevis</i>)	ρ_{NPC}	50 NPCs/ μm^2
NPC-Anzahl pro TC	A_{NPC}	98175 NPCs
Länge der TCs (Tiefe)	L_{TC}	50 μm
TC-Volumen	V_{TC}	64.1 x 10 ⁻¹² L
Reservoir-Volumen	V_R	25 x 10 ⁻⁶ L

Zeitaufgelöste Messungen der Fluoreszenzintensität mittels konfokaler Mikroskopie in geeigneten Messvertiefungen unterhalb einer präparierten Kernmembran eignen sich somit zur Bestimmung von Geschwindigkeitskonstanten nukleocytoplasmatischer Transportprozesse und zur Berechnung von mittleren Flussraten durch einen einzelnen NPC. Sie bieten eine optimale Ergänzung zu den bisher bekannten *in vivo* Importmessungen, wie FRAP-Experimente und Digitonin-Assays, oder zu den in Einzelmolekülexperimenten bestimmbaren Verweildauern am NPC.

4. Der Kerntransportrezeptor Crm1

Crm1 wird zur relativ großen Familie der Importin- β Kerntransportrezeptoren gezählt, zu denen sowohl Exportine als auch Importine gehören und die sich durch gemeinsame strukturelle Merkmale auszeichnen. Alternativ wird in der Literatur häufig der Begriff Karyopherine (Kaps) als Synonym für die Importin- β Kerntransportrezeptoren verwendet. Ursprünglich erhielt Crm1 seinen Namen - abgeleitet von Chromosome Region Maintenance 1 - aus der Beobachtung, dass Mutationen des Gens in *Schizosaccharomyces pombe* zu einer veränderten Chromosomenmorphologie im Kern führten.² Nur ein paar Jahre zuvor, im Jahre 1983, hatten Wissenschaftler schließlich das Virus entdeckt, welches durch Befall von Makrophagen und CD4+ T-Lymphozyten die AIDS Immunerkrankung auslöst³⁹ und legten so den Grundstein für eine rege Forschungsaktivität im Bereich retroviraler Infektionen. Infolgedessen konnte Crm1 als Exportrezeptor für das retrovirale Rev-Protein aus HIV-1⁷⁴ und dessen unvollständig gespleißte RNA-Substrate identifiziert werden, was den Anstoß zu der Vermutung gab, dass Crm1 auch als Transportrezeptor für zelluläre Moleküle fungieren könnte. Bisher gilt die Beteiligung des Crm1 Proteins am zellulären Export von unterschiedlichen RNA Molekülen, wie beispielsweise U snRNA³⁴ oder rRNA als Bestandteil der ribosomal Vorstufen pre60S und pre40S^{37,73} und am Export von Proteinen, die eine leucinreiche Exportsequenz enthalten,³⁴ als erwiesen.

Die Richtung des Crm1 Transportes wird wie bei allen Importin- β ähnlichen Rezeptoren bestimmt durch den RanGTP Gradienten, der sowohl Assoziation als auch Dissoziation der Transportkomplexe bewirkt. Vermittelt durch den chromatinassoziierten Nukleotidaustauschfaktor RCC1 und durch das cytoplasmatische und NPC-assoziierte GTPase aktivierende RanGAP liegt im Nukleus vorwiegend RanGTP und im Cytoplasma RanGDP vor. Crm1 kann über seine Ran-Bindestelle nur mit RanGTP, nicht aber mit RanGDP wechselwirken. Es besitzt somit einen Indikator, der ihm anzeigt, in welchem Kompartiment es sich gerade befindet. Gleichzeitig beeinflusst die RanGTP-Interaktion auch die Konformation von Crm1, so dass dieses mit Substraten, die eine leucinreiche NES-Sequenz besitzen, leichter wechselwirkt. In Abbildung [4.1] sind einige typische leucinreiche Kernexportsignalsequenzen, sowie die resultierende Konsensus-Sequenz gezeigt.

Crm1 alleine besitzt eine relativ niedrige Affinität für leucinreiche NES-Sequenzen, so dass die Bildung des Exportkomplexes als geschwindigkeitsbestimmend angesehen wird. Jedoch wird eine Erhöhung der Crm1 Affinität für einzelne Exportsubstrate, sowie auch für Ran, durch das im Kern lokalisierte RanBP3 erreicht,^{27,82} welches die Ran-Bindestelle stabilisiert. Als terminale Bindestelle für den ternären Exportkomplex aus Crm1-RanGTP und NES-Substrat konnte durch RNA-Interferenz-Experimente eindeutig das Nukleoporin Nup214, im Komplex mit Nup88^{11,50,54} identifiziert werden, wo-

HIV Rev (75–83)	LPP-LER-LTL
PKI (37–46)	LALKLAG-LKI
Cyclin B1 (142–151)	LCQAFSD-VIL
MAPKK (32–42)	LQKLEE-LEL
MVM NS2 (82–91)	MTKKFGT-LTI
NMD3 (480–490)	LAEMLED-LHI
S1	LAR-LFSALSV
$\Phi = L, I, V, F \text{ or } M$ $x = \text{any amino acid}$	$\Phi_{x2-3} \Phi_{x2-3} \Phi_x \Phi$

Abb. 4.1.: Typische Beispiele für eine Leucin-reiche NES-Sequenz (aus *Hutten S.*⁵¹) konservierte Positionen mit Leucin oder einer hydrophoben Aminosäure sind gelb unterlegt; MVM NS2 stammt vom NS2 Protein eines Mäusevirus und HIV Rev vom Rev Protein des humanpathogenen HI-Virus, alle weiteren NES-Sequenzen stammen von zellulären Proteinen

bei eine Beteiligung von Nup358⁵¹ aufgrund seiner Ran-Bindestelle und der RanGAP Assoziation ebenfalls diskutiert wird. RanGAP interagiert hierbei über das kovalent gebundene SUMO-1, einem ubiquitinähnlichen Protein, mit dem Nukleoporin Nup358 in den cytoplasmatischen Filamenten, dessen räumliche Nähe zum Exportkomplex die GTP-Hydrolyse beschleunigt.^{54,70} Eine schematische Abbildung des vorläufig postulierten Crm1 Exportzyklus mit allen wichtigen Interaktionspartnern findet sich in Skizze [4.2].

Im Nukleus bildet sich zunächst, vermittelt durch RanBP3, ein ternärer Exportkomplex aus NES-Cargo (N), RanGTP (R) und Crm1 (C), welcher aufgrund der Affinität des Crm1 Rezeptors für die FG-Schleifen der Nukleoporine durch den NPC bis zur terminalen Bindestelle am Nup214-Nup88 Komplex wandert. Eine hochaffine Bindung an Nup88, konnte für das Crm1 jedoch nicht beobachtet werden, so dass vornehmlich Nup214 die Bindung übernimmt. Dort wird die GTP-Hydrolyse entweder in Anwesenheit des RanBP1 durch lösliches RanGAP [Reaktionsweg (i)] oder durch an Nup358 gebundenes RanGAP [Reaktionsweg (ii)] aktiviert, so dass die freigesetzte Hydrolyseenergie in Konformationsänderungen und Dissoziation des Exportkomplexes umgesetzt wird (siehe nachfolgenden Abschnitt [4.1]). Das freigesetzte Crm1 bindet anschließend direkt an Nup358 und erreicht so seinen Reimport in den Kern, um für weitere Exportprozesse zur Verfügung zu stehen. Bisher ist nicht bekannt, dass am Reimport von Crm1 ins Nukleoplasma weitere Transportfaktoren beteiligt sind. *X. Zhang*¹²¹ zeigte mit permeabilisierten MDBK-Zellen, dass für den Import von Crm1, der durch einen Überschuss an Importin- β kompetitiv gehemmt werden konnte, weder Ran noch ATP benötigte wird. Folglich sollte es in der Lage sein, sich alleine, nur aufgrund seiner Affinität für die FG-reichen Bereiche im NPC, zwischen beiden Kompartimenten, dem Nukleoplasma und dem Cytoplasma, hin-und herzubewegen. Im zellulären Kontext muss jedoch verhindert werden, dass Crm1 ohne Beladung d.h. ohne seine RNA- oder Proteinsubstrate den Zellkern verlässt. Dies wird nur möglich, wenn RanGTP im Nukleoplasma, vermittelt durch RanBP3 relativ schnell wieder an das Crm1 bindet, wodurch sich sofort im An-

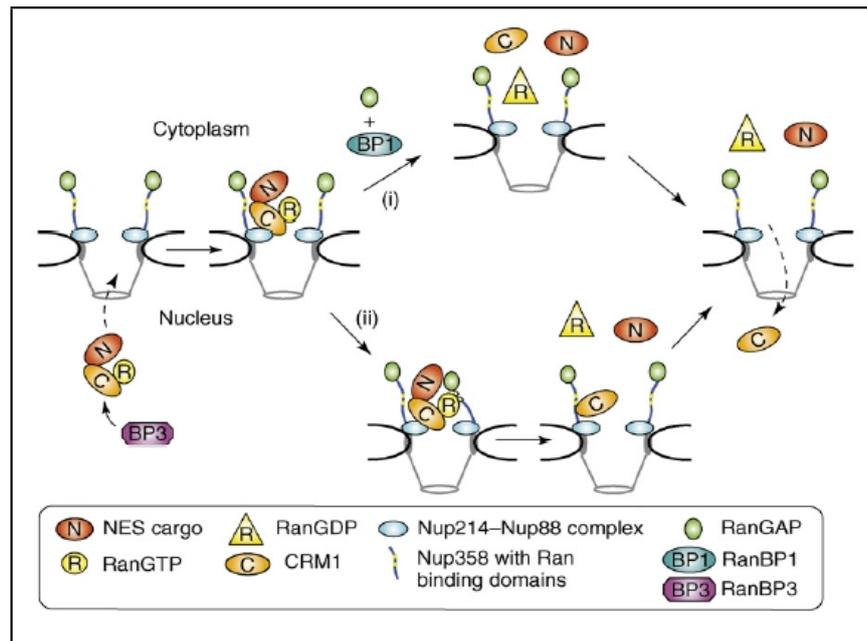


Abb. 4.2.: Skizze des bisher postulierten Exportmechanismus für Crm1-abhängige NES-Substrate (aus *S. Hutten*⁵¹)

schluss ein Exportkomplex mit denjenigen Exportsubstraten bildet, die eine leucinreiche NES besitzen. Ob dies im Detail wirklich so abläuft, bleibt in weiteren Experimenten zu klären.

4.1. Strukturelle Merkmale

Die Struktur des gesamten 123 kDa großen und 1071 Aminosäuren langen Crm1 konnte bisher durch die Röntgenkristallographie nicht aufgeklärt werden. Erst in Kombination mit Homologievergleichen, Computersimulationen und Elektronenmikroskopie ließen sich viele der funktionellen Bereiche auch strukturell aufklären. Crm1 besitzt wie alle Importin- β Rezeptoren 19 HEAT Wiederholungseinheiten bestehend aus 50 Aminosäureresten, die eine Haarnadelstruktur aus zwei antiparallelen α -Helices bilden. Eine schematische Zuordnung der einzelnen HEAT-Regionen ist in Abbildung [4.3] gezeigt.

Die in Abbildung [4.3] angedeutete Schleife aus sauren Aminosäureresten im Bereich der achten HEAT Einheit stellt zusammen mit der N-terminalen CRIME-Region die vorwiegende Bindestelle für RanGTP dar. Eine Region, die teilweise auch an der Erkennung der leucinreichen NES einiger Substrate beteiligt sein könnte, obwohl die Hauptregion für die NES-Erkennung im Bereich der zehnten HEAT Einheit liegt. Dort interagiert das den Export inhibierende Leptomycin B vorwiegend mit einem Cystein an Position 523⁸²

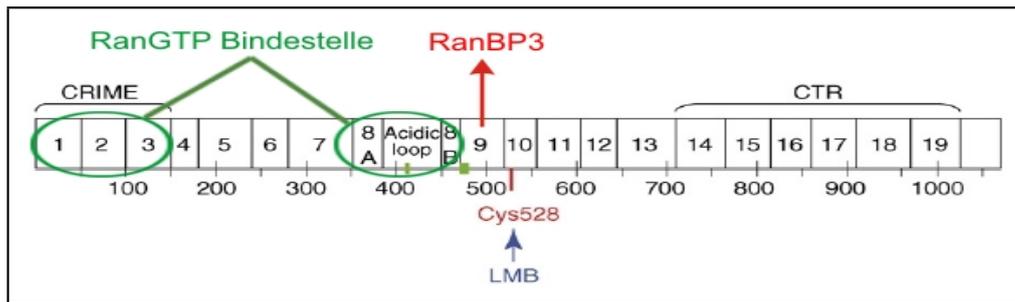


Abb. 4.3.: Schematische Darstellung der 19 HEAT-Motive und deren Funktionalität
 CRIME-Region (Crm1, importin- β) weist hohe Homologie zu Importin- β auf; angegeben sind die RanGTP, sowie RanBP3 Bindestelle; Leptomycin B (LMB) interagiert hier mit Cystein 528 im Bereich der NES-Bindestelle; CTR steht für C-terminale Region (adaptiert nach *S. Hutten*⁵¹)

und verhindert so die Bindung der jeweiligen Substrate. Im Zuge der Strukturaufklärung wird bei *C. Petosa*²⁷ die Wirkung des RanBP3 Proteins diskutiert, das wie oben bereits erwähnt, die Bildung eines ternären Exportkomplexes beschleunigt. Demnach soll RanBP3 zunächst an die helikale HEAT Region 9 binden und von dort aus die benachbarte Ran-Bindeschleife stabilisieren, so dass in positiv kooperativer Weise die darauf folgende RanGTP Bindung begünstigt wird. Gleichzeitig wirkt sich ein gebundenes RanGTP positiv auf die Bindung des jeweiligen Substrates aus, so dass über eine positiv kooperative Bindung die Bildung des ternären Exportkomplexes beschleunigt wird.²⁷ Die GTP-Hydrolyse im Cytoplasma destabilisiert die Ran-Bindeschleife über eine induzierte Konformationsänderung und setzt RanGDP zusammen mit dem Substrat frei, so dass Crm1 für einen erneuten Transportzyklus in den Kern zurückkehren kann. In den folgenden beiden Abschnitten wird an zwei unterschiedlichen Beispielen, einmal dem Export ribosomaler 60S Vorstufen und am Export von retroviraler RRE-RNA, die Wirkungsweise des Crm1 Transportrezeptors nochmals verdeutlicht.

4.2. Export ribosomaler Untereinheiten

Ribosomen sind maßgeblich an der Translation beteiligt, einem Prozess, bei dem die in den mRNAs enthaltene genetische Information in Aminosäuresequenzen und somit in Proteine übersetzt wird. Sie bestehen aus einer großen und kleinen Untereinheit, die bei Eukaryonten aufgrund ihres Sedimentationskoeffizienten, gemessen in Svedbergeinheiten, als 60 S und 40 S Untereinheiten bezeichnet werden. Ihre Vorstufen aus rRNA und Proteinen werden zunächst im Nukleolus gebildet und im Nukleoplasma, bis sie ihre Exportkompetenz erreichen, weiter verändert. Die zahlreichen Stufen, die ein Ribosom bis zu seiner finalen Fertigstellung im Cytoplasma durchläuft, zeugen von einem hochkomplexen Mechanismus an dem eine Vielzahl von nichtribosomalen *trans* wirkenden Cofaktoren (mehr als 150), sowohl vor, während als auch nach dem Export aus dem Nukleus beteiligt sein müssen. Die erste zu isolierende Vorstufe stellt die im Nukleolus

gebildete 90S Einheit dar, die insgesamt vier rRNAs und weitere 80 Proteine enthält. Diese wird als Folge der Spaltung einer rRNA-Vorstufe in eine pre-40S Einheit und eine pre-60S Einheit aufgeteilt, die im Anschluss daran jeweils unterschiedliche Reifungsprozesse im Nukleoplasma durchlaufen, wie in Abbildung [4.4] vereinfacht dargestellt.

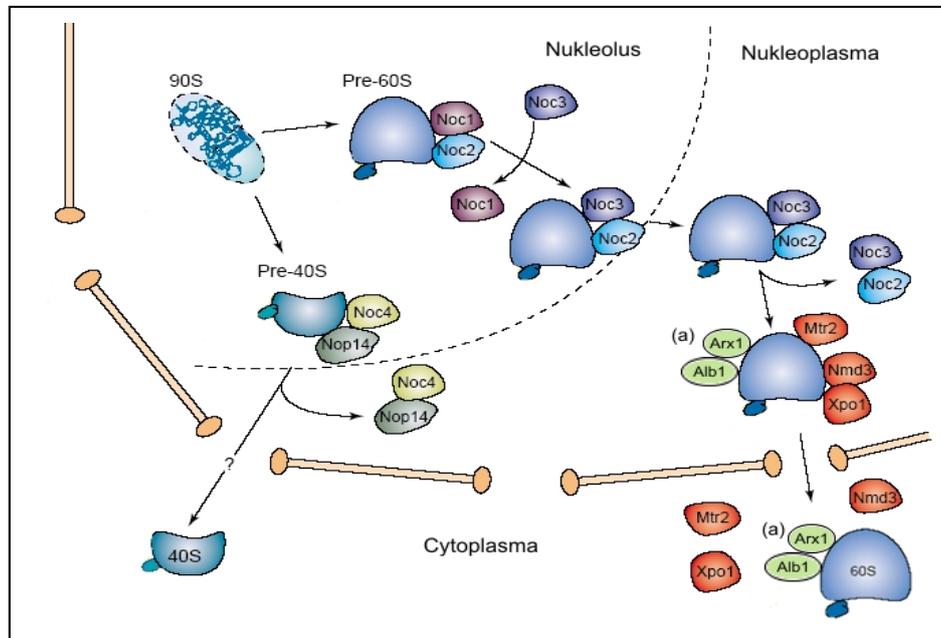


Abb. 4.4.: Exportmechanismus der ribosomalen Vorstufen mit einigen der beteiligten Cofaktoren

Die ribosomalen Vorstufen pre-60S und pre-40S durchlaufen in Nukleolus und Nukleoplasma jeweils getrennte Reifungsprozesse; im Nukleoplasma erreichen die Vorstufen schließlich die Exportkompetenz, so dass im Fall der pre-60S Untereinheit wichtige Transportrezeptoren wie Xpo1, Mex67/Mtr2, sowie der Adapter Nmd3 assoziieren; (a) neu entdeckte zusätzliche Exportfaktoren Alb1 und Arx1, wobei die Exporteigenschaft des Arx1 in dieser Arbeit nachgewiesen werden konnte (adaptiert aus *H. Tschochner und E. Hurt*¹¹²)

In Hefen sind die einzelnen Reifungsprozesse der ribosomalen Vorstufen relativ gut untersucht, da sie in diesem eukaryontischen Organismus über genetische und biochemische Studien besonders leicht zugänglich sind. Zwei Proteine, das bereits beschriebene Xpo1 Protein aus der Importin- β Familie (humanes Homolog Crm1)³⁷ und das Heterodimer Mex67/Mtr2¹¹⁸ aus der Gruppe der Ran-unabhängigen Transportrezeptoren mit Ntf2-Struktur, werden als wichtige Exportrezeptoren für die im Kern assemblierte Vorstufe der großen 60S Untereinheit der Ribosomen beschrieben. Dabei wird durch Bindung des Adapterproteins Nmd3 die Exportkompetenz der pre-60S Einheiten hergestellt, da Nmd3 eine leucinreiche Kernexportsignalsequenz enthält, welche vorwiegend von Xpo1 als Substrat erkannt wird.^{37,44} Selbst ohne die jeweiligen Transportrezeptoren und assoziierten Cofaktoren liegt der Durchmesser der 60S ribosomalen Vorstufe bei etwa 25-30 nm.¹³ Diese enthält ungefähr 39 % Protein und 62 % RNA, bestehend aus einer

3392 Nukleotide langen 25S RNA, einer 158 Nukleotide langen 5.8S RNA und einer 5S RNA aus 121 Nukleotiden. Die pre-60S Untereinheit gehört somit zu den größten Ribonukleopartikeln, die durch den NPC transportiert werden müssen, so dass davon ausgegangen wird, dass sich der NPC-Kanal eventuell weiten muss. Jedoch wäre dies nach den bereits erwähnten nukleocytoplasmatischen Transportversuchen mit NLS-beschichteten Goldpartikeln, die als funktionalen Durchmesser des NPC-Kanals etwa 39 nm⁷⁷ angegeben, nicht zwingend notwendig. In der Literatur werden verschiedene, auch am Export beteiligte Nukleoporine als mögliche flexible Komponenten des NPCs diskutiert. Hierzu zählt in *Saccharomyces cerevisiae* der Nup159-Nup82-Nsp1 Komplex, sowie in *Vertebraten* das Nup214-Nup88 Dimer. Eine Verringerung der zellulären Konzentration des Nup214-Nup88 Komplexes durch Zugabe von shRNA führte zu einer starken Inhibition des Nmd3 vermittelten Exports von ribosomalen 60S-Vorstufe.¹² Dabei konnte festgestellt werden, dass die coiled-coil Region des Nup214 zusammen mit der Nup88 Interaktion am Export der pre-60S ribosomalen Untereinheiten beteiligt ist, wodurch, wie *R. Bernad*¹² vermutet, die Struktur des NPCs verändert wird.

Bei den relativ großen pre-60S Ribonukleopartikeln wird erwartet, dass neben den bereits bekannten Transportrezeptoren, wie Xpo1^{45,73} und Mex67/Mtr2,¹¹⁸ zusätzliche Proteine aktiv am Export mitwirken. Diese zusätzlichen Exportrezeptoren würden nicht nur die Translokationsgeschwindigkeit für einen so großen Komplex entscheidend erhöhen, sondern auch erreichen, dass sich die wegen der eingelagerten rRNAs stark negativgeladenen Partikel ohne großen Energieaufwand durch einen hydrophoben NPC-Kanal transportieren lassen. Wie in Abschnitt [2.2.2] erläutert, spricht *M.P. Rout* von einer hohen energetischen Barriere, die der NPC für die im Nukleoplasma gelösten Proteine darstellt. Jedoch schirmen unterschiedliche Exportrezeptoren nicht nur die Oberflächenladungen ab, sondern können große Riboproteinkomplexe aufgrund unterschiedlicher Nukleoporinaffinitäten auch innerhalb des NPCs orientieren und so den Transport erleichtern. In diesem Zusammenhang war es nicht besonders überraschend, dass mit den hier durchgeführten *in vitro*-Transportmessungen und mit den Ergebnisse aus der Gruppe von *E. Hurt* in Heidelberg der Beweis für Arx1 als einen neuen Transportrezeptor erbracht werden konnte. Das Modell für den Export ribosomaler Vorstufen in Abbildung [4.4] wurde deshalb bereits um das Arx1 Protein als weiteren Exportrezeptor erweitert, das zur Vollständigkeit in Verbindung mit seinem Interaktionspartner Alb1 dargestellt wird.^{13,65,120}

4.2.1. Arx1 Protein

Die Assoziation des Arx1 Proteins mit der späten Entwicklungsstufe der 60S ribosomalen Untereinheit im Nukleoplasma deutet auf seine Beteiligung am Export dieser Vorstufe hin, da auch andere Exportrezeptoren, sowie das Adapterprotein Nmd3 mit seiner NES-Sequenz an dieser späten Entwicklungsstufe gebunden haben.⁷⁵ Jedoch weist Arx1 keine strukturelle Homologie zur Importin- β Familie der Transportrezeptoren auf. Stattdessen konnte bei *B. Bradatsch*¹³ eine hohe Ähnlichkeit zu den Methionin-Aminopeptidasen festgestellt werden, die allerdings keine enzymatische Aktivität bedingt, da dem Arx1

Protein zwei wesentliche Zinkatome fehlten, die bei Methionin-Aminopeptidasen im Bereich des reaktiven Zentrums liegen. In Abbildung [4.5] werden genau diese strukturellen Ähnlichkeiten durch eine vergleichbare Farbkodierung hervorgehoben. Die violetten Zinkatome der gezeigten Methionin-Aminopeptidase weisen das reaktive Zentrum aus und zeigen in schwarz ein gebundenes Methionin.

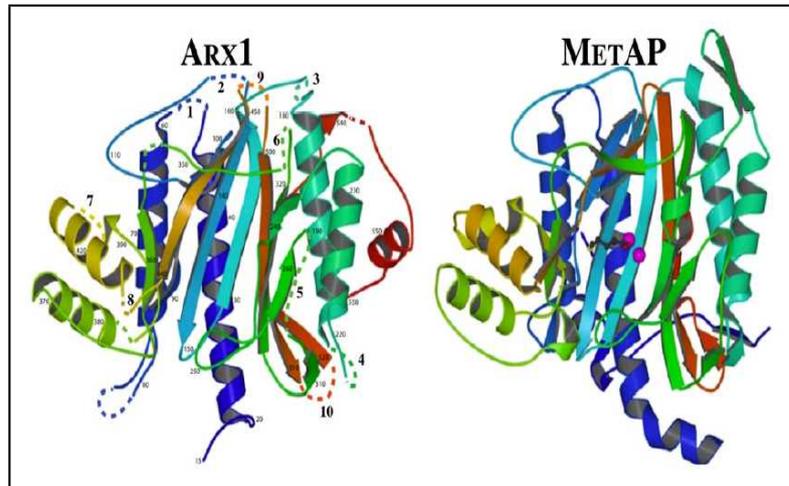


Abb. 4.5.: Strukturvergleich zwischen Arx1 und einer typischen Methionin-Aminopeptidase **links:** Homologiemodell des Arx1 Proteins auf der Struktur des humanen Orthologs Ebp1; **rechts:** Strukturelemente einer Methionin-Aminopeptidase am Beispiel der humanen MetAP2, ebenfalls sichtbar sind die beiden für MetAP-Enzyme typischen Zinkatome (violett) sowie das im aktiven Zentrum gebundene Methionin (schwarz); zur besseren Übersicht sind vergleichbare Strukturen mit gleichen Farben abgebildet (aus B. Bradatsch¹³)

Die Expression von Arx1 ist *in vivo* genetisch verknüpft mit den Genen für weitere am ribosomalen Export beteiligte Proteine wie Mex67/Mtr2 und Nmd3, sowie mit Genen für Nukleoporine wie beispielsweise Nup82, Nup84⁴⁹ und Nup120. Die Beteiligung dieser Nukleoporine am Export der pre-60S Untereinheiten wurde hierbei durch Mutationsstudien mit einem Rpl11p-GFP Reporterprotein¹⁰⁴ nachgewiesen. Des Weiteren findet sich Arx1, ebenso wie Nmd3 und Mex67/Mtr2, nicht nur an denjenigen ribosomalen Vorstufen, die im Nukleoplasma lokalisiert sind, sondern auch an pre-60S Untereinheiten, die sich im Cytoplasma befinden.⁷⁵ Dies stellt einen weiteren Hinweis für die Mitwirkung des Arx1 Proteins am Export dieser ribosomalen Vorstufen dar. Weitere Anhaltspunkte zu dessen Funktion lieferten zahlreiche Bindungsstudien, mit Hilfe von Oberflächenplasmonresonanz, Immunpräzipitation oder Hefe-2-Hybrid Screenings, die eine Interaktion mit ausgewählten Nukleoporinen des NPCs nachweisen konnten.^{13,49} Dazu zählten vor allem Nup100 mit einer Dissoziationskonstante K_D von $1.84 \mu\text{M}$, sowie Nup1¹³ und Nsp1. Die Dissoziationskonstanten für andere Transportrezeptoren wie beispielsweise Importin- β liegen um einen Faktor 10 niedriger im Bereich von $0.1 - 0.2 \mu\text{M}$. Trotz der strukturellen Homologie zu Methionin-Aminopeptidasen und seiner zehnfach reduzierten Bindungsaffinität für Nup100 wurde erwartet, dass Arx1 die hydrophoben Bereiche

der Phenylalanin-Glycin Wiederholungseinheiten im NPC bindet. Der Beweis dafür gelang durch Mutationen innerhalb der Bindetasche von Arx1, die das Wachstum der Hefen stark beeinträchtigten.¹³ Ebp1, das humane Ortholog des Arx1 Proteins, besitzt dagegen keine Affinität für die entsprechenden Nukleoporine aus Vertebraten-NPCs, genauso wenig wie Map1, eine Methionin-Aminopeptidase aus *Saccharomyces cerevisiae*.

4.2.2. Exportmechanismus

Nach dem bisherigen Modell liegt Arx1 im Komplex mit Alb1 zunächst im Nukleoplasma vor und bindet dort im späten Stadium der nukleoplasmatischen Reifung der Ribosomen an die 60S Untereinheiten. Bisher konnte jedoch nicht geklärt werden, wie Arx1 am Ende der nukleoplasmatischen Reifung zur pre-60S Untereinheit rekrutiert wird. Eine Interaktion mit FG-Nukleoporinen innerhalb der Methioninebindetasche bewirkt zusammen mit Mex67/Mtr2 und Crm1-RanGTP den Export des pre-60S Ribonukleoproteinpartikels, in dessen Anschluss Arx1 durch Mitwirkung von Rei1⁴⁸ von der Untereinheit diffundiert. Ein vollständiges Modell zum Reimportmechanismus des Arx1 Proteins existiert allerdings noch nicht. Erste Untersuchungen in Abwesenheit des bereits erwähnten Rei1 wiesen auf eine Beteiligung von Cofaktoren und Importrezeptoren⁶⁵ hin, wie beispielsweise Rei1 oder Kap121, einem β -Karyopherin. In Rei1-defizienten Hefestämmen lag das verwendete Arx1-GFP Fusionsprotein nicht mehr im Komplex mit den pre-60S Untereinheiten im Nukleus vor, sondern war ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert, was auf einen Reimport-Defekt hindeutete.⁶⁵ Zudem werden auch andere am Export der pre-60S Einheiten beteiligte Faktoren wieder reimportiert, wie beispielsweise Nmd3 durch Karyopherin-123.¹¹¹

4.3. Export retroviraler RNA am Beispiel von HIV

Alle Arten von Viren, zu denen auch das Lentivirus HIV-1 aus der Unterfamilie der Retroviren zählt, müssen zu ihrer Vermehrung zahlreiche Barrieren ihrer jeweiligen Wirtszellen, wie Zellmembran, Kernmembran, sowie einige zelluläre Kontrollmechanismen überwinden. Dabei verläuft bei HIV-1 der Viruseintritt in die Zelle über zwei aufeinanderfolgende, kooperative Interaktionsschritte. Im ersten Schritt führt die Interaktion des Oberflächenproteins gp120 des HI-Virus mit dem CD4-Rezeptor auf T-Zellen und Makrophagen zu einer Konformationsänderung des Env Proteins. Diese begünstigt im zweiten Schritt die Bindung an spezifische Corezeptoren auf der Oberfläche der Wirtszellen, wodurch die Transmembrandomäne gp41 des env Proteins von HIV-1 in Form eines sechsfachen Helixbündels exponiert und die Fusion der Virushülle mit der Zellmembran initiiert wird.^{1,25} Zu diesen Corezeptoren werden bisher die Chemokinrezeptoren CCR5 und CXCR4 gezählt. Dabei ist Ersterer besonders essentiell für die HIV-1 Infektion, da Mutationen im CCR5-Rezeptor eine Resistenz gegenüber HIV-1 Infektionen bewirkt.³⁵ Beide Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein gekoppelten Rezeptoren mit sieben typischen Transmembranhelices,³⁵ deren Lokalisation in cholesterin- und sphingolipidreichen Membrandomänen kontrovers diskutiert wird.^{1,38} Nach Fusion der

Virushülle mit der Zellmembran wird das Capsid, welches das RNA-Genom des Virus und zahlreiche Proteine wie beispielsweise die Reverse Transkriptase enthält, in die Zelle abgegeben. Das Capsid besitzt einen Durchmesser von etwa 60 nm, so dass selbst unter der Annahme einer Flexibilität des zentralen NPC-Rings und unter Beteiligung von Karyopherinen kein Transport in den Zellkern möglich sein sollte.^{69,77} Somit wird erst nach Entfernen aller Capsidproteine eine Integration des Virusgenoms in die Wirtszelle als wesentlicher Bestandteil der Virusreplikation erreicht, da HIV-1, im Gegensatz zu Oncoretroviren, T-Zellen und Makrophagen in der Interphase in Anwesenheit einer intakten Kernmembran infiziert.

Der im Zuge der reversen Transkription gebildete Präintegrationskomplex (PIC), bestehend aus dem DNA-Genom des Virus, assoziierten Proteinen und der viruseigenen Integrase,³⁵ wird deshalb aktiv über viruseigene Proteine in den Zellkern transportiert und dort schließlich ins Genom der T-Zelle integriert. Bisher ist dieser Importprozess nicht ausreichend geklärt, jedoch werden Vpr und die im Prä-Integrationskomplex enthaltene Integrase als mögliche Importfaktoren diskutiert. Vpr bindet beispielsweise direkt an den NPC,³⁰ während die Integrase mit dem zellulären Importrezeptordimer aus Importin- α und Importin- β , sowie mit Importin 7 interagiert.^{30,31} Beide Virusproteine enthalten eine für den Import notwendige NLS-Sequenz, obwohl Vpr aufgrund seiner Interaktion mit Nukleoporinen nicht notwendigerweise darauf angewiesen ist. Im Zellkern katalysiert die virale Integrase den Einbau der doppelsträngigen Virus-DNA in das Wirtszellgenom, so dass die Information über den Virusbauplan wie ein zelleigenes Gen abgelesen werden kann.

Die darauffolgende Umstellung des zellulären Stoffwechsels auf die Produktion neuer Viruspartikel endet schließlich mit dem Export der viralen mRNA-Moleküle, die für Viruscapsidproteine kodieren. Dabei lassen sich drei Gruppen von RNA-Molekülen unterscheiden, einerseits ungespleißte mRNA, die für die Proteinvorstufen von Gag und GagPol codieren, andererseits teilweise gespleißte mRNAs von 5 kb Größe, die für weitere Proteine wie Vpr und Env codieren, sowie vollständig gespleißte mRNAs, die Sequenzen der wichtigsten Cofaktoren wie Rev, Tat und Nef enthalten. Jedoch werden zelluläre mRNAs solange durch entsprechende Proteine im Zellkern zurückgehalten, bis alle mRNA-Modifikationen einschließlich des Spleißmechanismus abgeschlossen sind. Deshalb haben Retroviren zur Umgehung dieser Endkontrolle zwei Mechanismen entwickelt, einerseits die direkte Interaktion mit zelleigenen RNA-Exportfaktoren und andererseits die Nutzung eines spezifischen Adapterproteins, welches zwischen Virus-RNA und RNA-Exportfaktoren vermittelt. HIV-1 gehört zu derjenigen Gruppe, die einen Adapter wie das Rev-Protein nutzen, während beispielsweise die RNA des Mason-Pfizer-Monkey Virus über eine spezielle Sekundärstruktur, CTE genannt, direkt mit dem Exportrezeptor Tap/Nxt1 interagiert.

4.3.1. Rev Protein

Das 19 kDa große, 116 Aminosäuren lange Rev-Protein überlappt im HIV-Genom mit der für das Tat-Protein kodierenden Sequenz. Gleichzeitig ist es essentiell für die Virusre-

plikation, da es den Export von allen wesentlichen intronenthaltenden RNA-Molekülen aus dem Kern reguliert. Im Wesentlichen besitzt Rev zwei funktionelle Domänen, eine Bindedomäne für virale mRNA, die eine RRE-Sequenz als spezifische Sekundärstruktur enthält, sowie eine Exportdomäne. Die besonders argininreiche RRE-Binderegion am N-Terminus, die gleichzeitig auch eine NLS-Sequenz für den Import in den Nukleus darstellt, wird an beiden Seiten von einer Homomultimerisierungsdomäne flankiert. Diese bewirkt die für Rev typische Multimerisierung entlang der RRE-Sekundärstruktur, wobei in mehreren *in vitro*-Bindungsassays gezeigt werden konnte, dass ausgehend von einer hochaffinen Bindestelle innerhalb der RRE-Sequenz bis zu acht Rev-Moleküle in kooperativer Weise binden können.^{53,83} *J. Chaitanya* geht aufgrund von Mutationsstudien von einer Serie von symmetrischen Kopf-zu-Kopf oder Schwanz-zu-Schwanz Anordnungen aus, deren Bindung über hydrophobe Seitenketten erfolgt.⁵³ Die am C-terminalen Ende liegende leucinreiche NES der Exportdomäne wird von typischen Transportrezeptoren wie Crm1 erkannt und als Substrat akzeptiert. Dagegen bleibt die NLS als Teil der RNA-Binderegion nur solange für den Importrezeptor Importin- β zugänglich, bis Rev seine viralen RRE-RNA Substrate bindet.⁴² Dies verhindert, dass ein bereits exportiertes Rev-RRE Paar durch Importin- β versehentlich wieder in den Kern zurücktransportiert wird, bevor der Exportkomplex aufgelöst wurde.

4.3.2. RRE-RNA

Bei dem Rev Responsive Element (RRE) handelt es sich um ein 250 Nukleotide langes RNA-Element mit einer ausgeprägten Sekundärstruktur, das aufgrund seiner Lage innerhalb des ENV Gens in allen RNA-Transkripten des HI-Virus enthalten ist. Die RRE-Sequenz faltet innerhalb der viralen Transkripte in eine Abfolge aus Schleifen und Stammregionen, von denen durch Mutagenesestudien die Stammregionen IIB und IID in Abbildung [4.6,links] als essentielle Binderegionen für Rev identifiziert wurden. Die Dissoziationskonstante für einen Komplex aus RRE-RNA der Stammregion IIB, auch als RRE/HH-Fragment bezeichnet, und Rev konnte bei *D.I. Van Ryk* und *S. Ventkatesan* mittels Oberflächenplasmonresonanz mit einem Wert von 10^{-11} M angegeben werden.⁹⁴

Beide Stammregionen bilden die bereits erwähnte hochaffine Bindestelle für Rev, wobei das Rev-Molekül über vier Argininreste mit der erweiterten großen Furche der RRE-Helix wechselwirkt, wie in Abbildung [4.6] zu sehen ist. Diese Argininreste gehören zu einer der beiden gezeigten α -Helices aus der RRE-Binderegion (violett eingefärbt), die miteinander eine sogenannte antiparallele „Coiled-Coil“-Struktur bilden. Die offene Konformation bzw. Weitung der großen Furche um 5 \AA d.h. etwa 0.5 nm innerhalb der hochaffinen Rev-Bindestelle resultiert hierbei aus zwei untypischen Purin-Purin Basenpaarungen, wie einer Guanin-Guanin Paarung (G48-G71), die nicht der normalen Watson-Crick Form entsprechen.⁵³ Die angesprochene Multimerisierung der Rev-Proteine erfolgt anschließend entlang weiterer Bindestellen mit niedrigeren Affinität.

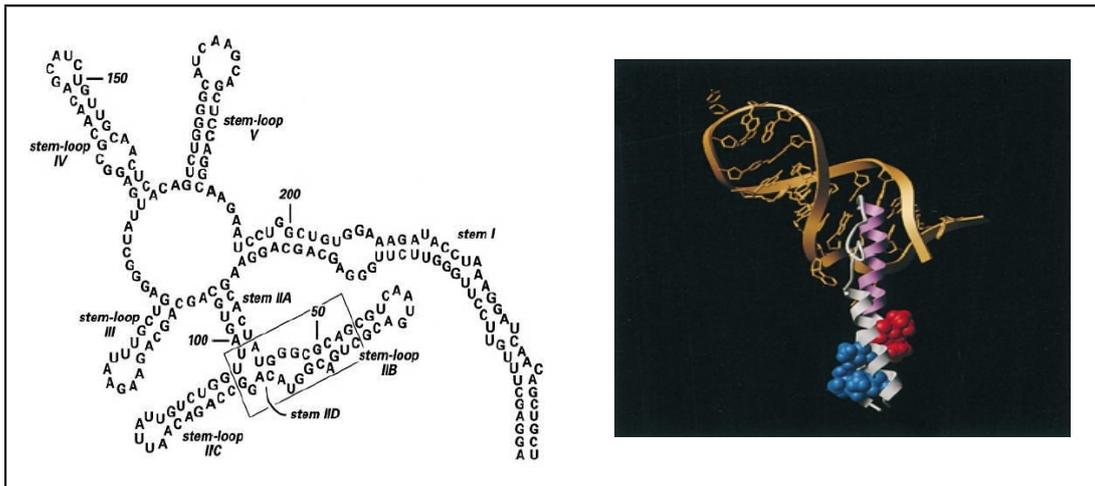


Abb. 4.6.: Sekundärstruktur der RRE-RNA und Interaktion zwischen RRE/HH und Rev-Monomer

links: Stammschleifen der vollständig gefalteten RRE-RNA; **rechts:** große Furche der RRE/HH-RNA (Stammschleife IIB) mit gebundenem Rev-Monomer aus NMR Experimenten; α -Helices der Multimerisierungs- (grau) und RRE-Bindedomäne (violett) als Bänder dargestellt, Aminosäurereste (rot, blau) stehen für multimerisierungsdefekte Mutationen (aus *V. W. Pollard*⁸³)

4.3.3. Postulierter Exportmechanismus für RRE-RNA

Im Laufe der HIV-1 Virusinfektion werden zunächst Transkripte von REV, TAT und NEF aus dem integrierten Virusgenom hergestellt, die wie die mRNA-Transkripte der Wirtszelle vollständig prozessiert werden, bevor sie über den zelleigenen Transportmechanismus ins Cytoplasma gelangen. Dabei werden alle Introns, zusammen mit der auch hier enthaltenen RRE-Sequenz, durch den zellulären Spleißmechanismus entfernt.^{17,83} Die gleichzeitig gebildeten mRNA Transkripte der Strukturproteine env und gag/pol werden entweder gar nicht oder nur einfach gespleißt und somit durch unterstützende Spleißfaktoren solange im Kern zurückgehalten, bis das im Cytoplasma exprimierte Rev-Protein seinen Weg zurück in den Zellkern gefunden hat. Mit diesem erstmaligen Import des Rev Proteins unter Mitwirkung des Importin- β Karyopherins, welches die Rev-NLS erkennt, beginnt der Rev-Transportzyklus, der in folgender Abbildung [4.7] schematisch dargestellt ist.

Nach der Translokation in den Nukleus wird im Zuge der RanGTP Bindung an Importin- β das Rev Protein freigesetzt, so dass auch die NLS-Sequenz, die im Bereich der RRE-Bindestelle liegt, wieder frei zugänglich wird.⁴² So kann erreicht werden, dass Rev das RRE-Strukturelement in allen ungespleißten und teilweise gespleißten RNA-Transkripten über die argininreiche Domäne (ARD) erkennt und entlang der unterschiedlich affinen Bindestellen multimerisiert. Diese Maskierung der viralen RNAs verhindert eine Erkennung durch die Spleißfaktoren in der Wirtszelle und stellt über die nun mehrfach exponierte leucinreiche NES-Sequenz am Rev-Protein den Export der viralen mRNAs

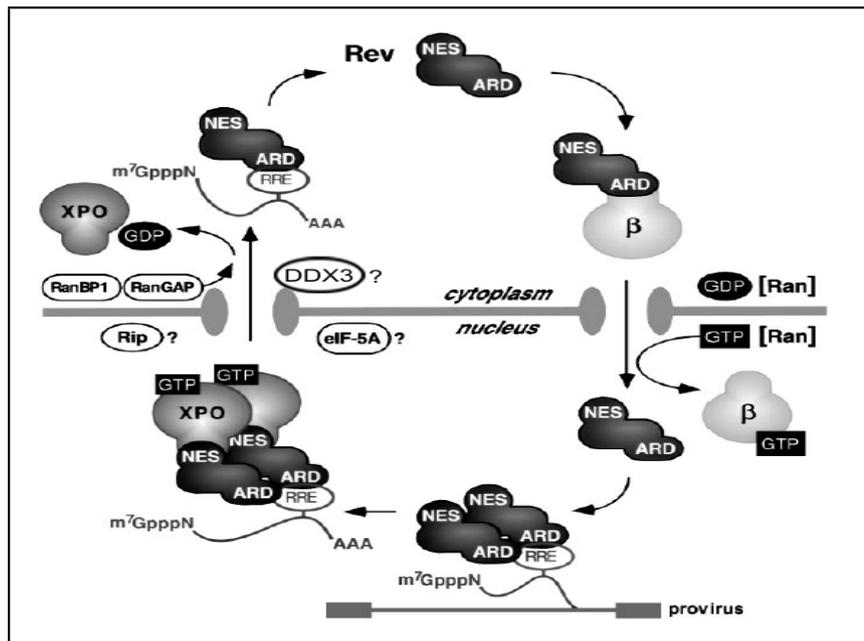


Abb. 4.7.: Rev-Transportzyklus, inklusive RRE-RNA Export, bei HIV-1
 Rev gezeigt mit seiner argininreichen RRE-Bindedomäne (ARD) und seiner leucinreichen NES wird durch das humane Exportin 1 Crm1 (dargestellt durch sein Hefehomolog Xpo1) exportiert und durch Importin- β importiert; welche Rolle DDX3, eIF-5A und Rip/Rab im Rev-Transportzyklus tatsächlich einnehmen, muss in weiteren Experimenten geklärt werden (adaptiert nach V.W. Pollard⁸³)

sicher. Die erhöhte RanGTP Konzentration im Nucleus bewirkt, wie in Abschnitt [4] erläutert, eine Beladung des zellulären Crm1 Exportins mit RanGTP, das in dieser Form eine erhöhte Affinität für NES-Substrate wie den NES-Rev-RRE Komplex aufweist. Der Export erfolgt nach dem in Abschnitt [4] beschriebenen Mechanismus für Crm1, wobei bisher nicht geklärt werden konnte, zu welcher Zeit Rev von der RRE abdissoziiert, ob während der Auflösung des Exportkomplexes an der terminalen Binde- stelle des Nup214 oder erst später. V.S.R.K. Yedanvalli vermutet aufgrund von Experimenten mit dominant-negativen DDX3-Mutanten, dass zusätzlich Helikasen aus der DEAD-box Familie am Export von RRE-RNA beteiligt sind.¹¹⁹ Denn ohne die DEAD-box Helikase DDX3 wird die HIV-1 Virusreplikation und der Export von ungespleißter viraler RNA herunterreguliert, während eine Überexpression der DDX3-Helikase eine spezifische Verstärkung des viralen Rev-Crm1 Exportweges, nicht aber des zellulären mRNA Exportweges über Tap/Nxt1, bewirkte. Mehrere Experimente in *Saccharomyces cerevisiae* mit Dbp5-Mutanten^{96,103,114} zeigten z.B. anhand einer verstärkten Anfärbung der Kernmembran („Rim-Staining“) oder einer Akkumulation von mRNA im Zellkern, dass diese DEAD-box Helikase am Mex67/Mtr2-vermittelten mRNA Export beteiligt ist. Sie lieferten somit ein weiteres Argument für Yedanvallis These. Beide Helikasen, sowohl Dbp5 aus *Saccharomyces cerevisiae* als auch DDX3 aus *Vertebraten*, sind im Gleichgewicht vornehmlich cytoplasmatisch an den Filamenten des NPC lokalisiert und

interagieren spezifisch mit Xpo-1 bzw. Crm1.¹¹⁹ Des Weiteren konnte *C. Schmitt* nicht nur die humane Form von Dbp5 charakterisieren, sondern auch Nukleoporinbindestellen für beide Dbp5-Formen identifizieren, das CAN in Vertebraten und Nup159 in Hefen.⁹⁶ Im Gegensatz zu Dbp5 konnten zellulären RNA-Spezies, die DDX3 als Helikase für ihren Export benutzen, bisher noch nicht gefunden werden, obwohl eine solche Beteiligung zu erwarten ist, da es für die Wirtszelle physiologisch nicht sinnvoll ist, ausschließlich den retroviralen Exportweg zu unterstützen.

5. Ziele der Arbeit

Die mit geringer Ausstattung (konfokales Mikroskop, Filter mit Mikro-/Nanoporen) durchführbare OSTR-Methode zur Analyse von Molekülströmen durch Kernmembranporen bietet die Möglichkeit, die Wirkung von Cofaktoren, Inhibitoren oder pharmakologischen Substraten auf den nukleocytoplasmatischen Transport zu untersuchen. Im Vergleich zu Zellassays besitzt sie den Vorteil, Membrantransportprozesse und die daran beteiligten Proteine ohne störenden zellulären Hintergrund zu charakterisieren. Eine wesentliche Aufgabe in dieser Arbeit bestand deshalb darin, diese Methode durch die Herstellung neuer Messarrays mit geringerer Autofluoreszenz und höherem Signal-zu-Rauschverhältnis weiterzuentwickeln, um neue Anwendungsmöglichkeiten zu erschließen. Gleichzeitig sollte die Verwertbarkeitsquote bei den einzelnen Transportmessungen durch Änderung verschiedener Parameter, wie Oberflächenbeschichtung, präparative Durchführung oder verbesserte Dichtigkeitskontrollen, erhöht werden. Jene genannten Aspekte erleichtern zudem eine Automatisierung der Transporteranalyse, die speziell für das Screening möglicher Inhibitoren für die jeweiligen Membrantransportwege von Vorteil ist. Diese Validierung und Verbesserung der Methode lieferte schließlich eine zuverlässige Basis, auf der zelluläre Transportwege systematisch analysiert werden können.

Das Arx1-Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* konnte im Nukleoplasma in Assoziation mit der späten Entwicklungsstufe der 60S ribosomalen Vorstufen nachgewiesen werden. Dies legte die Vermutung nahe, dass Arx1 beim sich anschließenden Export der pre-60S Einheiten eine wichtige Rolle spielt und als neuer Transportrezeptor betrachtet werden kann. Vorangegangene *in vivo* Experimente aus der Gruppe um Prof. Ed Hurt (Heidelberg) lieferten wegen zahlreicher am Export beteiligter Proteine, wie beispielsweise auch die Transportrezeptoren Xpo1 und Mex67/Mtr2, kein eindeutiges Ergebnis hinsichtlich der Transportrezeptorfunktion von Arx1. Deshalb bestand die Zielsetzung darin, zu beweisen, dass Arx1, trotz seiner Größe von 65.2 kDa alleine in der Lage ist, den NPC richtungsunabhängig zu durchqueren. Denn nur Transportrezeptoren können durch Bindung an die Nukleoporine des NPCs ihren eigenen Transport in Form einer erleichterten Diffusion vermitteln. Die OSTR-Methode erlaubt aufgrund der bereits oben genannten Vorteile nicht nur den direkten Nachweis einer möglichen Arx1-Transportkompetenz, sondern auch deren quantitative Charakterisierung unabhängig von zellulären Störfaktoren. Deshalb wurde das Arx1 Protein in Abschnitt [13] auf seine Export- und Importfähigkeit hin untersucht.

Der Export retroviraler RNA aus HIV-1 steht vor allem als möglicher Angriffspunkt pharmakologischer Substrate im Interesse der Forschung. Die Zielsetzung bestand somit darin, das minimale Transportsystem für retrovirale RRE-RNA Substrate zu finden und dieses in einem definierten *in vitro*-System quantitativ zu charakterisieren. Dazu sollten

zunächst die Transportraten des für den retroviralen Export verantwortlichen Karyopherins Crm1 in Abhängigkeit von energieliefernden Prozessen, wie die RanGTP-Hydrolyse, bestimmt werden. Im Anschluss daran können in weiteren OSTR-Transportassays diejenigen Proteinfaktoren gefunden werden, die für den retroviralen RRE-RNA Export essentiell sind. Dafür sollten neben dem fluoreszenzmarkierten Kontrollprotein möglichst alle beteiligten Substrate, Rev, RRE-RNA und Crm1, markiert werden, um sie unabhängig voneinander zu untersuchen. Somit bestand eine weitere Aufgabe darin, die bisherige OSTR-Methode auf drei oder maximal vier fluoreszenzmarkierte Spezies zu erweitern. Letztendlich sollte die Etablierung eines solchen minimalen RRE-RNA Exportsystems dazu dienen, die Wirkung von Cofaktoren und pharmakologische Inhibitoren zu testen. Dementsprechend wurden die Experimente mit Crm1 und RRE/HH in Abschnitt [14.3] und Abschnitt [14.4] durchgeführt, um das minimale Transportsystem für RRE-RNAs zu finden und zu analysieren.

Teil II.
Experimentelle Methoden

6. Materialien

Alle verwendeten Chemikalien waren von bester Qualität (zur Analyse) und stammten, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Fluka bzw. Sigma-Aldrich (Steinheim), Roth (Karlsruhe) und Merck (Darmstadt). Das Wasser für die Herstellung aller Puffer, Lösungen und Medien wurde mittels einer Milli-Q[®]-Anlage (Millipore, Eschborn) deionisiert und filtriert. Es wird in den folgenden Kapiteln mit *d. H₂O* abgekürzt. Bei amerikanischen Herstellern werden die im Handbuch der deutschen Wirtschaft üblichen Abkürzungen der US-Bundesstaaten verwendet.

Verbrauchsmaterialien

Filter

Amicon Zentrifugenfilter	4 mL, 15 mL	Millipore (Bedford, England)
Zelluloseacetat-Filter	FP 30/0.45 CA-S	Whatman (Dassel)
	FP 30/0.2 CA-S	

OSTR-Messarrays

<i>[TC-Größe], μm</i>	<i>pitch¹, μm</i>	<i>Firma</i>
50 x 50, rund	200, 100	Bartels Mikrotechnik (Dortmund)
3 x 3 x 2, eckig	12	Festkörperphysik (Bochum)
3 x 3, rund	12	Bessy AZM (Berlin)
0.5 x 3, rund	3	Bessy AZM (Berlin)
0.25 x 3, rund	2	Bessy AZM (Berlin)

Sonstiges

Dubliersilikon Wirosil 1,2	Bego (Bremen)
Dumont Pinzetten Nr.5	NeoLab (Heidelberg)
Immersionsöl	Leica Microsystems (Wetzlar)
Immersionswasser LiChrosolv	Merck (Darmstadt)
Konische PP-Röhrchen (15 mL, 50 mL)	BD (Franklin Lakes, NJ)
Mikronadeln aus Wolfram (D = 0.125 mm)	FST (Foster City, CA)
Nadelhalter (17 cm)	FST (Foster City, CA)

Farbstoffe und Mikroskopobjektive

Farbstoffe

Alexa-568, -488, -532	Invitrogen, Molecular Probes (Carlsbad, CA)
Atto-637	ATTO-TEC (Siegen)
TexasRed-Dextran 70 <i>kDa</i>	Invitrogen, Molecular Probes (Carlsbad, CA)

Objektive

20x	HC PL APO 0.7 ImmCorr CS Öl, Glycerin, <i>d. H₂O</i>	Leica Microsystems (Wetzlar)
63x	HCX PL APO 1.40-0.60 Öl	Leica Microsystems (Wetzlar)
100x	PL FluoTar 1.30 Öl	Leica Microsystems (Wetzlar)

Reagenziensätze

QIAprep Spin Miniprep Kit	Quiagen (Hilden)
QIAGEN Plasmid Midiprep Kit	Quiagen (Hilden)
QIAprep Gel Extraction Kit	Quiagen (Hilden)
T7 Transcription Kit	Fermentas (Ontario, Canada)

Puffer und Lösungen

Amphibian Ringer Lösung	88 mM NaCl, 1 mM KCl, 0.8 mM <i>MgSO₄</i> , 1.4 mM <i>CaCl₂</i> , 5 mM HEPES, pH 7.4
Crm1 Gelfiltrationspuffer	200 mM NaCl, 10 mM <i>MgCl₂</i> 50 mM Tris-Base, pH 7.5
Crm-1 Ni-NTA Puffer	300 mM NaCl, 50 mM <i>NaH₂PO₄</i> pH 8.0

Crm1 Ni-NTA Elutionspuffer	300 mM NaCl, 50 mM NaH_2PO_4 pH 8.0, 260 mM Imidazol 2 mM β -Mercaptoethanol
Crm1 Ni-NTA Lysepuffer	300 mM NaCl, 50 mM NaH_2PO_4 pH 8.0, 10 mM Imidazol 1 $\mu g/mL$ Proteasemix 2 mM β -Mercaptoethanol
Crm1 Ni-NTA Waschpuffer	300 mM NaCl, 50 mM NaH_2PO_4 pH 8.0, 10 mM Imidazol (Nr.1) 20 mM Imidazol (Nr.2) 2 mM β -Mercaptoethanol
Crm1 Q-Sepharose Bindepuffer	10 mM NaCl, 50 mM Tris-Base pH 8.0
Crm1 Q-Sepharose Elutionspuffer	50 mM Tris-Base, pH 8.0 50, 100, 200, 333, 500 mM NaCl
2x Gelshift Probenpuffer	40 % [w/v] Saccharose, 30 % [v/v] Glycerin, 50 mM EDTA
Kaliumphosphat Puffer	100 mM, pH[7.9] 23.7 mL 1 mM K_2HPO_4 , 2.3 mL 1 mM KH_2PO_4
Mock3 Puffer	freies $Ca^{2+} \approx 3 \mu M$ 10 mM NaCl, 90 mM KCl, 2.0 mM $MgSO_4$ 0.1 mM $CaCl_2$, 1.0 mM HEDTA, 10 mM HEPES, pH 7.3
5x Nativer Probenpuffer	1 M 6-ACA, 50 % [v/v] Glycerin 0.1 % Bromphenolblau 1 M Tris-HCl pH 8.6
10x Nativer Tris-Glycin Laufpuffer	191.9 mM Glycin, 23.9 mM Tris-Base pH 8.5
PBS Puffer	137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7.3

5x Probenpuffer	50 % [v/v] Glycerin, 1 M Tris-Base pH 8.6
50x TAE Puffer	5.7 % [v/v] Essigsäure, 50 mM EDTA, 2 M Tris-Base, pH 8.0
TSS-Lösung	85 % LB-Medium [ohne NaOH] 10 % PEG ₆₀₀₀ , 5 % DMSO 50 mM MgCl ₂

Nährmedien und Antibiotika

LB Medium und Agar für Agarplatten:	10 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt 10 g/L NaCl, pH 7.0 15 g/L Agar + Selektionsantibiotikum
SOC Medium	20 g/L Trypton, 5 g/L Hefeextrakt 0.5 g/L NaCl, 20 mL sterile 1 M Glucoselösung (nach Autoklavieren)
X-Gal Agarplatten	LB-Medium, 32 µg/mL X-Gal 0.4 mM IPTG, 15 g/L Agar auf ca. 50°C abkühlen + Selektionsantibiotikum

Enzyme, RNS-, DNS- und Protein-Größenstandards

Enzyme

CIP Alkalische Phosphatase (10 U/µl)	New England Biolabs (NEB) (Ipswich, MA)
EcoR1 Endonuklease (50 U/µl)	Fermentas (Ontario, Kanada)
HindIII Endonuklease (20 U/µl)	NEB (Ipswich, MA)
SaII Endonuklease (20 U/µl)	NEB (Ipswich, MA)
T4 DNA-Ligase (400 U/µl)	NEB (Ipswich, MA)
T7 RNA-Polymerase (20 U/µl)	Fermentas (Ontario, Kanada)

Nukleinsäure Größenstandards

GeneRuler 1kb DNA Ladder 250, 500, 750, 1000, 1500, 2000 , 2500 3000 , 3500, 4000, 5000, 6000, 8000, 10000 bp	Fermentas (Ontario, Kanada)
RiboRuler Low Range RNA Ladder 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000 nt	Fermentas (Ontario, Kanada)

Protein Größenstandards

LMW Calibration Kit 14.4, 20.1, 30, 43, 67, 94 kDa	Amersham Biosciences (Little Calfont, UK)
NativeMark Unstained Protein Standard 20, 66, 146, 242, 480, 720, 1048, 1236 kDa	Invitrogen (Carlsbad, CA)
Prestained Protein Molecular Weight Marker 19, 25, 34, 49, 85, 117 kDa	Fermentas (Ontario, Kanada)

Chromatographiesäulen

Ni-NTA Agarose Superflow	Quiagen (Hilden)
Q-Sepharose Anionenaustauscher	GE Healthcare (Uppsala, Schweden)
Superdex G-200 prep grade	GE Healthcare (Uppsala, Schweden)

Software

ChemSketch 11.01	ACD (Ontario, Kanada)
Coral Photo Paint 12	Coral Corporation (Ottawa, Kanada)
Ghostview 4.8, Ghostscript 8.57	Ghostgum Software (Russell Lang)
ImageJ 1.37v	Wayne Rasband (NIH, USA)
Leica TSC SPE Software	Leica Microsystems (Mannheim)
MikTex 2.6	Christian Schenk (Berlin)
Origin 7.0	OriginLab Corporation (Northampton, MA)
VectorNTI Advance 10	Invitrogen (Carlsbad, CA)

7. Molekularbiologische Methoden

Bei allen Arbeiten mit RNA oder DNA wurden ausschließlich RNase/DNase freie *Lo-Bind* Eppendorfggefäße (Hamburg), *Dualfilter Tips* für molekularbiologische Arbeiten (Eppendorf, Hamburg), sowie ein gesonderter Pipettensatz verwendet. Steriles, Nuklease freies *d. H₂O* wurde nicht, wie üblich, mit DEPC hergestellt, sondern bei der Firma Quiagen (Hilden) bestellt, um unerwünschte Nebenreaktionen bei der chemischen Markierung der RNA mit Fluoreszenzfarbstoffen zu verhindern.

7.1. Plasmidisolierung aus *Escherichia coli*

Die Vermehrung der in dieser Arbeit verwendeten Plasmide erfolgt ausschließlich in *Escherichia coli* Zellen des Stammes JM109. Aus diesen werden unter Verwendung von geeigneten Reinigungssystemen, sogenannten „Kits“ (Quiagen, Hilden), gereinigte Plasmide für Klonierung, Expression oder Sequenzierung gewonnen. Die meisten Plasmide, z.B. pUC oder pGEM, liegen in einer hohen Kopienzahl pro Bakterienzelle vor und können bereits aus 4 mL einer Übernachtskultur mit einer Zelldichte von etwa $3\text{-}4 \times 10^9$ Zellen/ml gewonnen werden. Plasmide mit niedriger Kopienzahl (< 10 Kopien pro Zelle) hingegen werden aus 25 mL Kultur gewonnen und mit einer erneuten Präparation über die mitgelieferten Säulen zusätzlich aufgereinigt. Entsprechend den Herstellerangaben werden die Zellen mittels alkalischer Lyse (200 mM NaOH, 1 % SDS) aufgeschlossen und Fremdstoffe, wie genomische DNA, Proteine und Zellbestandteile durch Fällung abgetrennt. Nach Zugabe von chaotropen Salzen, wie Guanidinhydrochlorid, wird die vorgereinigte Plasmid-DNA an die Silikamatrix einer Säule gebunden und nach mehrmaligem Waschen mit einem Puffer geringer Salzkonzentration eluiert. Die Plasmid-DNA kann entweder sofort verwendet oder mit Alkohol gefällt werden. Für die Fällung wird das Eluat mit 0.7 Volumen Isopropanol bei Raumtemperatur (RT) versetzt und 15 min inkubiert. Das gebildete DNA-Pellet wird schließlich mehrmals mit 70 % EtOH gereinigt, getrocknet und in einem geeigneten Volumen 10 mM Tris-HCl, pH 8.5 resuspendiert.

7.2. Restriktion der DNA durch Endonukleasen

Restriktionsendonukleasen vom Typ II schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen Sequenzen, meist an sogenannten Palindromen. In dieser Arbeit werden die Restriktionsendonukleasen der Firma NEB entsprechend den Herstellerangaben im mitgelieferten Puffer verwendet. Sie dienen einerseits dazu, Plasmid-DNA für die in-vitro Transkription zu linearisieren oder DNA-Sequenzen (z.B. RRE-Sequenz) für weitere Klonierungen

aus vorhandenen Plasmiden herauszuschneiden. Die Restriktionen erfolgen dabei mit je 5-15 μg Plasmid-DNA für 2 h bei 37 °C im Schüttler. Anschließend wird der gesamte Mix zur Kontrolle auf ein LMP-Agarosegel mit Ethidiumbromid (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) aufgetragen, die entsprechende Bande ausgeschnitten und die jeweilige DNA-Sequenz mit Hilfe eines Gelextraktionssystems (Quiagen, Hilden) aus der Agarose herausgelöst. Nach einer photometrischen Konzentrationsbestimmung und Reinigung durch Fällung kann die DNA weiterverwendet oder bei -20 °C gelagert werden. Bei Klonierungen wird im Anschluss an die Restriktion eines der linearisierten Fragmente mit Hilfe der alkalischen Phosphatase CIP an dessen Enden dephosphoryliert, um intramolekulare Ligation mit sich selbst zu verhindern. Die alkalische Phosphatase sollte nach der Reaktion unbedingt entfernt werden, um die darauffolgende Klonierung nicht zu inhibieren. Die Reinigung des gewünschten dephosphorylierten Fragments kann beispielsweise durch eine präparative Agarosegelelektrophorese mit anschließender Gelextraktion erfolgen.

7.3. Auftrennung der Nucleinsäuren durch Agarosegelelektrophorese

Analytische und präparative Trennungen von Nucleinsäure-Fragmenten von bis zu 8 kb werden durch die horizontale Agarosegelelektrophorese erreicht, bei der die negativ geladenen Nucleinsäuren im elektrischen Feld entsprechend ihrer Länge getrennt werden. Das Prinzip der Trennung beruht auf dem Molekularsiebeffekt der Agarose, die nach dem Aushärten je nach Konzentration (1.0 – 2.0 %) Poren einer bestimmten Größe ausbildet. Dadurch werden große Nucleinsäure-Fragmente stärker an ihrer Bewegung gehindert, als kleinere Fragmente. Die Laufstrecke für kleinere Fragmente bis ca. 8 kb verhält sich hierbei umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge. Die Zuordnung der Fragmentlängen erfolgt durch Vergleich der Laufstrecken mit einem entsprechenden Größenstandard. Eine Lösung mit 1 % Agarose für DNA-Fragmente und mit 2 % für RNA-Fragmente wird in TAE-Puffer mit 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ethidiumbromid bis zur Auflösung der Agarose erhitzt. Anschließend wird die flüssige Agarose in eine horizontale Gelkammer mit Kamm gegossen und nach dem Abkühlen mit TAE-Puffer, der 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ethidiumbromid enthält, überschichtet. DNA- oder RNA-Proben werden mit 5x TAE Probenpuffer versetzt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung der Nucleinsäuren erfolgt für etwa 30 min bei 10 V/cm (Elektroden: 12.5 cm) und RT. Allerdings wird bei RNA-Analysen zur Vermeidung von Kontaminationen Nuclease freier TAE-Puffer, sowie eine eigene, gereinigte Gelapparatur verwendet. Bei fluoreszenzmarkierten Nucleinsäureproben wird TAE-Puffer ohne Ethidiumbromid verwendet und das Gel im Anschluss der Analyse im Ethidiumbromidbad (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) behandelt. Dabei bewirkt die Interkalation des aromatischen Ethidiumbromid-Farbstoffs zwischen die Basenstapel der Nucleinsäurekette eine Überlagerung der jeweiligen π -Ringsysteme. Dies erhöht die Intensität der Ethidiumbromid-Emission nach Anregung im UV-Bereich bei 320 nm und führt zu einer selektiven Detektion von Nucleinsäuren im Gel.

7.4. Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten werden zwei beliebige DNA-Moleküle entweder mit komplementären überhängenden Enden oder mit glatten Enden durch die T4 DNA-Ligase in Anwesenheit von ATP enzymatisch miteinander verknüpft. Es kommt zur Bildung einer Esterbindung zwischen Phosphatrückrest und Desoxyribose. Das molare Verhältnis zwischen Fragment und Plasmidvektor sollte idealerweise zwischen 3 und 5 liegen und wird wie folgt nach Formel [7.1] aus der jeweiligen Basenlänge und der photometrisch gemessenen Konzentration an DNA bestimmt.

$$n_{DNA} = (3 - 5) \cdot n_{Fragment} = \frac{V_{DNA}[L] \cdot C_{DNA}[g/L]}{l_{DNA}[bp] \cdot 650[g/(mol * bp)]} \quad (7.1)$$

$$\Rightarrow V_{DNA} = \frac{n_{DNA} \cdot l_{DNA} \cdot 650}{C_{DNA}} \quad (7.2)$$

Etwa 300 ng linearisierte und dephosphorylierte Plasmid-DNA wird mit dem nach Formel [7.2] berechneten Volumen des gewünschten DNA-Fragments (Insert) vermischt und nach Zugabe der T4 DNA-Ligase der Firma NEB und des mitgelieferten 10 x T4 Ligasepuffer über Nacht bei 16 °C inkubiert. Der gesamte Ligationsansatz wird schließlich für eine Hitzeschocktransformation nach [7.8] von JM 109 Zellen verwendet, um mit Hilfe der Blau-Weiß Selektion nach [7.9] positive Klone zu identifizieren, die das gewünschte Insert enthalten. Die Orientierung des eingefügten DNA-Fragments wird im Anschluss mit Hilfe einer analytischen Restriktion nach [7.2] überprüft. Hierfür werden je 5 mL LB-Medium mit einer positiven, weißen Kolonie aus der Blau-Weiß Selektion angeimpft und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Anschließend werden die vermehrten Plasmide isoliert [7.1] und mit einem geeigneten Restriktionsenzym geschnitten. Es eignen sich hierbei Restriktionsendonukleasen, die je nach Orientierung des Inserts unterschiedlich lange Fragmente aus dem Plasmid ausschneiden. Nach der analytischen Kontrollrestriktion werden die einzelnen Proben auf einem Agarosegel analysiert und anhand der Länge des herausgeschnittenen DNA-Fragments die Kolonie mit der richtigen Orientierung des Inserts identifiziert.

7.5. Fällung von DNA mit Ammoniumacetat

Die Alkoholfällung mit monovalenten Salzen nach *D. J. Shapiro*⁹⁸ wird häufig verwendet, um DNA z.B. für Klonierungen zu reinigen bzw. aufzukonzentrieren. Dabei werden zur vorliegenden DNA-Lösung je ein Teil [v/v] 5 M Ammoniumacetatlösung und 6 Teile [v/v] 100 % EtOH gegeben. Die Fällung der DNA erfolgt entweder über Nacht bei -20 °C oder für Sequenzierungen 2 h bei RT, um eine zu starke Copräzipitation von störenden Salzen zu verhindern. Anschließend wird die gefällte DNA durch Zentrifugation für 15 min bei 12 000 xg und 4 °C pelletiert, zweimal mit je 500 µl 70 % EtOH gewaschen und das Pellet 20 min bei RT getrocknet. Die DNA kann nach Aufnahme in Nuklease freiem *d. H₂O* mehrere Monate bei -20 °C gelagert werden.

7.6. Sequenzierung

Die kodierenden DNA-Sequenzen aller verwendeten Expressionsplasmide, sowie der klonierten *in vitro*-Transkriptionsplasmide werden durch eine Sequenzierung ausgehend von entsprechenden Primern experimentell überprüft. Die Sequenzierungen werden extern von der Firma Seqlab aus Göttingen nach der von Sanger entwickelten Kettenabbruchreaktion unter Verwendung von fluoreszenzmarkierten Nukleotiden durchgeführt. Entsprechend den Angaben von Seqlab werden ca. 200-400 ng/ μ l gereinigte salzfreie Plasmid-DNA mit den jeweiligen Primern [7.1] gemischt.

Tab. 7.1.: Primer für die Sequenzierung von Plasmidinserts

<i>Primer</i>	<i>Sequenz 5'→3'</i>	<i>Firma</i>
T7 Promotor Primer	TAATACGACTCACTATAGGG	Promega
T7 Terminator Primer	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Novagen
SP6 Promotor Primer	TATTTAGGTGACACTATAG	Promega

7.7. Herstellung kompetenter *Escherichia coli* für Hitzeschocktransformationen

Die meisten Bakterienzellen, wie *Escherichia coli*, nehmen DNA unter normalen Bedingungen nur in sehr begrenztem Umfang auf. Durch eine chemische oder physikalische Behandlung kann die Aufnahmekapazität erhöht werden d.h. die Zellen werden kompetent gemacht. Besonders hohe Transformationsraten konnten in dieser Arbeit mit der Polyethylenglycol Methode nach *R.J. Klebe*⁵⁹ erzielt werden, dessen Protokoll durch die Zugabe von zweiwertigen Mg²⁺-Ionen verbessert wurde. Zur Herstellung einer kompetenten Bakteriensuspension werden 200 mL LB-Medium mit 2 mL einer Übernachtskultur des jeweiligen *Escherichia coli* Stammes angeimpft und ohne Zugabe von Antibiotika bei 37 °C und 300 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 0.3-0.4 vermehrt. Nach 20 min Inkubation auf Eis werden die Bakterienzellen 10 min bei 1200 xg und 4 °C pelletiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in eiskalter TSS-Lösung resuspendiert. Die kompetenten Bakterienzellen werden entweder sofort für eine Transformation verwendet oder als 100 μ l Aliquots in fl. N₂ schockgefroren. Die Lagerung erfolgt bei -80 °C. Eine Kontrolltransformation der BL21(RIPL)-Zellen mit 0.1 ng Kontrollplasmid (Promega) pro 100 μ l kompetenter Zellen ergab eine Transformationseffizienz von 1 x 10⁸ cfu/ μ l.

7.8. Hitzeschocktransformation von Plasmid-DNA

Neben der sehr effizienten Elektroporation wird die leicht durchführbare Hitzeschockmethode am häufigsten zur Transformation kompetenter Bakterien verwendet. Die Integrität der Bakterienmembran wird hierbei durch eine plötzliche Temperaturerhöhung

Tab. 7.2.: Verwendete Bakterienstämme

<i>Bakterienstamm</i>	<i>Genotyp</i>	<i>Bezugsquelle</i>
BL21(DE3)-RIPL	$F^- ompT, hsdS(r_B^- m_B^-), dcm^+, Tet^r$ <i>gall</i> (DE3), <i>endA</i> , Hte[<i>argU proL Cam^r</i>] [<i>argU ileY leuW Strep/Spec^r</i>]	Stratagene
TG1	<i>supE, hsdD5, thiD(lac-proAB)</i> F' [<i>traD36, proAB^+ lacI^q lacZ ΔM15</i>]	AGPeters
JM109	<i>recA1, supE44, endA1, hsdR17, gyrA96</i> <i>relA1, thiD(lac-proAB)</i> F' [<i>traD36 proAB^+ lacI^q lacZ ΔM15</i>]	Promega

gestört und somit die Permeabilität der Zellmembran ausreichend erhöht, um die Aufnahme von assoziierter Plasmid-DNA in die Bakterienzelle zu erleichtern. In Anlehnung an das Protokoll der Firma Stratagene (Cedar Creek, Texas) wird die entsprechende Menge eines kompetenten *Escherichia coli* Stammes langsam auf Eis aufgetaut, vorsichtig gemischt und je 100 μ l der Bakteriensuspension in 17x100 mm Polypropylenröhrchen mit rundem Boden (BD Labware, Le Pont De Claix, Frankreich) gegeben. Das von Stratagene mitgelieferte XL10-Gold β -Mercaptoethanol 1:10 verdünnen und je 2 μ l zu den 100 μ l Aliquots geben, vorsichtig schütteln und die Bakterienzellen 10 min unter gelegentlichem Schütteln auf Eis stehen lassen. Nach der Inkubation 1-50 ng des jeweiligen Expressionsplasmids, sowie 1 μ l des mitgelieferten pUC18 Kontrollplasmids, zu den Bakterien geben, vorsichtig schütteln und für 30 min auf Eis inkubieren. Die Transformationsmischungen bei 42 °C für 20 s im Wasserbad einem Hitzeschock unterziehen, danach sofort für weitere 2 min auf Eis stellen und mit 900 μ l vorgewärmten (42 °C) SOC-Medium versetzen. Nach einstündiger Vermehrung der Zellen bei 37 °C im Schüttler (250 rpm), jeweils 100 μ l der ursprünglichen Suspension, sowie 100 μ l des resuspendierten Pellets, auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausplattieren und über Nacht bei 37 °C wachsen lassen, um positive Klone zu selektieren.

Tab. 7.3.: Verwendete Plasmide

<i>Plasmid</i>	<i>Genprodukt</i>	<i>Selektion</i>	<i>Bezugsquelle</i>
pQE60-CRM1	hCrm-1	<i>Amp^r</i>	AG Peters
pLRedR	DsRed-RRE	<i>Amp^r</i>	R.Brack-Werner (GSF)

7.9. Blau-Weiß Selektion zur Identifikation positiver Klone

Viele Expressionsplasmide enthalten zusätzlich zum Replikationsstartpunkt („origin of replication“) und dem Selektionsgen ein *lacZ*-Gen, welches innerhalb der sogenannten

„multiple cloning site“ (MCS), einer besonders schnittstellenreichen Klonierungsstelle, liegt. Diese Plasmide eignen sich für eine Blau-Weiß-Selektion zur Identifikation positiver Klone, da durch Einbau des gewünschten DNA-Fragments in die MCS das lacZ-Gen unterbrochen wird. Das lacZ-Gen kodiert im Allgemeinen für das α -Fragment der β -Galactosidase, so dass die vollständige enzymatische Aktivität nur in Bakterienstämmen hergestellt werden kann, die das fehlende ω -Fragment (lacZ Δ M15) kodieren. Nach Ligation des linearisierten Plasmids mit dem gewünschten Insert und Transformation der kompetenten Bakterien mit der Hitzeschockmethode, werden die Transformationsansätze, wie oben angegeben, auf LB-Agarplatten mit X-Gal (Substrat) und IPTG (Induktor) ausplattiert. Die Inkubation erfolgt über Nacht bei 37 °C im Brutschrank. Im Anschluss werden die Platten etwa 1 h in den Kühlschrank gelegt. Bei erfolgreicher Insertion bleiben die Bakterienkolonien weiß, da deren lacZ-Gen zerstört wurde, während die negativen Klone blau gefärbt sind.

7.10. *in vitro*-Transkription zur Herstellung von RNA

Die *in vitro*-Synthese von RNA mit Hilfe einer entsprechenden RNA-Polymerase eröffnet die Möglichkeit längere RNA-Sequenzen mit mehr als 80 Nukleotiden herzustellen, die für eine chemische Synthese nicht zugänglich sind. Voraussetzung für eine erfolgreiche *in vitro*-Transkription ist die Linearisierung des DNA-Plasmids mit dem jeweiligen Insert und das Vorhandensein einer geeigneten Promotorregion für die Bindung der RNA-Polymerase. Die *in vitro*-Transkription wird mit dem T7-Transkriptionskit der Firma Fermentas (Ontario, Canada) durchgeführt. Für den Transkriptionsmix werden 10 μ l Transkriptionspuffer, 2 μ l (50 units) Ribonuclease Inhibitor, je 2.5 μ l von jedem Ribonukleotid (40 mM Stammlösung), 1 μ g der jeweiligen linearisierten Plasmid-DNA bzw. 1 μ g Kontrollplasmid (pTZ19R mit 341 bp Insert), sowie 1.5 μ l (30 units) der T7 RNA Polymerase gemischt und mit sterilem Nuklease freiem *d. H₂O* auf 50 μ l aufgefüllt. Den Mix vorsichtig vortexen, anschließend kurz herunterzentrifugieren und 2 h bei 37 °C im Schüttler inkubieren. Zum Stoppen der Reaktion, die Proben für 1 h bei -20 °C einfrieren. Die Analyse erfolgt mittels Agarosegelelektrophorese und einem entsprechenden RNA-Größenstandard, um das jeweilige Transkript zu identifizieren. Zur weiteren Verwendung wird die RNA durch eine Lithiumchlorid-Fällung von Proteinbestandteilen und freien Nukleotiden gereinigt. In dieser Arbeit wurden die Plasmidkonstrukte aus der folgenden Tabelle [7.4] selbst hergestellt und für eine *in vitro*-Transkription der RRE-RNA verwendet.

7.11. RNA-Fällung mit Lithiumchlorid

Die im Abschnitt [7.5] beschriebene Methode der Alkoholfällung nach *D.J. Shapiro*⁹⁸ zur Aufkonzentrierung und Reinigung von Nukleinsäuren kann unter Verwendung von Lithiumchlorid anstelle von Ammoniumacetat zur spezifischen Fällung von RNA aus DNA/RNA-Mischungen, wie z.B. aus einem *in vitro*-Transkriptionsansatz verwendet

Tab. 7.4.: Plasmide für die *in vitro*-Transkription

<i>Vector</i>	<i>Spezifikation</i>	<i>Firma</i>	<i>Insert</i>	<i>Linearisierung mit</i>
pGEM-3Zf(+)	<i>Amp^r</i> T7,SP6 Promotor lacZ	Promega	RRE-RNA 380 nt KpnI	(a) Sall (b) HindIII
pTZ-19R	<i>Amp^r</i> T7 Promotor lacZ	Fermentas	RRE-RNA 380 nt KpnI	<i>EcoRI</i>

werden. Zur Fällung der RNA wird der gesamte Transkriptionsansatz mit 0.1 Volumen 8 M LiCl-Lösung und 2.5 Volumina eiskaltem 100 % EtOH versetzt und für 2 h bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Nach der Zentrifugation des Ansatzes für 20 min bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ und 13 000 rpm, wird der Überstand verworfen und das RNA-Pellet mehrmals mit 70 % EtOH gewaschen. Die Pelletierung der RNA nach jedem Waschschrift erfolgt wie vorher angegeben. Anschließend das RNA-Pellet für 10 min bei RT trocknen lassen und in einer geeigneten Menge Nuklease freiem *d. H₂O* aufnehmen.

7.12. Konzentrationsbestimmung von Nukleotiden

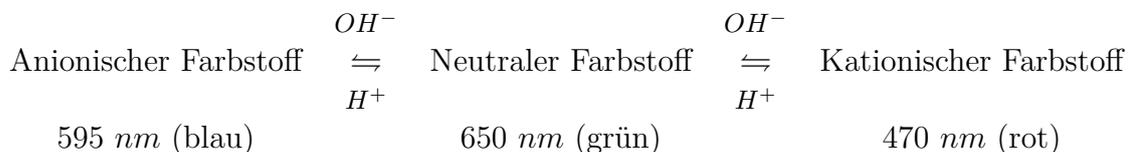
Die photometrische Bestimmung der DNA bzw. RNA Konzentration erfolgt durch Messung der typischen Absorption der Purin- bzw. Pyrimidinnukleotide bei 260 nm. Eine photometrische Unterscheidung zwischen RNA und DNA ist somit nicht möglich, lediglich Proteinkontaminationen können bis zu einem gewissen Grad anhand des Verhältnisses der Absorptionen bei 260 und 280 nm ermittelt werden. Kommerziell erhältliche Biophotometer geben deshalb bei der Konzentrationsmessung von Nukleinsäuren standardmäßig das Verhältnis von OD_{260} zu OD_{280} an, welches bei einer sauberen Präparation zwischen 1.8-2.0 liegen sollte. Die RNA-Proben werden je nach Konzentration 1:50 bzw. 1:100 in einer für Messungen im UV-Bereich geeigneten Mikroküvette verdünnt. Die anschließende Absorptionsmessung erfolgt hierbei mit einem Eppendorf Biophotometer (Eppendorf, Hamburg).

8. Proteinbiochemische Methoden zur Charakterisierung von Proteinen

8.1. Bradford Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Konzentrationsbestimmung der verwendeten Proteine erfolgt nach der von *M.M. Bradford*^{14,15} entwickelten Methode, welche sich im Vergleich zur *Biuret*- oder *Lowry*-Methode durch eine höhere Spezifität d.h. geringere Störanfälligkeit und eine höhere Sensitivität auszeichnet. Bei der *Bradford*-Methode bewirken hydrophobe, sowie Van-der-Waals-Interaktionen des Coomassie Brilliant Blue G250 Farbstoffes mit den basischen (His, Lys) und aromatischen (Tyr, Phe, Try) Aminosäureresten eines Proteins, eine Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes von 470 nm zu 595 nm. Dies entspricht der in Abbildung [8.1] gezeigten Umwandlung von einer kationischen in eine anionische Form:

Tab. 8.1.: Bradfordreaktion: Coomassie Brilliant Blue Reaktionsgleichgewicht



Die konzentrierte Farbstofflösung in Methanol/Phosphorsäure (Biorad, München) wird nach den Herstellerangaben 1:5 verdünnt und zunächst für die Bestimmung einer Eichgeraden mit BSA verwendet. Hierfür wird eine 1 mg/mL BSA-Stammlösung angesetzt, von der jeweils 1.0-13.0 μL (1.0-13.0 $\mu L/mL$) in einer Küvette vorgelegt werden. Je 1 mL der verdünnten Coomassie Brilliant Blue G250 Farbstofflösung wird zu den Proteinstandards gegeben, wobei durch mehrmaliges Pipettieren eine optimale Durchmischung erreicht wird. Nach 20 min Inkubationszeit wird mit einem Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) die Absorption der Proteinproben bei 595 nm gegen einen Leerwert gemessen. Die aus einer Dreifachbestimmung gemittelten Absorptionswerte werden gegen die BSA-Konzentration aufgetragen und mittels linearer Regression wird eine Gerade durch die Messpunkte gelegt. Die Konzentrationsbestimmung aller in dieser Arbeit verwendeten Proteinproben erfolgt durch Einsetzen des aus einer Dreifachbestimmung gemittelten Absorptionswertes bei 595 nm in die Geradengleichung aus der Eichreihe. Ein rein qualitativer Bradford-Schnelltest zur Identifikation proteinhaltiger Proben wird in Anlehnung an obiges Protokoll mit je 10 μl Probe und je 100 μl Bradfordreagenz auf einer Elisa-Platte durchgeführt.

8.2. Fluoreszenzmarkierung von Cysteinresten mit Farbstoff-Maleimid

Die Markierung von Proteinen mit Fluoreszenzfarbstoffen erfolgt über chemisch aktivierte Fluorophore, deren reaktive Gruppen sowohl mit primären Aminen als auch mit Thiolgruppen reagieren können. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Fluorophore mit einer Maleimidgruppe verwendet, die spezifisch mit den Thiolgruppen der Cysteine reagieren, sofern diese frei zugänglich auf der Proteinoberfläche liegen. Sind keine Cysteine im Protein vorhanden oder zugänglich, so können durch eine Modifikation des Expressionsplasmids auch Cysteine an einem der beiden Enden des Proteins angehängt werden. Die folgenden Reaktionsschemata [8.1,8.2] zeigen die einzelnen Reaktionsschritte bei der Cysteinmarkierung mit einem Farbstoff-Maleimid:

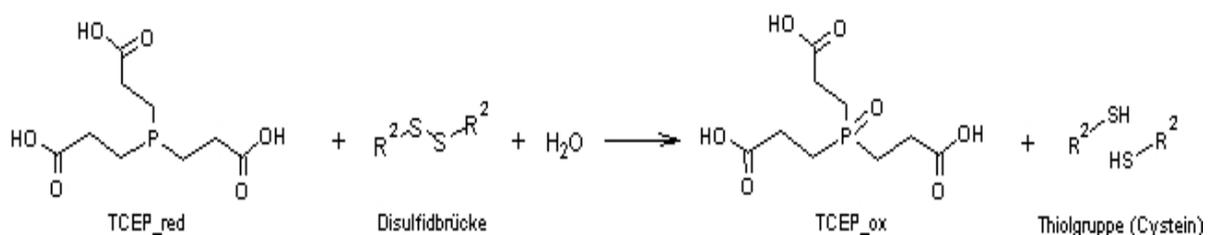


Abb. 8.1.: Reduktion der Disulfidbrücken mit TCEP

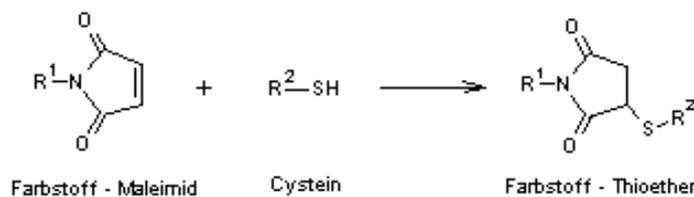


Abb. 8.2.: Reaktion eines Farbstoff-Maleimids mit der Thiolgruppe eines Cysteins

Mindestens 1-2 mg des jeweiligen Proteins, gelöst in geeignetem Puffer, werden mit einem 10x Überschuss einer 100 mM Stammlösung von TCEP oder DTT versetzt. Dabei ist darauf zu achten, dass nur geringe Volumina an reduzierendem Agens zugegeben werden. Wird DTT als reduzierendes Agens verwendet, muss dieses wegen der vorhandenen Thiolgruppen vor der Markierung durch Dialyse oder Pufferaustausch entfernt werden. Für den Pufferaustausch eignen sich Amicon-Ultra Zentrifugenfilter (Millipore, Bedford Massachusetts) mit jeweils passendem Ausschlussvolumen. Nach Zugabe von TCEP oder DTT wird die Proteinlösung für 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wird ein 5x Überschuss an Farbstoff unter leichtem Vortexen der Probe hinzugefügt. Die Kopplungsreaktion erfolgt im Dunkeln für 2 h bei RT. Der freie ungebundene Farbstoff wird über eine Gelfiltrationssäule vom fluoreszenzmarkierten Protein abgetrennt und die Proteinlösung mit Hilfe geeigneter Amicon-Ultra Zentrifugenfilter (Millipore, Bedford Massachusetts) eingengt. Nach einer *Bradford*-Konzentrationsbestimmung und Absorptionsmessung in einem Einstrahl-UV/VIS-Spektrometer zur Berechnung des

Markierungsgrades wird das fluoreszenzmarkierte Protein aliquotiert und zur Lagerung bei -80°C in fl. N_2 schockgefroren.

Tab. 8.2.: Liste der hergestellten Fluoreszenzmarkierungen

<i>Protein</i>	<i>Markierung</i>	<i>Reduktion mit</i>	<i>Markierungsgrad</i>
MBP	Atto-637-Maleimid	DTT	0.468
MBP	Alexa-546-Maleimid	TCEP	0.284
BSA	Atto-637-Maleimid	TCEP, DTT	0.398
CRM-1	Alexa-568-Maleimid	TCEP	2.421

8.3. Gelfiltration zur Abtrennung des freien Farbstoffs

Zur Trennung von markierten Proteinen und ungebundenem Farbstoff eignet sich die auf einer Größenselektion beruhende Gelfiltration, bei der die Laufgeschwindigkeit kleinerer Moleküle im Gegensatz zu größeren Molekülen aufgrund ihrer lateralen Diffusion zwischen dem Poreninneren der Gelmatrix und der mobilen Phase verringert wird. Etwa 2.3 g Bio-Gel P-6 aus porösen Polyacrylamid-Beads mit einem Porendurchmesser von $45\text{--}90\ \mu\text{m}$ (Biorad, Hercules California) werden in einem für das jeweilige Protein geeigneten Puffer resuspendiert. Nach der Sedimentation des Gelmaterials den Überstand abnehmen, 2 x mit etwa 50 ml Puffer waschen und anschließend die Gelmatrix für 1-2 h bei RT quellen lassen. Das erneut im Puffer resuspendierte Gel wird zügig in eine Säule gegossen. Nach dem Verdichten der Säule, den Puffer soweit herauslaufen lassen, dass sich der Flüssigkeitsmeniskus am oberen Rand der Gelmatrix befindet. Vorsichtig etwa 1-2 mg Protein pro Säule auftragen, nach dem Einwandern der Probe in die Gelmatrix, die Säule mit Puffer auffüllen und das vom Farbstoff getrennte fluoreszenzmarkierte Protein in je $100\ \mu\text{l}$ Fraktionen sammeln. Die Aufkonzentrierung der verdünnten Proteinproben erfolgt nach den Herstellerangaben in Amicon-Ultra Zentrifugenröhrchen (Millipore, Bedford Massachusetts) mit geeigneter Ausschlussgrenze. Eine schnellere Abtrennung freier Farbstoffmoleküle oder kleinerer Fragmente für eine höhere Reinheit der OSTR-Dichtigkeitskontrollen kann bei kleineren Probenvolumina ($\leq 150\ \mu\text{l}$) mit Microspin G25 Säulen (GE Healthcare, Uppsala Schweden) oder alternativ mit *Microcon*-Zentrifugenfiltern (Millipore, Bedford) erreicht werden.

8.4. Bestimmung des Markierungsgrades

Bei quantitativen Analysen in der Fluoreszenzmikroskopie werden genaue Angaben zur Konzentration der jeweiligen fluoreszierenden Spezies benötigt, so dass nach der Kopplung eines Fluorophors an ein Protein die Bestimmung des Markierungsgrades notwendig wird. Der Markierungsgrad beschreibt das Verhältnis zwischen Fluorophorkonzentration und Proteinkonzentration, so dass bei einem Wert von 1 im Durchschnitt je 1 Fluorophor

an ein Protein gekoppelt ist. Zur Bestimmung wird eine ausreichende Menge an markiertem Protein in eine Mikroküvette mit 1 cm Durchmesser gegeben und die Absorption A des jeweiligen Fluorophors an der Stelle des Absorptionsmaximums in einem Einstrahl-UV/VIS-Spektrometer der Firma Milton Roy (Ivyland, Pennsylvania) gegen einen Pufferleerwert gemessen. Aus dem Lambert-Beerschen-Gesetz nach Formel [8.2] kann dann die Konzentration des Fluorophors $[J]$ bestimmt werden.

$$\lg \frac{I}{I_0} = -\epsilon \cdot [J] \cdot d = \lg T = -A \quad (8.1)$$

d : Durchmesser der Küvette d.h. Wegstrecke durch die Probe

ϵ : molarer Absorptionskoeffizient

I : Intensität der Strahlung nach der Wegstrecke d

I_0 : Intensität der einfallenden Strahlung vor der Probe

8.5. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die analytische Auftrennung von Proteinen nach deren Größe erfolgt mit einer diskontinuierlichen Polyacrylamidgelelektrophorese nach *B.J. Davis*²¹ und *U.K. Laemmli*.⁶³ Dabei werden die Proteine in Anwesenheit des reduzierenden β -Mercaptoethanols durch das Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) denaturiert und deren Eigenladung durch Bindung der negativ geladenen Dodecylsulfatanionen maskiert. Folglich weisen alle Proteine annähernd gleiche Ladungs-Masse-Verhältnisse auf d.h. die Menge an gebundenen Dodecylsulfatanionen ist ungefähr proportional zum Molekulargewicht und unabhängig von der Aminosäuresequenz. Aufgrund des Molekularsiebeffekts der Polyacrylamidmatrix werden die negativ maskierten Proteine im elektrischen Feld nur noch nach ihrem Stokes-Radius und somit nach ihrem Molekulargewicht (MG) aufgetrennt. Die Trennung von Proteinen mit MG zwischen 30-140 kDa erfolgt mit 10 % und mit MG zwischen 14-70 kDa mit 12 % Trenngelen [8.3], die zur Polymerisation in ein vertikales Gelkammersystem (Biorad, München) gegossen und anschließend mit einer wassergesättigten Butanollösung überschichtet werden. Zur Erhöhung der Bandenschärfe wird das Trenngel mit einem großporigen 5 % Sammelgel überschichtet, in dem durch einen Kamm Geltaschen ausgeformt werden.

Verantwortlich für die Bandenschärfe ist neben dem Tris-Glycin-Laufpuffer vor allem der pH-Unterschied zwischen dem Sammelgel (pH[6.8]) und dem Trenngel (pH[8.8]), da die Proteine zwischen der vorlaufenden Chloridionenfront und der nachlaufenden Glycinfront aufgrund des starken Potentialgradienten verdichtet werden. Alle Proteinproben werden mit SDS-haltigem 5x Probenpuffer versetzt, für 5 min auf 95 °C erhitzt und jeweils maximal 10 μ l pro Tasche auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt im Tris-Glycin Laufpuffer bei RT und einer konstanten Stromstärke von 25 mA je Gel (8.4 x 6 x 0.75 cm) für etwa 60 min. Als Molekulargewichtsstandard dient ein LMW-Marker, bestehend aus sechs verschiedenen Proteinen (Amersham Biosciences, Little

Tab. 8.3.: Herstellung der Polyacrylamidlösungen für SDS-PAGE

<i>Komponenten</i>	<i>Angaben pro Gel</i>		
	<i>Trenngel</i>		<i>Sammelgel</i>
	10%	12%	5%
<i>d. H₂O</i>	2.35 ml	2.1 mL	0.72 mL
Acrylamid Mix 40%	1.25 mL	1.5 mL	0.125 mL
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3 mL	1.3 mL	-
1.0 M Tris (pH 6.8)	-	-	0.13 mL
10% SDS Lösung	50 μ l	50 μ l	10 μ l
10% Amps	50 μ l	50 μ l	10 μ l
TEMED	2 μ l	2 μ l	1 μ l

Calfont UK). Nach dem Lauf werden die Gele 3 x je 5 min mit *d. H₂O* gespült, nach kurzem Aufkochen mit der SimplyBlue Färbelösung (Invitrogen, Carlsbad CA) für weitere 15 min gefärbt und zur Erhöhung des Bandenkontrastes mit *d. H₂O* für 1 h entfärbt. Die Molekulargewichte der untersuchten Probenproteine werden ermittelt, indem der Logarithmus des Molekulargewichts der Markerproteine gegen deren relative Mobilität im Gel aufgetragen und eine Eichgerade angenähert wird. Zur Dokumentation der Gele wird das Gelscannersystems „Multi Image Light Cabinet“ (Alpha Innotech Corporation, San Leandro CA) verwendet.

8.6. Native Polyacrylamid Elektrophorese - Tris/Glycin System

Im Gegensatz zur SDS-PAGE wird bei der Nativen Gelelektrophorese kein Detergenz hinzugefügt und die Proteine bleiben in ihrer nativen d.h. aktiven Konformation erhalten. In dieser Arbeit wurde die Native Polyacrylamid Elektrophorese zum Nachweis der intramolekularen Komplexbildung von RevGFP genutzt, die in Anwesenheit des synthetisierten Cy3-RRE/HH Fragments unterbunden wird. Im nativen Gel wird die Ladung des untersuchenden Proteins bestimmt durch dessen isoelektrischen Punkt (pI) und dem jeweiligen pH-Wert des Laufpuffers. Der pH-Wert sollte hierbei so gewählt werden, dass die Proteine negativ geladen sind und zur Kathode wandern. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt in diesem Fall von der Größe des Proteins, seiner Ladung, der Gelmatrix und dem pH-Wert des Trenngels ab. Alle letztgenannten Komponenten sind bei diesem Versuch unverändert, so dass nur noch die Größe der RevGFP-Komplexe im Vergleich zum Monomer eine Rolle spielen. Das RevGFP-Protein besitzt einen theoretischen pI-Wert von etwa 5.98, so dass ein nativer Tris-Glycin Laufpuffer mit einem pH von 8.5 verwendet wird. Es werden ein 8 % Trenngel und ein 4 % Sammelgel gegossen.

Nach der Polymerisation wird das Native Polyacrylamidgel in die Kammer eingespannt und für 1 h im Kühlraum bei 4 °C und 80 V mit nativem Tris-Glycin Laufpuffer äquilibriert. Anschließend werden 0.1 nmol RevGFP-StrepTag (4.05 μ g) bzw. GFP-StrepTag mit der äquimolaren Menge an RRE-RNA versetzt und 10 min bei RT inkubiert. Vor

Tab. 8.4.: Herstellung der Polyacrylamidlösungen für native PAGE

<i>Komponenten</i>	<i>Angaben pro Gel</i>	
	<i>Trenngel</i>	<i>Sammelgel</i>
<i>d. H₂O</i>	8%	4%
Acrylamid Mix 40%	2.6 ml	0.625 mL
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.0 mL	0.1 mL
0.5 M Tris (pH 6.8)	1.3 mL	0.25 mL
10% Amps	50 μ l	10 μ l
TEMED	3 μ l	1 μ l

dem Auftrag aufs Gel werden die Proben noch mit der entsprechenden Menge an 5x nativem Probenpuffer ohne Bromphenolblau und β -Mercaptoethanol vermischt, sowie gegebenenfalls mit 1x Laufpuffer verdünnt. Als Größenstandard dient der ungefärbte „NativeMark“ Protein Standard (Invitrogen, Carlsbad CA). Die elektrophoretische Trennung der einzelnen Komplexe erfolgt über Nacht (ca. 17 h) im Kühlraum bei 4 °C und 30 V, dabei wird die Gelapparatur noch zusätzlich im Eisbad gekühlt, um ein Überhitzen des Gels während der langen Laufzeit zu verhindern. Die Banden werden, entsprechend der Angaben bei der SDS-PAGE, durch Färbung mit „SimplyBlue“ Färbelösung (Invitrogen, Carlsbad CA) sichtbar gemacht und anschließend dokumentiert.

8.7. Gel-Shift Assay als Bindungsnachweis

Die Grundlage des sogenannten Gel-Shift Assays zum Nachweis von Bindungen zwischen Proteinen und Nukleinsäuren, wie zwischen RevGFP und dem Cy3-RRE/HH Fragment, bildet die horizontale Agarosegelelektrophorese aus Abschnitt [7.3]. Im Falle einer Bindung zwischen Protein und RNA ergibt sich im Vergleich zur nackten RNA ein deutlich höherer hydrodynamischer Radius und damit aufgrund der kleinen Poren der Agarosematrix eine deutlich verlangsamte d.h. retardierte Wandergeschwindigkeit, die zu dem beobachteten Shift der detektierten RNA-Bande führt. Es werden je 2.11 μ g (0.1 nmol) Cy3-RRE/HH Fragment mit einem 4x molaren Überschuss an RevGFP-StrepTag (7.5 μ l) versetzt. Dementsprechend wird als Negativkontrolle ein 4x molarer Überschuss an GFP-StrepTag (5.07 μ l) zur RNA-Probe gegeben. Als Referenz für die Laufstrecke von reiner RNA dient eine weitere Cy3-RRE/HH Probe, zu der nur 7.5 μ l *d. H₂O* hinzugefügt werden. Nach der Inkubation der Proben für 20 min bei RT werden jeweils 1 μ l von jedem Ansatz mit 1 μ l 2x Gelshift-Probenpuffer und 1 μ l Mock3 Puffer gemischt und vollständig auf das 2% Agarosegel mit Ethidiumbromid (0.1 μ g/mL) aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt unter den in Abschnitt [7.3] genannten Standardbedingungen mit einer geringeren Spannung von 5.0 V/cm (Elektrodenabstand: 12.5 cm). Aufgrund der Ethidiumbromid Interkalation können die RRE/HH Fragmente mittels eines UV-Transilluminators bei 320 nm sichtbar gemacht und durch das Gelscanner-

system „Multi Image Light Cabinet“(Alpha Innotech Corporation, San Leandro CA) festgehalten werden.

9. Herstellung und Reinigung rekombinanter Proteine

9.1. Prokaryotische Proteinexpression mit Hilfe des Lac-Promotors

Größere Mengen eines gewünschten Proteins können in Prokaryonten wie *Escherichia coli* rekombinant hergestellt werden. Dabei wird ein kodierendes Plasmid mit einem *lac*-Operon vor der jeweiligen Proteinsequenz durch Transformation in die Bakterienzellen eingebracht. Das *lac*-Operon ermöglicht über eine Promotorregion das spezifische Anschalten der Genexpression nach Zugabe eines Induktors, der an den *lac*-Repressor bindet, so dass dieser von der Promotorregion abdissoziiert und somit die Bindestelle für die RNA-Polymerase freigibt. Bei Bakterien, die ein *lacI* Gen enthalten, wird IPTG als Induktor verwendet, welcher in der mittleren Wachstumsphase der Bakterien bei einer OD_{600} von 0.5-1.0 in einer Konzentration zwischen 0.01-5 mM zur Bakterienkultur gegeben wird. Die so induzierte Proteinexpression führt im Vergleich zu den *E. coli* Proteinen zu einer um 30 % gesteigerten Menge an rekombinantem Protein. Aufgrund einer geringeren Auswahl an Codons für einzelne Aminosäuren wie Arginin, Leucin, Prolin empfiehlt es sich bei der Expression längerer humaner Proteine, einen Bakterienstamm zu wählen, bei dem diese seltenen t-RNAs auf einem zusätzlichen Plasmid codiert sind. Die folgenden Proteine [9.1] wurden in dieser Arbeit, wenn nicht anders angegeben, in BL21(DE3)-RIPL Zellen (Fermentas, Ontario Canada) exprimiert.

Tab. 9.1.: In dieser Arbeit verwendete Proteine und deren Molekulargewichte

<i>Protein</i>	<i>[MG],kDa</i>	<i>Herstellung</i>
MBP	40.6	Katja Zerf (AG Peters)
BSA	66.4	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Crml	123.4	selbst hergestellt in TG-1
GFP	26.9	Katja Zerf (AG Peters)
GFP-StrepTag	27.9	Kamyar Hadian (GSF, Neuherberg)
RevGFP-StrepTag	40.9	Kamyar Hadian (GSF, Neuherberg)
RanGTP	24.9	Christine Nowak (MPI, Dortmund)
RanGDP	24.9	Katja Zerf (AG Peters)

9.2. Zellaufschluss mit Ultraschall

Das gewaschene Bakterienpellet wird in einem für das jeweilige Expressionsprotein geeigneten Lysepuffer mit Proteaseinhibitoren (je 1 μ l/mL Pepstatin, Leupeptin, und 0.1 mM

PMSF) und 2 mM β -Mercaptoethanol resuspendiert, so dass nach dem Quiagen Expressionshandbuch bei dem gegebenen Expressionslevel eine Proteinkonzentration bis maximal 20 mg/mL erreicht wird. Die Bakteriensuspension wird in 5 mL Aliquots auf vorgekühlte 14 mL konische Falcon-Röhrchen verteilt und mit Hilfe von Ultraschall aufgeschlossen. Hierfür wird die Mikrospritze des Branson Sonifier 250 (Brandson, Danbury CT) bis knapp über dem Boden der konischen Röhrchen in die Bakteriensuspension eingetaucht, um ein zu starkes Schäumen der Suspension zu verhindern. Anschließend werden die eisgekühlten Bakterien 5 x bei 50 % DutyCycle und Stufe 5, mit kurzen 30 s Ultraschallpulsen lysiert, wobei zwischen jedem Lysezyklus je 30 s pausiert wird, um eine Überhitzung der Probe zu vermeiden.

9.3. Affinitätschromatographie mit Ni-NTA Agarose

Die Liganden-Affinitätschromatographie mit Metallchelaten nach *E. Hochuli*⁴⁶ dient der spezifischen Reinigung eines exprimierten Proteins aus Gemischen nach der Bakterienlyse. Hierbei werden sogenannte Affinitätstags, wie z. B. 6-10 Histidinreste, molekularbiologisch an den C- oder N-Terminus der Proteinsequenz angehängt. Ein solches poly-Histidintag bindet spezifisch an die über einen Nitrilotriessigsäure (NTA)-Chelaten immobilisierten Ni^{2+} Kationen der jeweiligen Matrix [9.1], so dass alle unspezifisch assoziierten Proteine wie Metalloproteasen oder histidinreiche Proteine durch mehrmaliges Waschen entfernt werden können. Unspezifische Wechselwirkungen werden durch Zugabe von Detergenzien wie Triton100, hohe Ionenstärke des Puffers oder durch Zugabe von β -Mercaptoethanol vermindert. Das jeweilige Protein mit His-Affinitätstag kann entweder durch eine sprunghafte Erniedrigung des pH-Wertes auf 4.5-5.3 oder durch Zugabe eines konkurrierenden Liganden wie Imidazol stufenweise eluiert werden.

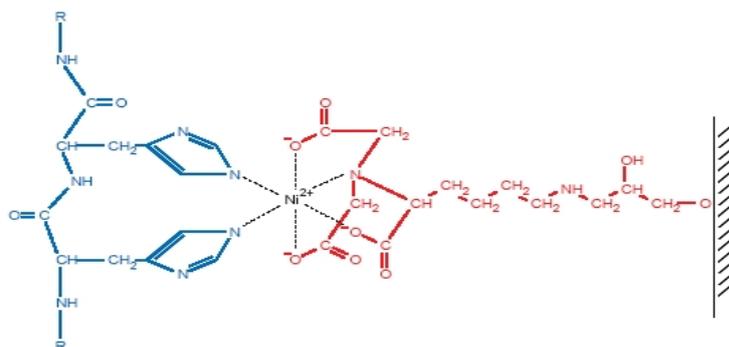


Abb. 9.1.: Ni^{2+} -Metallzentrum komplexiert mit Nitrilotriessigsäure (NTA) und Histidin

In dieser Arbeit wird ausschließlich Ni-NTA Agarose der Firma Quiagen (Hilden) als Matrix verwendet. Je nach Konzentration des exprimierten Proteins die geeignete Menge an Ni-NTA Agarose mit 10 mL *d. H₂O* von den Ethanolrückständen befreien und zweimal mit je 10 mL Waschpuffer äquilibrieren. Die Bindekapazität der Ni-NTA Agarose von Quiagen beträgt 5-20 mg/mL Matrix. Abhängig vom Expressionlevel wird das

Bakterienpellet für den Zellaufschluss nach [9.2] in der geeigneten Menge Lysepuffer mit 10 mM Imidazol resuspendiert. Den Überstand aus der Bakterienlyse mit dem jeweiligen affinitätsmarkierten Protein zur äquilibrierten Ni-NTA Matrix geben, inkubieren, zweimal mit Waschpuffer (20-50 mM Imidazol) waschen und bei einer Imidazolkonzentration von 100-300 mM stufenweise eluieren.

9.4. Gelfiltration

Die Abtrennung von niedermolekularen Verunreinigungen mit geringerem hydrodynamischen Radius erfolgt mit der Größen selektiven Gelfiltration. Deren Trennprinzip beruht auf dem molekularen Siebeffekt einer porösen Gelmatrix aus quervernetzter Agarose und kovalent gebundenen, unlöslichen Dextranketten. Im Gegensatz zu kleineren Molekülen, die sich im Partikelvolumen verteilen können, werden größere Moleküle an der Diffusion in die Gelporen gehindert. Sie wandern ohne Retardierung durch das Gelkompartiment und werden zu einem früheren Zeitpunkt eluiert. Wegen der relativ schlechten Auflösung und der starken Verdünnung der Probe eignet sich die Gelfiltration nur als eine ergänzende Reinigungsmöglichkeit zu anderen chromatographischen Verfahren. Das Superdex G-200 Agarosegel (max.Flussrate: 10-50 cm/h) wird bei 4 °C in kaltem Probenpuffer resuspendiert und kontinuierlich in eine 1.5 x 58 cm FPLC-taugliche Glaskapillare (Pharmacia, GE Healthcare Uppsala Schweden) gegossen. Die Säule wird anschließend an das Pharmacia FPLC-System angeschlossen, bei einer Flussrate von 1.5 mL/min weiter verdichtet und mit einem Säulenvolumen Probenpuffer äquilibriert. Für die präparative Gelfiltration werden etwa 1 mL Lösung mit bis zu 5 mg Proteingehalt über eine Probenschleife aufgetragen und bei einer Flussrate von 0.8 mL/min getrennt. Die Detektion der Proteine erfolgt mit einem UV-Detektor (Pharmacia, GE Healthcare, Uppsala Schweden) bei einer Wellenlänge von 280 nm. Die gesammelten 2 mL Fraktionen werden mit einem Bradford-Schnelltest nach [8.1] und einer SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nach [8.5] auf Proteingehalt und Trennerfolg hin überprüft. Anschließend werden die jeweiligen Fraktionen für die weitere Verwendung gepoolt und mit Amicon- Ultra Zentrifugensfiltern (Millipore, Bedford MA) bis zur gewünschten Konzentration eingeeengt.

9.5. Anionenaustausch-Chromatographie

Bei der Ionenaustausch-Chromatographie binden Proteine in Abhängigkeit vom pH-Wert des Puffers und ihrem isoelektrischen Punkt an die kationischen oder anionischen Gruppen einer Gelmatrix und können wegen der elektrostatischen Wechselwirkung durch eine Erhöhung der Ionenstärke des Puffers leicht eluiert werden. Die hier verwendete Q-Sepharose enthält immobilisierte quartäre Ammoniumionen mit einer hohen Affinität für anionische Substrate. Deshalb sollte der pH-Wert des verwendeten Q-Sepharosepuffers mindestens eine pH-Einheit über dem pI-Wert des jeweiligen Proteins liegen d.h. im Fall von Crm1 (pI = 5.7) bei pH \geq 6.7, um eine ausreichend stabile elektrostatische Bindung zu erreichen. Die Bindekapazität der verwendeten Q-Sepharose

„Fast Flow“ (GE Healthcare, Uppsala Schweden) liegt bei 0.18 mmol/mL, wobei davon nur 10-20 % d.h. 18-36 $\mu\text{M}/\text{mL}$ genutzt werden. Die Crm1-Gelfiltrationsfraktionen werden zunächst mit Amicon-Ultra Zentrifugenfilter eingengt und aufgrund des hohen Salzgehalts gegen den Q-Sepharose Bindepuffer umgepuffert. Zur leichteren Handhabung werden für etwa 11 μM Crm1 1.5 mL Gelmatrix entnommen und zweimal mit je 10 mL Bindepuffer gewaschen. Die Zentrifugation erfolgt für jeweils 5 min bei 4 °C und 3000 rpm. Crm1 bei 4 °C für 10 min unter leichtem Schütteln an die Matrix binden lassen, anschließend eine Säule gießen und die Sepharose 2 x mit je 3 mL kaltem Bindepuffer waschen. Die Elution erfolgt bei 4 °C stufenweise mit ansteigender NaCl-Konzentration (50, 100, 200, 333 und 500 mM), wobei je 500 μl Fraktionen gesammelt werden. Die weitere Analyse erfolgte wie in Abschnitt [9.4] angegeben.

9.6. Ammoniumsulfatfällung

Die Löslichkeit eines Proteins wird maßgeblich durch die Beschaffenheit des wässrigen Lösungsmittels, dessen Ionenstärke, pH-Wert und Temperatur bestimmt. Dabei können Proteine bei geringer Salzkonzentration wegen des abschirmenden Effekts der Gegenionen (Debye-Hückel) zunächst in Lösung gebracht werden, bis sie dann ab einer bestimmten Salzkonzentration präzipitiert werden, was als Aussalzen bezeichnet wird. Letzteres Verhalten ist vollständig reversibel und wird nach *F. Hofmeister*⁴⁷ auf eine Reduktion der verfügbaren solvatisierenden Lösungsmittelmoleküle zurückgeführt, da die zugegebenen Salzionen mit dem Protein um die Solvathüllen konkurrieren. Dies bedeutet, dass bei Mangel an Solvationen die Interaktion zwischen Protein und Lösungsmittel einen geringeren energetischen Beitrag zur freien Gibbs-Energie leistet, als die intramolekularen Protein-Protein Interaktionen. So kommt es zur Aggregation des Proteins und zur Bildung eines Präzipitats. Bei der Fraktionierung von Proteingemischen werden durch Zugabe steigender Ammoniumsulfatkonzentrationen bestimmte Untergruppen voneinander getrennt. In dieser Arbeit wurde die Ammoniumsulfatfällung als Vorstufe zur Affinitätsreinigung des Crm1 Proteins verwendet.

9.7. Expression und Reinigung von Crm1

Der pQE-Crm1 Vektor, erhalten von *L. Engelmeier*,²⁸ wurde zur Expression von Crm1 mit einem C-terminalen sechsfachen Histidin-Affinitätsmarker verwendet. Hierfür 20 mL LB-Medium plus 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin mit dem *Escherichia coli* Stamm TG-1 animpfen und als Vorkultur über Nacht bei 23 °C im Schüttler inkubieren. Die Vorkultur $\approx 1:50$ verdünnen, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ Ampicillin zugeben und das Protein ohne Induktion über Nacht bei 23 °C und 250 rpm exprimieren. Das Zellpellet einmal mit Crm1 Ni-NTA-Waschpuffer1 inklusive Proteaseinhibitoren und 10 mM Imidazol waschen, für 10 min bei 4 °C und 6000 rpm mit dem Sorvall GS-3 Rotor pelletieren und anschließend in 50 mL kaltem Crm1 Ni-NTA-Lysepuffer resuspendieren oder das Pellet zur Lagerung in fl. N_2 schockgefrieren. Der Zellaufschluss erfolgt mit Ultraschall unter den bei [9.2]

genannten Standardbedingungen. Die Zellbestandteile und unlöslichen Proteine werden mit dem Sorvall SS-34 Rotor bei 4 °C und 16 000 rpm für 30 min pelletiert und das Crm1 Protein aus dem Überstand bei 4 °C für 5 min mit 35 % [w/v] $(NH_4)SO_4$ gefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 10 min bei 16 000 rpm und 4 °C wird das Präzipitat in 20 mL Ni-NTA-Waschpuffer resuspendiert und zu 3 mL gewaschener und äquilibrierter Ni-NTA Agarose gegeben. Crm1 unter Schütteln für 30 min bei 4 °C an die Ni-NTA Agarose binden lassen. Anschließend wird die Ni-NTA Agarose 6 x mit Waschpuffer2 (20 mM Imidazol) gespült und das Crm1 mit 8 mL Ni-NTA-Elutionspuffer (260 mM Imidazol) in 500 μ l Aliquots eluiert. Zur Identifikation der proteinhaltigen Fraktionen wird ein Bradford-Schnelltest nach [8.1] durchgeführt und die jeweiligen Fraktionen auf einem analytischen SDS-Gel auf den Gehalt und die Reinheit des exprimierten Proteins hin untersucht. Gegebenenfalls werden weitere Schritte zur Abtrennung von Verunreinigungen geringeren Molekulargewichts unter Verwendung einer Sephadex G-200 Gelfiltrationssäule [9.4] oder einer Q-Sepharose Ionenaustauschersäule [9.5] durchgeführt.

10. Durchführung der Optischen Einzeltransporter Analyse (OSTR)

Die von *R. Peters*¹¹³ entwickelte Methode zur Analyse von einzelnen Membrantransportern, bereits bekannt unter dem Namen OSTR, wurde hier in veränderter Form für die Analyse von Transporterensembeln verwendet. Untersuchungsobjekt sind die Kernporenkomplexe in isolierten *Xenopus laevis* Membranen. Die in dieser Arbeit benutzten Messvertiefungen, die in Anlehnung an die OSTR-Methode ebenfalls als TCs bezeichnet werden, haben, wenn nicht anders angegeben, einen Durchmesser von $50\ \mu\text{m}$. Demnach befinden sich in der TC-Fläche von $1964\ \mu\text{m}^2$ bei einer mittleren NPC-Dichte von $50\ \text{NPC}/\mu\text{m}^2$ etwa 98175 Kernporen, so dass alle gemessenen Ratenkonstanten für den Transport durch den NPC als Mittelwerte angesehen werden müssen. Die tatsächliche Kernporenanzahl kann dabei noch höher liegen, da die Membran nicht unbedingt völlig planar auf den Vertiefungen liegt. Demnach werden die Ratenkonstanten für einzelne Transporter nur statistisch zugänglich, wenn Messarrays mit TCs verwendet werden, die einen Durchmesser von $100\ \text{nm}$ besitzen, was einer mittleren NPC-Anzahl von $1.5\ \text{NPCs}/\mu\text{m}^2$ entspricht.

10.1. Herstellung einer Messkammer

Zur Herstellung von Messvertiefungen, sogenannten „Test Chambers“ (TCs), für die fluoreszenzmikroskopische Analyse von Membrantransportern eignen sich optisch transparente Materialien, die entweder leicht strukturierbar sind, wie z.B. Polykarbonat oder sich durch einen niedrigen Brechungsindex, in der Nähe von wässrigen Lösungen auszeichnen, wie z.B. TeflonAFTM oder TeflonFEP. Messkammern aus Polykarbonat werden von der Firma Bartels Mikrotechnik GmbH (Dortmund) mittels Laserablation hergestellt. Dabei wird ein Feld mit leicht konischen Vertiefungen (Oberflächenmaße: $50 \times 50\ \mu\text{m}$) mit einem Mittelpunktsabstand von $100\ \mu\text{m}$ in eine $250\ \mu\text{m}$ dicke Polykarbonatfolie gebrannt. Dieses Messfeld wird anschließend mit einem Einkomponentenkleber (Serva, Heidelberg) unter ein $3.5\ \text{mm}$ Loch geklebt, welches mittig in eine $60 \times 15\ \text{mm}$ Zellkulturschale aus Polystyrol (Falcon) gebohrt wurde. Somit entsteht eine Messkammer mit einem Puffer-Reservoir von ungefähr $19.24\ \text{mm}^3 (\equiv \mu\text{l})$ über den Messvertiefungen, das die Integrität der verwendeten, isolierten Kernmembranen aus *Xenopus laevis* Oozyten, sowie auch anderer biologischer Membranen garantiert. Die Messkammern können nach Verwendung gegebenenfalls gereinigt werden. Dazu werden die Messkammern zunächst direkt nach der Messung mit $70\ \%$ EtOH gespült, anschließend mit *d.H₂O* im Ultraschallbad $15\ \text{min}$ gereinigt, sowie $1.5\ \text{min}$, bei $50\ \%$ Leistung im Plasmacleaner (Diener Elektronik, Nagold) mit Luftplasma behandelt.

10.2. Beschichtung der Polykarbonatoberfläche mit SMCC

Zur besseren Anheftung der Kernmembranen auf der Polykarbonatoberfläche, welche eine bessere Versiegelung der Messvertiefungen garantieren soll, wird die Oberfläche des Messfeldes mit SMCC, einem heterobifunktionalen Linker, beschichtet. Der Hydroxysuccinimidyl-Teil des Linkers reagiert in wässrigen Lösungen bei einem leicht basischen pH von 7.0-8.5 mit primären Aminen, während die Maleimid-Gruppe am anderen Ende des Linkers bei neutralem pH von 6.5-7.5 nach dem Schema [8.2] mit Thiolgruppen reagiert, wie z.B. mit den Cysteinen einiger Kernmembranproteine.¹¹⁶ Die Oberflächenkopplung mit den primären Aminen erfolgt dabei nach folgendem Reaktionsschema [10.1], wodurch letztendlich eine heterobifunktionale Kopplung zwischen primären Aminen und Cysteinen erreicht wird:

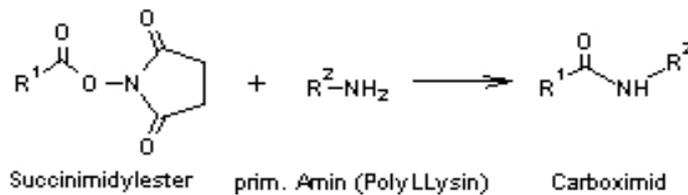


Abb. 10.1.: Reaktion eines primären Amines mit einer Succinimidylgruppe

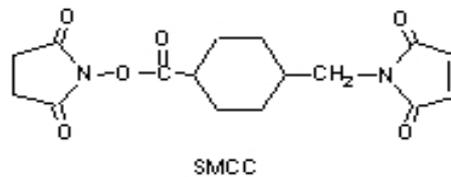


Abb. 10.2.: Strukturformel von SMCC

Die gereinigten oder frisch-geklebten Messkammern werden kurz vor der Beschichtung im Plasmacleaner (Diener Elektronik, Nagold) für 1 min bei 50 % Leistung durch Luftplasma aktiviert und direkt im Anschluss bei RT für 10 min mit 20 μl einer 0.01 prozentigen (70-150 kDa) Poly-L-Lysin Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) behandelt. Die Oberfläche des Messfeldes wird kurz mit *d. H₂O* gespült, um überschüssiges, nicht adsorbiertes Poly-L-Lysin abzuwaschen, und an der Luft getrocknet. 1.26 mg SMCC werden in 60 μl DMSO gelöst und nach Zugabe von 240 μl 50 mM KPi-Puffer, pH 7.9 sofort auf die getrocknete Poly-L-Lysin beschichtete Oberfläche gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei RT werden die Messkammern gut mit *d. H₂O* gespült und anschließend erneut an der Luft getrocknet. Die so funktionalisierte Polykarbonatoberfläche kann bis zu einer Woche verwendet werden.

10.3. Isolation der Oozyten Nuclei aus *Xenopus laevis*

In dieser Arbeit wurden ausschließlich manuell isolierte Kernmembranen aus den Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches (*Xenopus laevis*) verwendet. Deren Haltung bei einem konstanten Tag/Nacht Zyklus (12 h/12 h) und bei konstanten Wassertemperaturen garantiert frische Oozyten gleicher Qualität. Die Haltung der *Xenopus laevis* Frösche übernahm das Institut für Physiologie II des UKMs (AG Oberleithner), sowie auch die wöchentliche operative Entfernung der Oozyten aus der Bauchhöhle der Frösche. Eine genauere Beschreibung der artgerechten Haltung und die einzelnen Schritte der Operation sind ausführlich auf der Homepage des Institutes (<http://physiologieii.klinikum.uni-muenster.de/forschung/frogs-text.html>) beschrieben. Die frischen Ovarien, welche Oozyten der verschiedensten Stadien von I-VI enthalten, können bei 10 °C in Amphibien Ringerlösung bis zu einer Woche aufbewahrt und verwendet werden, sofern der Puffer täglich erneuert wird. Isolierte Kernmembranen kleben sehr leicht und fest auf allen Glas- sowie Plastikoberflächen. Das gesamte Präparationszubehör wird deshalb über Nacht bei 4 °C mit 1 mg/mL BSA in PBS Puffer beschichtet, um ein Kleben zu verhindern.

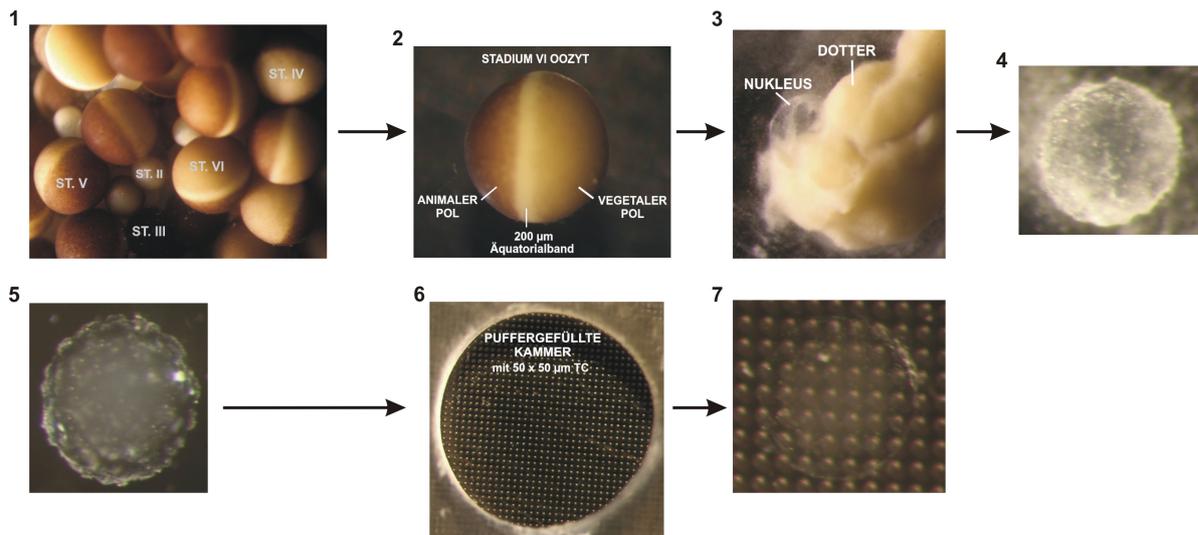


Abb. 10.3.: Präparationschritte gereinigter Oozyten Nuclei aus *Xenopus laevis*

1: Ausschnitt des *Xenopus laevis* Ovars mit Oozyten der Stadien II-VI; **2:** Stadium VI Oozyt mit hellem Äquatorialband, links: animaler, rechts: vegetaler Pol; **3:** Stadium VI Oozyt wird mit zwei Pinzetten aufgerissen bis der durchsichtige Nucleus sichtbar wird; **4:** Nucleus mit Dotterbestandteilen (weiß); **5:** gereinigter Nucleus vor dem Transfer in die puffergefüllte Messkammer (6); **7:** Intakter Nucleus angeheftet auf der Polykarbonatoberfläche

Die Abbildung [10.3] zeigt einzelne Momentaufnahmen der jeweiligen Schritte bei der Kernpräparation. Die Oozyten des Stadiums VI mit einem deutlich sichtbaren weißen Äquatorialband werden zunächst in Amphibien Ringerlösung vereinzelt, indem sie mit einer Pinzette vom Ovar getrennt werden. Die vereinzelt Oozyten werden mit einer

Pasteurpipette (> 1.5 mm Durchmesser) in eine BSA-beschichtete Präparationsschale (30 x 5 mm) mit Mock3 Puffer überführt und dort mit Hilfe von 2 spitzen Pinzetten (Dumont, No.5) in der Nähe des Äquatorialbandes aufgerissen. Zur Beobachtung dient hierbei ein Stereomikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar) mit einer Kaltlichtlampe, um eine starke Erhitzung der Proben zu vermeiden. Eine seitliche Beleuchtung erhöht hierbei aufgrund von Streueffekten den Kontrast, so dass der durchsichtige Nukleus leichter zu erkennen ist. Die Dotterbestandteile werden anschließend mit einer stumpfen, dünnen Glaskapillare nach *R. Peters*⁸⁰ vom Nukleus entfernt. Zur weiteren Reinigung wird dieser in frischer Mock3 Lösung vorsichtig mit einer Pipette gespült. Die Schwellung des Nukleus während der Reinigung ist bis zu einem gewissen Grad erwünscht, da nur hierdurch das Andrücken des Nukleus auf der Oberfläche des Messfeldes zur Versiegelung der Messvertiefungen möglich wird.

10.4. Präparation der Kernmembran in der Messkammer

Die Präparation der Kernmembran kann sowohl auf unbeschichteten, wie auf beschichteten Messfeldern erfolgen. Hierzu wird die Messkammer zunächst mit $20 \mu\text{l}$ Mock3 Puffer befüllt, wobei die Luftblasen in den Messvertiefungen im Fall einer beschichteten Oberfläche durch Klopfen bzw. im Fall der unbeschichteten Oberfläche mit Ultraschall entfernt werden. Mit einer Pipette, bei der der Spitzendurchmesser auf ≈ 2 mm angepasst wurde, wird der gereinigte Nukleus auf der Oberfläche des Messfeldes platziert und mit Hilfe der stumpfen Glaskapillare vorsichtig angedrückt, bis er aufgrund der planaren Haftfläche eine kuppelförmige Struktur annimmt. Besonders feine Edelstahl-Präparationsnadeln (Fine Science Tool, Heidelberg), die in einen Halter eingespannt sind, dienen dazu, den Kern aufzureißen und das kondensierte, graue Chromatin zu entfernen. Der Kern wird so stark perforiert, dass seitlich nur noch sehr dünne Membranreste stehen bleiben. Die präparierte Kernmembran auf dem Messfeld wird dreimal vorsichtig mit je $15 \mu\text{l}$ frischem Mock3 Puffer gespült, wobei das Chromatin ebenfalls entfernt wird.

10.5. Messung des Membrantransportes mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

Die Entwicklung der konfokalen Mikroskopie in Form des CLSMs führte zu einer deutlich verbesserten Auflösung in z-Richtung, d.h. Ausbreitungsrichtung des kohärenten Laserlichts und somit zu einer erhöhten Bildschärfe. Die höhere Auflösung wird dabei durch zwei aufeinanderabgestimmte d.h. konfokale Lochblenden jeweils eine im Strahlengang für die Illumination und für die Detektion erreicht. Die in der Bildebene des Mikroskops positionierte veränderbare Aperturblende des Detektionsstrahlengangs wird dabei verwendet, um die aus den Ebenen oberhalb und unterhalb der Fokusebene stammende Fluoreszenzstrahlung auszublenden. Während die nach dem Lasersystem geschaltete Blende des Illuminationsstrahlenganges das anregende Laserlicht auf die zur Bildebene

gehörende Objektebene fokussiert. In der Regel wird die Detektionslochblende auf die Größe einer Airy-Unit d.h. auf die Größe des Hauptmaximums der Punktverwaschungsfunktion [siehe 11.4] eingestellt. Des Weiteren werden Fluoreszenzfilter vor das jeweilige Detektorsystem gesetzt, um das gestreute, kurzwelligere Anregungslaserlicht gegenüber dem gewünschten langwelligen Fluoreszenzsignal vollständig herauszufiltern. In dieser Arbeit wurde das inverse CLSM TCS SPE DMI4000 von Leica Microsystems (Wetzlar) benutzt, welches für die Anregung bei 488 nm (GFP), 532 nm (Cy3, Alexa568) und 633 nm (Atto637, TRD70, Alexa633) einen Festkörperdiodenlaser enthält. Die serielle Anregung ermöglicht die simultane Messung mehrerer Fluoreszenzkanäle. Die Detektion erfolgt hierbei mit einer Avalanche Photodiode.

In dieser Arbeit wurde die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie hauptsächlich verwendet, um Änderungen der Fluoreszenzintensität als Folge von Transportvorgängen durch den NPC in den $50 \times 50 \mu\text{m}$ Vertiefungen des Messfeldes zu detektieren. Hierfür werden die Messarrays sofort nach der Präparation einer frischen, gereinigten Kernmembran nach [10.4] auf dem Objektisch des Mikroskops festgeklemmt und die konfokale Beobachtungsebene mit Hilfe des Piezo-getriebenen Tisches auf eine geeignete Position unterhalb der Oberfläche der Messarrays eingestellt. Als geeignete Position erweist sich eine Ebene, die weder zu nahe an der Oberfläche noch zu nahe am Boden der Messvertiefungen liegt und noch ein gutes Fluoreszenzsignal liefert. Es wird in Abhängigkeit von den Fluoreszenzsubstraten ein geeigneter Strahlengang bzw. eine Anregungswellenlänge ausgewählt und unter den gegebenen Messbedingungen ein 512×512 Pixel großes Bild der Messvertiefungen zum Zeitpunkt Null d.h. vor der Zugabe einer Transportlösung aufgenommen. Es ist darauf zu achten, dass sich im Messfeld sowohl membranbedeckte Vertiefungen (TCs) als auch offene Referenz-Vertiefungen (Referenz-TCs) befinden. Zu jeder einzelnen Transportlösung, die das zu untersuchende Protein und eventuelle Cofaktoren enthält, wird ein inertes fluoreszenzmarkiertes Kontrollsubstrat mit vergleichbarem Molekulargewicht hinzugegeben. Dadurch kann die Membrandichtigkeit überprüft und der möglicherweise vorhandene Leckstrom bestimmt werden.

Tab. 10.1.: Inerte Fluoreszenz-markierte Substrate als Dichtigkeitskontrolle

<i>Protein</i>	<i>Markierung</i>	<i>[MG], kDa</i>
MBP	Atto-637	41.3
MBP	Alexa-546	41.6
BSA	Atto-637	67.1
Dextran	TexasRed	≈ 70.0

Anschließend werden unter Verwendung einer speziellen Gelbeladungsspitze („gel loading tip“) vorsichtig je $10 \mu\text{l}$ Transportmix mit 100 mM Saccharose seitlich in die Messkammer getropft und sofort im Anschluss bei einer Scanrate von 400 Hz eine Zeitserie mit minimalen Abständen zwischen den einzelnen Fluoreszenzkanälen gestartet, wobei das Signal pro Bild zweimal gemittelt wird. Hierbei ist die gemessene Fluoreszenzintensität nur dann proportional zur Proteinkonzentration, wenn bei den aufgenommenen Fluoreszenzbildern die Helligkeit der Pixel nicht im Bereich der Sättigung des Detektors

liegt. Deshalb wird bei allen Experimenten durch geeignete Wahl der Laserintensität, der Detektorverstärkung und der Fluorophorkonzentration darauf geachtet, dass keine Sättigung der Pixel eintritt. Die Betrachtung und erste Auswertung der Zeitserien erfolgt mit der kostenlosen Bildbearbeitungssoftware ImageJ 1.37v (Wayne Rasband NIH, USA).

10.6. Auswertung der Zeitserien

Die xy-Aufnahmen der Fluoreszenzkanäle werden getrennt und mit ImageJ 1.37v als zeitlich geordneter Bildstapel geöffnet. Anhand eines im Durchlichtkanal aufgenommenen Membranbildes werden die membranbedeckten und die offenen Vertiefungen festgelegt. Im z-Projektionsbild des Referenz-Bildstapels werden runde 12 x 12 Pixel (12.9 x 12.9 μm) große Bereiche (*ROIs*) in die Mitte jeder ausgewählten Vertiefung gelegt und gleichzeitig ein 30 x 512 Pixel großes rechteckiges Feld als Hintergrundbereich über die gesamte Breite des Bildes definiert. Die Positionen aller *ROIs* werden mit Hilfe des „MultiMeasure Plugins“ von ImageJ gespeichert. Im Anschluss wird für alle Kanäle die Fluoreszenzintensität jedes Bereichs gemessen. Die entsprechende Ergebnisdatei im ASCII-Format enthält pro Spalte jeweils die zu allen Zeitpunkten gemessene Fluoreszenzintensität eines bestimmten *ROIs*, gemittelt über dessen Fläche. Die graphische Darstellung der Intensitätsänderung pro Zeit, die Annäherung der theoretischen Exponentialfunktion zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten, sowie die folgende Berechnung des molekularen Flusses wird mit Hilfe der Auswertungssoftware Origin[7.0] (OriginLab Corporation Northampton, MA) erreicht.

10.7. Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten und des molekularen Flusses

Die Ergebnisdateien aus der ImageJ Auswertung werden mit einem speziell für die OSTR-Methode entwickelten Labtalk-Skript (Phillipp Lechrich, AG Peters) geöffnet, das eine individuelle und schnelle Auswertung der Bilddaten inklusive exponentiellem Fit und Berechnung des molekularen Flusses Φ ermöglicht. Das Skript erfordert dabei die Eingabe mehrerer Parameter, wie das Volumens der OSTR-Kammer, die verwendeten Substratkonzentrationen, die Anzahl der Kanäle, die Dimension der Vertiefungen, sowie die Anfangszeit und das Messintervall. Im Anschluss wird die gemittelte Hintergrundfluoreszenz von der Fluoreszenzintensität jedes einzelnen *ROIs* abgezogen und die so erhaltenen Werte auf die ebenfalls gemittelte Intensität der offenen Referenz-Vertiefungen normiert. Deren Fluoreszenzwerte liegen somit zwischen 0 und 1 d.h. zwischen 0 % und 100 % im Vergleich zur maximalen Intensität nach Erreichen des Gleichgewichts. Die so erhaltenen relativen Werte werden gegen die Zeit aufgetragen und deren Verlauf nach Gleichung [3.12] unter Verwendung des Levenberg-Marquardt-Algorithmus mit einer monoexponentiellen Funktion angenähert. Im Fall einer passiven Diffusion ergibt

sich eine allgemeine Geschwindigkeitskonstante k für den richtungsunabhängigen Membrantransport durch den NPC. Dagegen liefert der Fit im Fall eines bindingsabhängigen Transportes die Geschwindigkeitskonstante k'_a für die Rückdiffusion aus den TCs. Die molekulare Flussrate Φ in Molekülen pro NPC pro Sekunde errechnet sich aus den ermittelten Geschwindigkeitskonstanten k_a bzw. k'_a multipliziert mit der Substratkonzentrationen und dem Maximalwert der Exponentialfunktion nach Gleichung [3.18]. In einigen Fällen kann es notwendig sein, die Geschwindigkeit des schnellen Einstroms vorhandener freier Fluorophore am Beginn der Messung zu bestimmen. Dazu werden die normierten Intensitätswerte logarithmiert und gegen die Zeit aufgetragen, so dass sich eine halblogarithmische Auftragung ergibt. An die Anfangswerte, die den Einstrom freier Fluorophore beschreiben, kann nun mit dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus eine Geradengleichung angenähert werden, deren Steigung die Geschwindigkeitskonstante für den Einstrom der Fluorophore ergibt. Die Bestimmung des prozentualen Anteils an freiem Fluorophor erfolgt aus dem y-Achsenabschnitt einer weiteren Geraden, die ebenfalls in einer halblogarithmischen Auftragung an die Messwerte des exponentiellen Anstiegs angenähert wird.

11. Herstellung neuer Messarrays aus Teflonmaterialien

Wie bereits im Abschnitt [10] erwähnt wird die Entwicklung von parallelen Vertiefungen mit Durchmessern von 160-356 nm d.h. $< 1 \mu\text{m}^1$ in einem für die Fluoreszenzmikroskopie geeigneten Material notwendig, um von der Analyse eines Transporterensembles zur Analyse eines einzelnen Transporters zu gelangen und somit eine breitere Anwendung auf unterschiedliche Membrantransportprozesse zu ermöglichen. Dies stellt besondere Anforderungen an das zu verwendende Material. Dieses sollte nicht nur leicht mikro- bis nanostrukturierbar sein, sondern ebenso gute optische Eigenschaften, wie hohe Transmissionsraten im Wellenbereich von 480-700 nm, geringe Autofluoreszenz und einen Brechungsindex n_D im Bereich wässriger Lösungen von 1.33 besitzen. Die Anpassung des Brechungsindex des Materials an das umgebende Medium erweist sich bei kleinen Vertiefungen als unabdingbar, um eine Auslöschung des Fluoreszenzsignals durch Streuung an den Materialgrenzflächen zu verhindern. Die folgende Tabelle [11.1] zeigt alle in dieser Arbeit getesteten Materialien, die diese Bedingungen erfüllen.

Tab. 11.1.: Liste der Materialien zur Herstellung neuer OSTR-Messarrays

<i>Material</i>	<i>Hersteller</i>	n_D	$[Transmission],\%$
Polykarbonat	Verschiedene	$\approx 1.58 - 1.59$ ^a	78-91 ^a
Cytop	Asahi Glass	1.34	> 95
CTL-809M			(200 μm ; 400-700 nm)
TeflonAF TM	DuPont	1.31	> 95
601S2 100-6			(220 μm ; 500-2000 nm)
TeflonFEP	DuPont	1.34 - 1.35	96
50C			(12.5 μm ; 500-3000 nm)

^a www.matweb.com; material property database

11.1. Spincoating von TeflonAFTM und Cytop

„Spincoating“ beschreibt eine in der Mikrolithographie häufig genutzte Beschichtungsmethode, bei der durch hohe Rotationsgeschwindigkeiten ein dünner homogener Film einer Polymerlösung auf eine Oberfläche aufgebracht wird. Die Schichtdicken liegen je nach Viskosität der Lösung und Beschichtungsparameter im Bereich von 10 nm bis 100 μm . Die Beschichtungen erfolgen ausschließlich unter Reinraumbedingungen, um die Anheftung von Staubpartikeln zu verhindern, die häufig fluoreszieren oder im beschichteten

¹Annahme: mittlere NPC-Dichte von 50 NPC/ μm^2 ; runde Vertiefungen

Präparat als Störquellen wirken. 24 x 24 mm Deckgläser mit einer Dicke zwischen 160-180 μm (Engelbrecht Labortechnik,) werden in einer vertikalen Halterung nacheinander in jeweils ungefähr 500 ml Aceton, EtOH, *d. H₂O* mit Tween20 und *d. H₂O* gestellt, für je 10 min im Ultraschallbad gereinigt und anschließend auf einer Heizplatte getrocknet. Die getrockneten und gereinigten Deckgläser werden mittig auf den „Spincoater“ P6700 (Specialty Coating Systems, Indianapolis IN) gelegt und das jeweilige Beschichtungsprotokolls nach dem dargestellten Schema [11.1] eingegeben. Anschließend werden $\approx 100 \mu\text{l}$ der Polymerlösung auf die Oberfläche pipettiert und das Programm gestartet.

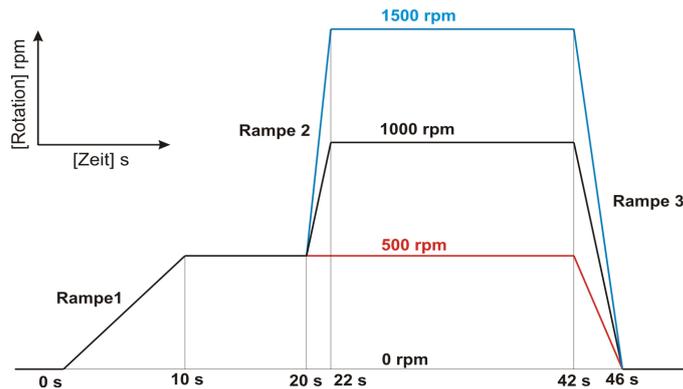


Abb. 11.1.: Schematische Darstellung der TeflonAFTM Beschichtung

Das Deckglas wird dabei mit einem Vakuum auf der Halterung festgesaugt und die überschüssige Polymerlösung bei der angegebenen Geschwindigkeit abgeschleudert, wobei sich wegen des Überschusses an Polymerlösung am Rand eine dickere Schicht ausbildet. Zur Aushärtung des TeflonAFTM und besseren Verbindung mit dem Glasträger werden die beschichteten Deckgläser bei 110 °C für 3 h auf eine Heizplatte gelegt und im Anschluss für 20 h im Heißluftofen bei 55 °C gebacken. Bei der Verwendung von Cytos 809M werden die beschichteten Deckgläser zunächst für 90 s bei 100 °C auf der Heizplatte gehärtet und zur weiteren Entfernung des Lösungsmittels für 60 min bei 200 °C im Heißluftofen erhitzt.

11.2. Schichtdickenbestimmung

Zur Bestimmung der Dicke der jeweiligen transparenten Polymerschicht in Abhängigkeit von der verwendeten Rotationsgeschwindigkeit wird eine Gefrierbruchtechnik mit anschließender Phasenkontrastmikroskopie verwendet. Die beschichteten 160-180 μm Deckgläser werden auf der Glasrückseite vorsichtig mit einem Glasschneider angeritzt und bei -80 °C in fl. N₂ an der durch den Glasschneider angeritzten Stelle vorsichtig durchgebrochen. Das Deckglas wird senkrecht in eine Halterung eingespannt und mit der Kamera eines Phasenkontrastmikroskops (Olympus BX41, Hamburg) eine Aufnahme an mehreren geraden Stellen der Bruchkante gemacht. Die Dicke der Polymerschicht

wird aus den Werten an drei Positionen ermittelt, die ihrerseits aus 40 unabhängigen Messpunkten bestehen.

11.3. Strukturierung durch Nanoimprinting und Focussed Ion Beam (FIB)

Die sogenannte Nanoimprinting Lithographie (NIL) eignet sich zur parallelen, hochauflösenden Strukturierung von Oberflächen im Bereich von 1 nm bis 100 μm , bei der ein thermoplastisches Material durch mechanische Einwirkung eines Stempels bei 10-100 bar verformt wird. Die Herstellung von 3 μm tiefen Löchern mit Durchmessern von 250 nm (pitch: 2 μm), 500 nm (pitch: 3 μm) und 3 μm (pitch: 12 μm) mittels thermischer Verformung der TeflonFEP-Folie erfolgte am Bessy AZM (Berlin) durch Herrn Dipl.-Ing. Josef Kouba. Im Fall von TeflonFEP 50C wird die Folie mit der haftenden C-Seite nach unten auf ein 24 x 24 mm gereinigtes Deckglas gelegt und zunächst unter Druck möglichst luftblasenfrei auf die Glasoberfläche laminiert. Dagegen kann das TeflonAFTM nach dem Spincoating direkt für die Strukturierung verwendet werden. Der vorher strukturierte Siliziumstempel mit der gewünschten Positivstruktur wird in das erwärmte TeflonFEP bzw. TeflonAFTM gedrückt, so dass das Teflonmaterial an diesen Stellen verdrängt wird und nach dem Abkühlen gleichmäßige parallele Vertiefungen der jeweiligen Größe entstehen. Im Fall von TeflonAF und Cytop 809M wird nach den unter [11.1] gemachten Angaben eine 4 μm dicke Schicht auf einem Deckglas aufgebracht und anschließend mit einem „Focussed Ion Beam“Gerät aus der Abteilung für Festkörperphysik der Universität Bochum (Prof. Wieck) ein regelmäßiger Array von rechteckigen 3 x 3 μm großen Vertiefungen mit einem Mittelpunktsabstand (pitch) von 12 μm hergestellt. Bei dem verwendeten Zweistrahlgerät wird das Material an den gewünschten Stellen mit einem fokussierten Galliumionenstrahl unter paralleler elektronenmikroskopischer Kontrolle abgetragen. Die Vertiefungen mit einer Tiefe von 2 μm werden somit nicht parallel, sondern seriell erzeugt, so dass dieser Prozess deutlich langsamer verläuft als das Nanoimprinting Verfahren.

11.4. Messung der Punktverwaschungsfunktion (PSF)

In der konfokalen Mikroskopie entsteht bei der Abbildung eines punktförmigen Objektes durch die Beugung des Lichtes an der zirkulären Apertur ein charakteristisches Beugungsbild. Dessen Intensitätsverteilung wird in der xy-Ebene als Airydisk bezeichnet und wird durch eine Punktverwaschungsfunktion beschrieben. Das Hauptmaximum dieser Funktion kann bei einem idealen optischen System durch eine Gaussfunktion angenähert werden. Demnach bestimmt sich nach dem Rayleigh Kriterium das räumliche Auflösungsvermögen eines konfokalen Mikroskops durch den minimalen Abstand zweier punktförmiger Objekte, die genau dann noch voneinander unterscheidbar sind, wenn das Maximum der Gaussfunktion des ersten Objektes mit dem Minimum der Gaussfunktion des zweiten Objektes zusammenfällt. Experimentell wird jedoch die Halbwertsbreite

(FWHM) der ermittelten Gaussfunktion als Maß für das Auflösungsvermögen des Mikroskops unter den gegebenen Bedingungen (Wellenlänge, Objektiv, Brechungsindex etc.) angegeben.

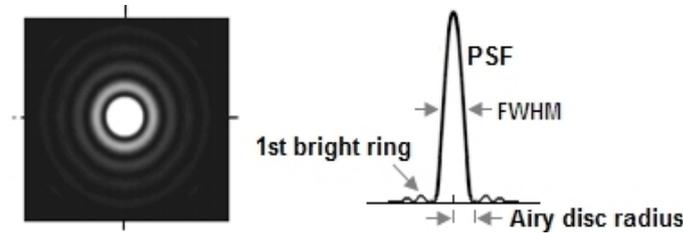


Abb. 11.2.: Punktverwaschungsfunktion

Die folgende Funktion [11.1] zeigt die Abhängigkeit der Halbwertsbreite einer Punktverwaschungsfunktion von den Parametern des optischen Systems, wie dem Aperturwinkel, d.h. dem verwendeten Objektiv, dem Brechungsindex des Immersionsmediums, sowie der Anregungswellenlänge.

$$FWHM = \frac{\lambda}{2n \cdot \sin\alpha} \quad (11.1)$$

λ : Wellenlänge

n : Brechungsindex

α : halber Aperturwinkel der Objektivlinse

In dieser Arbeit wurde das Auflösungsvermögen in Abhängigkeit von den verwendeten Teflonmaterialien bestimmt, um zu zeigen, ob sich die Anpassung des Brechungsindex der Messarrays an die wässrige Umgebung positiv auf das Auflösungsvermögen auswirkt. Dazu werden die jeweiligen Teflonmaterialien mit Dupliersilikonmasse (Bego, Bremen) unter das 3.5 mm Loch der Polystyrol Zellkulturschalen für OSTR geklebt. Die Oberfläche wird im Plasmacleaner (Diener Elektronik, Nagold) bei 50 % Leistung für 1 min mit Luftplasma aktiviert und anschließend durch Eintrocknen mit etwa 10 μl einer 0.01 prozentigen (70-150 kDa) Poly-L-Lysin Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim) beschichtet. Rot fluoreszierende TransFluoSpheres (Anregungsmaximum: 488 nm; Emissionsmaximum: 605 nm) von Invitrogen (Carlsbad, CA) mit einem Durchmesser von 100 nm werden 1:1500 in PBS-Puffer verdünnt, kurz gevortext und für etwa 1 min ins Ultraschallbad gehalten, um Aggregate aufzulösen. 5-10 μl Beadlösung auf die Poly-L-Lysin-Oberfläche auftragen, eintrocknen lassen und sofort mikroskopieren.

Es werden mit allen vorhandenen Objektiven unter Verwendung des geeigneten Immersionsmediums bei 488 nm und 532 nm xy- und xz-Schnitte durch die TransFluoSpheres aufgenommen, das Intensitätsprofil mit Origin[7.0] (Northampton, MA) geplottet und

mit einem Gaussfit nach Gleichung [11.2] angenähert.

$$y = y_0 + \frac{A}{w \cdot \sqrt{\frac{\pi}{2}}} \cdot \exp -2 \frac{(x - x_c)^2}{w^2} \quad (11.2)$$

A : Amplitude

y_0 : Offset

w : Radius nach Abfall der Kurve auf $1/e$

x_c : x-Wert des Maximums

Der Fit liefert den Radius des Maximums w nach einem Abfall der Intensität auf $1/e$ der Amplitude. Daraus lässt sich zusammen mit der Voxelgröße für das gegebene Objektiv und dem verwendeten Zoom das FWHM für alle drei Raumrichtungen in nm nach der Formel [11.3] berechnen.

$$FWHM = w_{pixel} \cdot voxel[nm/px] \cdot \sqrt{2 \cdot \ln 2} \quad (11.3)$$

w_{pixel} : Radius in Pixel nach Abfall der Kurve auf $1/e$

$voxel$: Breite eines Pixels in nm

Teil III.
Ergebnisse

12. Evaluation der Transporteranalyse

Zwar wurde die hier verwendete Transporteranalyse bereits vorher unter dem Namen OSTR entwickelt,^{55,58,80} bedurfte allerdings wegen der oftmals geringen Ausbeute an verwertbaren Experimenten und der eingeschränkten Anwendung, wie beispielsweise auf isolierte Kernmembranen von *Xenopus laevis* oder auf Lipiddoppelschichten mit integriertem α -Hämolyysin,⁴¹ weiterer Verbesserungen, sowie einiger Vorversuche. Dadurch konnten zum einen die in den darauffolgenden Abschnitten dargestellten kinetischen Untersuchungen des nukleocytoplasmatischen Transportes auf eine solide Basis gestellt werden und zum anderen der Weg geebnet werden für zukünftige Weiterentwicklungen dieser bisher einzigen Methode zur *in vitro*-Analyse von Kernexportprozessen. Zum besseren Verständnis werden die jeweiligen Diffusions- oder Transportrichtungen im Folgenden so angegeben, als entsprächen sie den physiologisch-relevanten Richtungen in einer intakten eukaryotischen Zelle, so dass ein Transport *in* die Testkompartimente (TCs) der Messarrays als Kern-Cytoplasma Transport bzw. allgemein als Export und *aus* den Testkompartimenten als Cytoplasma-Kern Transport bzw. als Import bezeichnet wird.

12.1. Statistik der GFP Testmessungen

Die manuelle Präparation von intakten Kernmembranstücken aus *Xenopus laevis* Oozyten des Stadiums V oder VI (siehe Abschnitte [10.3],[10.4]) erhöht die Fehleranfälligkeit der Methode, da vielfältige Einflussgrößen, wie Haltung, Fütterung und Krankheit der *Xenopus laevis* Amphibien, Pufferzusammensetzung und präparatives Geschick eine Rolle spielen. Deshalb wurde in dieser Arbeit ein Testsystem zur Kontrolle der methodisch richtigen Durchführung und zur Validierung der gemessenen Geschwindigkeitskonstanten k und des daraus berechneten normierten molekularen Flusses Φ etabliert. Als Standard eignet sich ein inertes fluoreszierendes Protein, wie GFP, das gut charakterisiert ist und gleichzeitig nicht mit den FG-Motiven im zentralen Kanal des NPCs wechselwirkt. Aufgrund seines theoretischen hydrodynamischen Stokes-Radius von $2.30 \pm 0.05 \text{ nm}$ ⁴³ und einem Molekulargewicht von 26.8 kDa diffundiert GFP im Vergleich zu den meisten Transportrezeptoren relativ langsam durch das Innere des NPCs,⁵⁸ obwohl dieses durch die ungefalteten FG-Wiederholungseinheiten der Nukleopore näherungsweise als ein molekulares Sieb mit einem Porendurchmesser von etwa 5-10 nm^{55,76,79,87} und einer unteren Ausschlussgrenze von 40 kDa betrachtet werden kann. Die Diffusion wird angetrieben durch den jeweiligen Konzentrationsgradienten und ist abhängig von Temperatur (Arrhenius Gleichung) und Viskosität des Mediums (Stokes-Einstein Gleichung), so dass die Messung der Transportkinetik von GFP unter gleichen Bedingungen und bei konstanter Raumtemperatur von $24 \pm 2^\circ\text{C}$ durchgeführt wurde. Die Messgenauigkeit wird auf der Basis der statistisch ermittelten Messwertstreuung als

$\pm 3\sigma$ d.h. als das dreifache der Standardabweichung festgelegt, da in diesem Intervall nach Definition 99.7% der Messwerte liegen.

Ein Transportmix von $10\ \mu\text{l}$, bestehend aus $3.6\ \mu\text{M}$ GFP, $14.2\ \mu\text{M}$ Atto637 markiertem Maltose bindenden Protein (Atto637-MBP), $100\ \text{mM}$ Saccharose, wird wie im Abschnitt [10.5] beschrieben zu dem $30\ \mu\text{l}$ großen Pufferreservoir der Messkammer gegeben und die Fluoreszenz beider Substrate in den runden Vertiefungen ($d = 50\ \mu\text{m}$, $l = 50\ \mu\text{m}$) nach Anregung mit Wellenlängen von $488\ \text{nm}$ und $633\ \text{nm}$ genau $20\ \mu\text{m}$ unterhalb der Oberfläche detektiert. Die optimale Position der konfokalen Ebene in den TCs unterhalb der Membran wurde anhand eines xz-Schnitts durch die Vertiefungen derart festgelegt, dass sich die Beobachtungsebene in der Mitte des kegelförmigen Fluoreszenzbereichs möglichst weit entfernt von der Membranoberfläche und dem TC-Boden befand. Die Experimente erfolgten an zwei Tagen, an denen für beide Diffusionsrichtungen Kern-Cytoplasma und Cytoplasma-Kern jeweils 5 unabhängige Messungen mit unbenutzten Messarrays durchgeführt wurden, damit jede Art von Variation wie Oozytenbeschaffenheit oder Präparation mit in die statistische Bewertung einfließen.

Abbildung [12.1] zeigt oben (A,B) einen exemplarisch ausgewählten Ausschnitt aus den Fluoreszenzrohdaten einer aufgenommenen xyt-Zeitserie für die Kern-Cytoplasma Diffusion von GFP, wobei in der jeweils unteren Zeile die dazugehörigen Daten des Kontrollproteins Atto637-MBP zu sehen sind. Die kaum detektierbare Fluoreszenz des markierten MBP in Bild [12.1,A 2.Zeile] beweist die sehr gute Versiegelung der Testkompartimente (TCs) durch die Oozyten-Kernmembran, die einhergeht mit einer optimalen Membrananheftung und Membranintegrität. Gleichzeitig diffundiert GFP langsam in die membranversiegelten TCs, da die GFP-Fluoreszenzintensität im Bild [12.1,A 1.Zeile] erst ab $142\ \text{s}$ kontinuierlich ansteigt bis sie am Ende der Messung bei $878\ \text{s}$ nahezu den Wert der unbedeckten, offenen Referenz-TCs erreicht, was dem Gleichgewichtszustand entspricht. Der Gleichgewichtszustand der passiven, allein konzentrationsabhängigen Diffusion des GFPs ist erreicht, wenn der Wert des Konzentrationsgradienten über die Kernmembran dC_{GFP}/dx gleich Null wird. Die Messung der Fluoreszenz in den Referenz-TCs [12.1,B] liefert jedoch nicht nur ein Maß für die Intensität nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes, sondern eine Möglichkeit die Fluoreszenzintensität bei den gegebenen Mikroskopeinstellungen mit der vorhandenen Konzentration in Korrelation zu bringen. Wie erwartet steigt die Fluoreszenzintensität in den offenen Referenz-TCs beider Kanäle bereits kurz nach der Zugabe auf den Maximalwert an und bleibt bis zum Ende der Messung bei $878\ \text{s}$ konstant. Der Maximalwert der Fluoreszenzintensität in den offenen Referenz-TCs wird zur Normierung der gemessenen Intensitätswerte verwendet, um experimentell bedingte Intensitätsunterschiede aufgrund von unterschiedlichen Markierungsgraden der Proteine oder Quantenausbeuten der verwendeten Fluorophore auszugleichen und eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen.

Zur Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten k des GFP-Flusses durch den NPC werden die normierten Intensitätswerte aus den obigen Fluoreszenzbildern, wie in Diagramm [12.1,C] gezeigt, gegen die Zeit aufgetragen, wobei die Kurven der offenen Referenz-TCs über jeweils 6 einzelne Vertiefungen gemittelt wurden. Deren bereits angesprochener zeitlich-konstanter Intensitätsverlauf bedeutet für eine AOTF-Einstellung

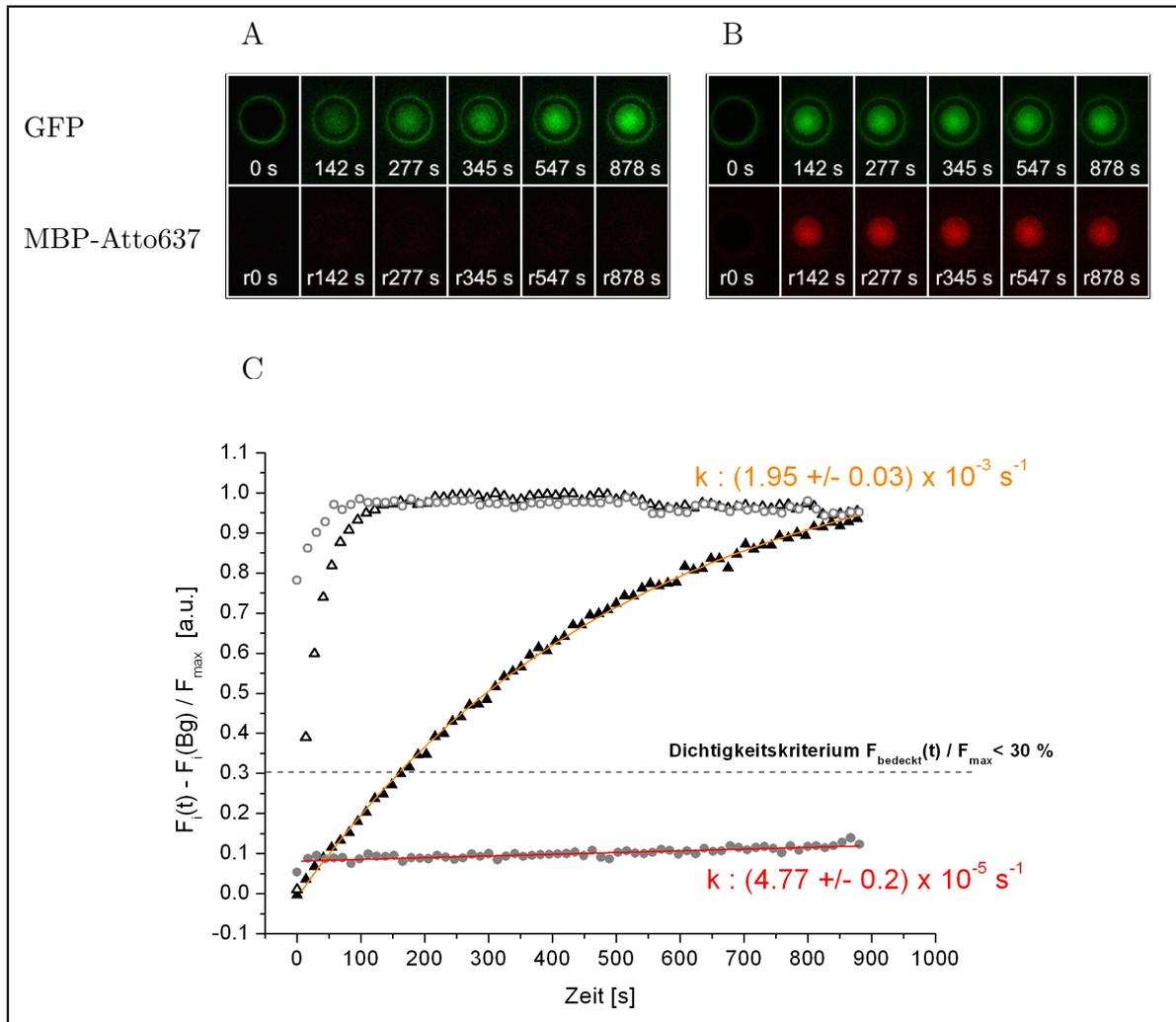


Abb. 12.1.: repräsentatives Beispiel für die passive Diffusion des GFP durch den NPC (Kern \rightarrow Cytoplasma)

Anstieg der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von $10 \mu\text{l}$ Transportmix mit $4.0 \mu\text{M}$ GFP und $14.2 \mu\text{M}$ Kontrollprotein Atto637-MBP; **A:** membranbedeckte TCs, **B:** offene Referenz-TCs, **C:** Zeitabhängiger Plot der normierten Intensitäten von GFP ($\blacktriangle, \triangle$, grün) und Atto637-MBP (\bullet, \circ , rot) mit den jeweiligen Fitkurven (orange & rote Linie)

von 20 %, respektive 27 % (Laser-Ausgangsleistung: 10-18 mW), den Ausschluss eines möglichen Bleichens der GFP bzw. Atto637 Fluoreszenz, deren Kinetik die Diffusionskinetik des GFPs überlagern würde. Die relative Fluoreszenzintensität der verwendeten Atto637-MBP Dichtigkeitskontrolle, deren Molekulargewicht von 41.3 kDa eine passive Diffusion durch den NPC-Kanal erschwert, liegt bei sehr niedrigen 10 % im Vergleich zur Referenz-Intensität in den offenen TCs. Die Messung erfüllt somit das Dichtigkeitskriterium von unter 30 %, welches anhand von Testmessungen mit unterschiedlichen Dichtigkeitssubstraten entsprechend meiner präparativen Fähigkeiten so festgelegt wurde, dass im Durchschnitt etwa 50 % aller gemessenen TCs diesem Kriterium entsprechen. Ein steiler Abfall der NPC-Durchlässigkeit in der Nähe der Ausschlussgrenze ist gemäß der Literatur nicht zu erwarten, da dort Werte von 40-60 kDa als Ausschlussgrenze des NPCs angegeben werden und sogar bei großen Proteinen wie BSA mit 68 kDa noch eine sehr geringe Diffusionsrate angegeben werden kann.⁸⁷

Die Diffusion des GFPs erfolgt entlang des Konzentrationsgradienten theoretisch bis zum Ausgleich d.h. bis zur Annäherung der Kurve an den Maximalwert der relativen Fluoreszenzintensität von Eins. Beschrieben wird eine solche gerichtete Diffusion durch eine monoexponentielle Gleichung, angelehnt an ein Zwei-Kompartiment-System. Dieses besteht aus einer Messkammer mit unendlich großer Ausdehnung, die über eine semipermeable Membran von kleinen Vertiefungen mit im Vergleich zum Diffusionskoeffizienten sehr kleiner Ausdehnung getrennt ist. Die Theorie aus Abschnitt [3] konnte im Experiment bestätigt werden, da mit Hilfe des Levenberg-Marquardt Algorithmus eine monoexponentielle Funktion an die gemessenen, ansteigenden Werte der Fluoreszenzintensität von GFP gut angenähert werden konnte. Dies lieferte für GFP eine Geschwindigkeitskonstante k von $1.95 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, die im Vergleich zur Dichtigkeitskontrolle mit einem k Werte von $4.77 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ um einen Faktor 41 höher liegt.

Bei einer vom Konzentrationsgradienten abhängigen Diffusion von GFP durch den NPC-Kanal sollte die Geschwindigkeit richtungsunabhängig sein, so dass die entsprechenden Geschwindigkeitskonstanten k für beide Richtungen näherungsweise übereinstimmen, sofern Gradient und Temperatur konstant bleiben. Die in Abbildung [12.2] gezeigte Umkehr der Diffusionsrichtung, nach Spülen der Messkammer mit $35 \mu\text{l}$ reinem Mock3 Puffer plus 120 mM Saccharose, liefert bei einem identischen monoexponentiellen Fit mit umgekehrter Amplitude an die Kurve für GFP einen etwas höheren k -Wert von $2.32 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Diese Abweichung relativiert sich jedoch nach Bildung der Mittelwerte wieder, wie später deutlich wird, da die Geschwindigkeitskonstanten für Import als auch Export innerhalb der methodisch bedingten großen Fehlerintervalle übereinstimmen. Nach Umkehr der Diffusionsrichtung sollte sich in der Messkammer idealerweise noch reiner Mock3 Puffer befinden und der Konzentrationsgradient für GFP hätte einen in der Größe identischen, aber in seiner Richtung umgekehrten Wert von $\Delta C = -1 \mu\text{M}$. Diagramm [12.2, C] zeigt jedoch, dass der Austausch der Transportlösung zwar schnell, aber nicht vollständig erfolgte. Die normierte Fluoreszenzintensität F/F_{max} erreicht folglich einen Endwert, der relativ zur Intensität in den offenen TCs um einen Faktor 2-4 über dem theoretischen Minimum von 0 % liegt. Der steile Abfall der Intensität in den offenen Referenz-TCs wird sowohl durch die Fluoreszenzabbildung [12.2,B], die bereits nach 210s kaum noch Fluoreszenz zeigt, als auch durch die dazugehörigen Kurven

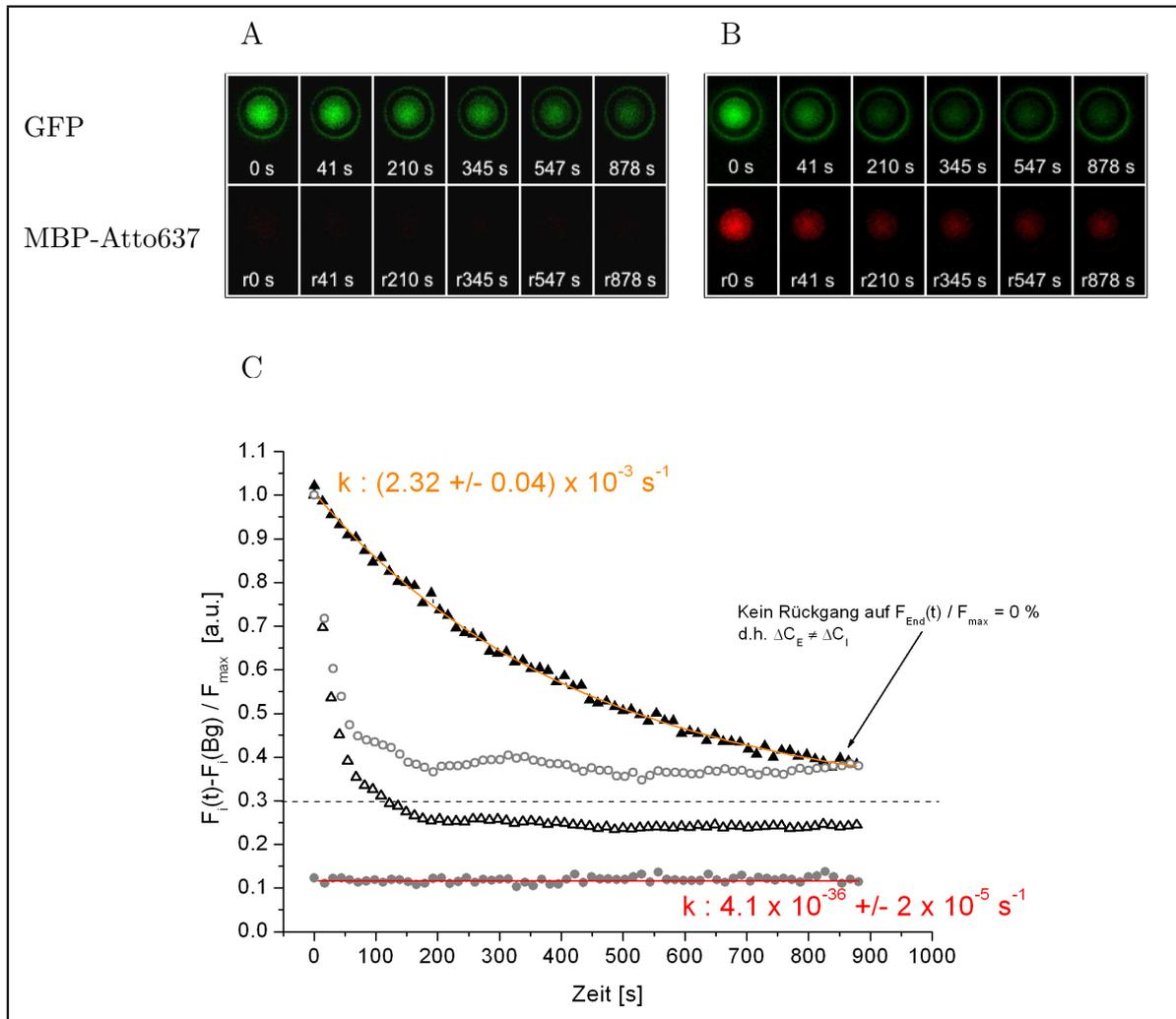


Abb. 12.2.: repräsentatives Beispiel der passive Rückdiffusion des GFP durch den NPC (Cytoplasma → Kern)

Abfall der Fluoreszenzintensität nach Zugabe von $35 \mu\text{l}$ Mock3 Puffer mit 120 mM Saccharose im Anschluss an den abgeschlossenen Cytoplasmatransport [12.1]. **A:** membranbedeckte TCs, **B:** offene Referenz-TCs, **C:** Zeitabhängiger Plot der normierten Intensitäten von GFP ($\blacktriangle, \triangle$, grün) und MBP-Atto637 (\bullet, \circ , rot) mit den jeweiligen Fitkurven (orange & rote Linie)

bestätigt. Erwartungsgemäß nimmt die Fluoreszenzintensität der Atto637-MBP Dichtigkeitskontrolle in den membranbedeckten TCs nicht ab und bleibt konstant bei dem während des Exports erreichten Endwert von ungefähr 12%. Folglich unterbindet die intakte, gut angeheftete Kernmembran eine schnelle Rückdiffusion des GFPs aus den membranbedeckten TCs, so dass die Fluoreszenzintensität in diesen im Vergleich zu den offenen TCs [12.2,B 1.Zeile] deutlich langsamer abnimmt [12.2,A 1.Zeile].

Die über mehrere Vertiefungen gemittelten Ratenkonstanten k von GFP sowie die daraus berechneten normierten Flusswerte Φ_{norm} bei $\Delta C = 1 \mu\text{M}$ sind in Abbildung [12.3] für jede der unabhängigen Messungen einzeln aufgetragen. Gleichzeitig wurden zur Veranschaulichung die oberen und unteren Grenzen für die Streuung von k und Φ_{norm} in jedes Diagramm eingetragen, deren Werte sich aus dem Mittelwert über alle Messungen plusminus dem dreifachen der statistisch erhaltenen Standardabweichung 3σ ergeben. Ähnlich wie bei der Einzelmessung [12.1,12.2] liegt auch hier der Mittelwert der Geschwindigkeitskonstanten von $2.07 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ für die Rückdiffusion von GFP nach Spülen der Membran etwas höher [12.3,C], als der Wert von $1.86 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ für die Diffusion in die membranbedeckten TCs [12.3,A]. Im Gegensatz dazu verhält es sich beim Mittelwert des normierten Flusses Φ_{norm} genau entgegengesetzt [12.3, B & D], da hier nicht nur der jeweilige k -Wert in die Berechnung eingeht, sondern auch der zu Beginn vorliegende Konzentrationsunterschied ΔC zwischen der Konzentration der Kammer und der Konzentration in den Vertiefungen. Dieser wird aus dem Produkt der verwendeten Konzentration multipliziert mit dem Amplitudenwert der monoexponentiellen Fitfunktion berechnet. Dabei fällt der Gradient deutlich kleiner aus, wenn die Rückdiffusion aufgrund eines unzureichenden Pufferaustausches nicht vollständig abläuft. Folglich liegt der berechnete Φ_{norm} Wert von 0.75 Molekülen pro NPC pro Sekunde für die betrachtete Diffusion vom Cytoplasma in den Kern unterhalb des Wertes für die entgegengesetzte Richtung von 1.09 Molekülen pro NPC pro Sekunde. Die Streuung innerhalb eines Experimentes, ausgedrückt durch die Fehlerbalken als einfache Standardabweichung, fällt hier geringer aus als die Streuung zwischen den einzelnen Experimenten. Im ersten Fall wirken sich nur die Dichtigkeitsunterschiede zwischen den einzelnen bedeckten TCs auf die Variation aus, während im zweiten Fall auch noch die Präparation sowie die Beschaffenheit der verwendeten Oozyte und des daraus isolierten Kerns zur Variation beitragen.

Ein Vergleich der nukleozytoplasmatischen Diffusion von GFP mit Ratenkonstanten aus ähnlichen Transportmessungen⁵⁸ zeigt eine hohe Übereinstimmung, so dass im Hinblick auf weitere Transporteranalysen von einer optimalen experimentellen Durchführung ausgegangen werden kann. Die Literaturwerte lagen hierbei für den Export bei $1.46 \pm 0.42 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ und für den Import bei $2.14 \pm 0.40 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Im Fall der Diffusion in den Nukleus wird dies bei *Kiskin et al.* auch für den molekularen Fluss von GFP bestätigt, der mit 1.06 Molekülen pro NPC pro Sekunde sehr nahe an den hier gemessenen 0.75 Molekülen pro NPC pro Sekunde liegt - beides jeweils bestimmt bei einem Konzentrationsgradienten von $1 \mu\text{M}$. Im Gegensatz dazu wird bei *Ribbeck und Görlich*⁸⁷ als Ergebnis von GFP-Importmessungen an digitonisierten HeLa-Zellen unter Anliegen derselben Konzentrationsdifferenz ein Wert von 2 GFP Molekülen pro NPC pro Sekunde genannt, der noch um 25% über dem maximalen möglichen Wert von 1.43 Molekülen pro NPC pro Sekunde liegt. Jedoch wird dieser relativ hohe Wert durch eine neuere

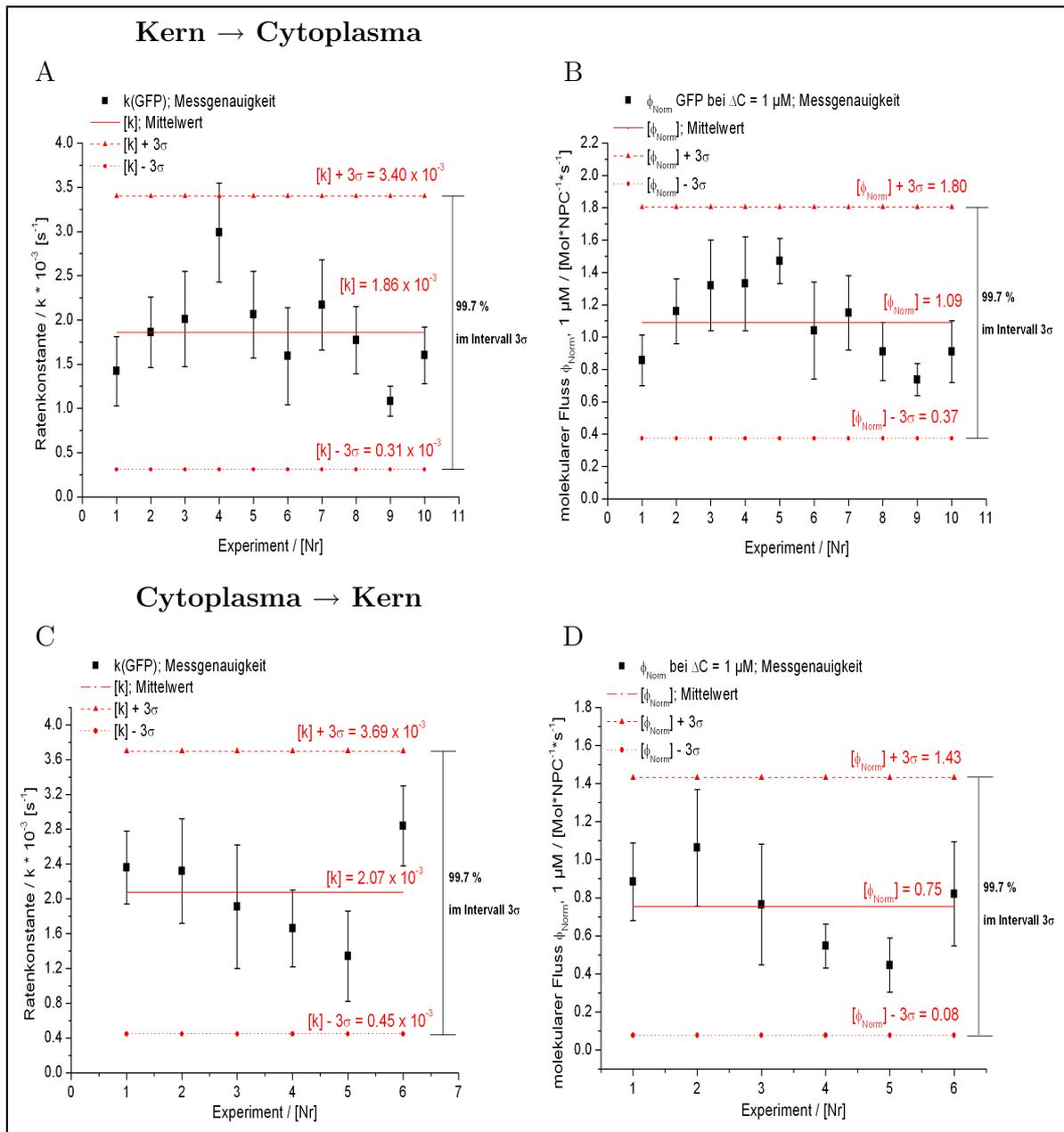


Abb. 12.3.: Bestimmung der Messgenauigkeit der Transporteranalyse mit GFP als inerten Proteinstandard

Oben: Cytoplasmatische GFP Diffusion entsprechend [12.1], 10 unabhängige Messungen mit 119 ausgewerteten TCs; **Unten:** Nukleoplasmatische GFP Diffusion entsprechend [12.2], 6 unabhängige Messungen mit 76 ausgewerteten TCs; mit jeweils **A & C:** Variation bei der Bestimmung von k , **B & D:** Variation der Werte für den normierten molekularen Fluss Φ_{norm} nach Berechnung aus dem experimentell bestimmten k und F_{max} bzw. F_{min} ; Fehlerbalken als einfache Standardabweichung pro Experiment

Publikation von *Frey und Görlich* aus diesem Jahr³⁶ wieder relativiert, da *in vitro*-Versuche mit einem Nsp1-FG-Hydrogel zur Bestätigung des von *Görlich* favorisierten "Selective Phase"-Modells für ein *acGFP* Molekül nur eine sehr geringe molekulare Flussrate von 0.3 Molekülen pro NPC pro Sekunde und 1 μ M Konzentrationsdifferenz ergab, die noch im Bereich der Variation des gemessenen Cytoplasma-Kern Flusses liegt. Die Abweichung könnte in der hohen Konzentration an Nsp1 von 2.2 mM und der dadurch bedingten dichten Gelstruktur liegen. Dadurch werden im Gegensatz zur hier verwendeten Transporteranalyse die tatsächlichen Verhältnisse in einem funktionalen NPC nicht modelliert. Angesichts mangelhafter Kontrollen wäre denkbar, dass die erhöhten Flussraten bei den zuvor genannten digitonisierten HeLa-Zellen auf eine unzureichend intakte Kernmembran oder eine Beeinträchtigung der NPC-Funktionalität hindeuten, die beide zu einer scheinbaren Beschleunigung des Importprozesses führen könnten.

12.2. Untersuchung verschiedener Einflussgrößen

Im Laufe zahlreicher Membrantransportmessungen stellte sich heraus, dass eine hinreichend gute Dichtigkeit der präparierten *Xenopus laevis* Kernmembranen, unabhängig vom jeweiligen Experimentator, nur sehr selten erreicht werden konnte. In dieser Arbeit wurde deshalb mit unterschiedlichen Ansätzen das Ziel verfolgt, diesen Umstand entscheidend zu verbessern, um künftig eine breitere und routinemäßige Anwendung der hier verwendeten Membrantransporteranalyse zu ermöglichen. Die Membrandichtigkeit konnte durch die Einführung einer funktionellen Oberflächenbeschichtung des Polykarbonats und der Verwendung von Atto637-MBP als Kontrollprotein soweit erhöht werden, dass unter optimalen Bedingungen im Durchschnitt etwa 50 % aller membranbedeckten Vertiefungen im Vergleich zur maximalen Fluoreszenzintensität in den offenen Referenz-Vertiefungen eine relative Dichtigkeit von <30 % erreichen.

Das zu Beginn verwendete inerte, 70 kDa große TexasRed Dextran Molekül erwies sich als eher schlechte Dichtigkeitskontrolle, da dessen schneller Einstrom zu Beginn einer Messung eine optimale Kontrolle der Membrananheftung und Dichtigkeit erschwerte. Deshalb wurde bei den Arx1-Messungen im folgenden Kapitel [13] oftmals nur eine relative Dichtigkeit von <40 % im Vergleich zur maximalen Helligkeit erreicht. Trotz mehrfacher Filtrationsversuche mit Microcon-Filtern von Amicon mit einer Ausschlussgrenze von 50 kDa und entgegen des vom Hersteller angegebenen Größenbereichs von 60-90 kDa konnte der Einstrom kleinerer Dextran-Fragmente zu Beginn der Messung nicht vermieden werden. Es wurden deshalb mehrere Dichtigkeitskontrollen mit unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen teilweise im Rahmen einer Diplomarbeit von Nina Quiskamp getestet. Dabei zeigte sich, dass alle mit Alexa633 Fluorophor markierten Kontrollproteine wie Rinderserumalbumin (BSA) oder Maltose bindendes Protein (MBP) die Kernmembran unspezifisch und stark anfärbten. Bedingt durch den hohen Brechungsindex von Polykarbonat von 1.58-1.59 im Vergleich zu wässrigen Lösungen und den sich ergebenden schlechteren optischen Eigenschaften (siehe Abschnitt [12.3]) führt dies zu einer Erhöhung der Hintergrundfluoreszenz und dadurch zu verstärkter

Fluoreszenzintensität in den dichten, eigentlich dunklen membranbedeckten Vertiefungen. Eine Lösung lieferten die hydrophilen, besser wasserlöslichen Fluorophore der Firma AttoTec, von denen speziell Atto637 im roten Bereich für eine Proteinmarkierung verwendet wurde und das erwartungsgemäß keine Anfärbung der Kernmembran bewirkte. Je nach Anwendung und je nach Größe des zu untersuchenden Transportsubstrates eignen sich beide Kontrollproteine, sowohl Atto637-BSA, als auch Atto637-MBP sehr gut zur Überprüfung der Membranintegrität während der Transportmessungen, wobei MBP vor allem aufgrund seiner geringeren Adsorptionsneigung im Vergleich zu BSA eher zu bevorzugen wäre.

Ein ebenfalls wesentlicher Faktor zur Erhöhung der Membrandichtigkeit gegenüber entsprechenden Kontrollsubstraten stellt die festere Anheftung der isolierten Kernhüllen auf dem jeweiligen Trägersubstrat dar. Wegen der hohen Zahl an möglichen Einflussgrößen gestaltet sich die Anheftung von Zellen auf technischen Oberflächen trotz vielfältigster Untersuchungen als schwierig. Bereits vorangegangene Experimente mit Kernmembranen auf Polykarbonatoberflächen haben gezeigt, dass zweiwertige Ionen, wie Calcium in einer Konzentration von etwa $3\ \mu\text{M}$, vermutlich durch die Abschirmung der negativ geladenen Phospholipide, das Kleben auf der Oberfläche begünstigen.⁷⁸ Hier wurden drei verschiedene Oberflächenmodifikationen hinsichtlich ihres Einflusses auf die Membrandichtigkeit untersucht, zum einen eine chemische Veränderung der Polykarbonatoberfläche durch Luftplasma, zum anderen die in der Zellkultur häufig eingesetzte Poly-L-Lysin Beschichtung, und letztendlich eine direkte Vernetzung der Poly-L-Lysin Oberfläche mit den Cysteinen der Membranproteine über einen bifunktionalen Linker (Reaktionsschema siehe Abschnitt 10.2).

In Abbildung [12.4] wird deutlich, dass die Wahrscheinlichkeit ausreichend dichte membranbedeckte TCs zu erhalten für beide getesteten Kontrollproteine von der Plasmamodifikation über die Poly-L-Lysin-Beschichtung bis zur SMCC-Vernetzung kontinuierlich ansteigt. Während der Einbau von Hydroxyl, Carbonyl und Carbonsäuregruppen⁹⁰ nach Behandlung der hydrophoben Polykarbonatoberfläche mit Luftplasma nur zu 8-12 % dichten TCs führt, erhöht sich der Anteil dichter TCs für die Poly-L-Lysin Beschichtung bereits auf 9-15 % und für die Vernetzung mit dem bifunktionalen SMCC-Linker auf 20-22 %. Dabei bewirkt die SMCC vermittelte Kopplung der Membran an die Oberfläche im Fall des Kontrollproteins Atto637-MBP, welches mit einem Molekulargewicht von 41.3 kDa nur knapp über der Ausschlussgrenze des NPCs von 40 kDa liegt,^{55,66} eine deutlichere Verbesserung der Membrandichtigkeit als bei Alexa488-BSA. Insgesamt kann eindeutig festgestellt werden, dass der bifunktionale SMCC-Linker aufgrund seiner Amin- und Cysteinreaktivität eine deutliche Erhöhung der Membrandichtigkeit zur Folge hat und den Anteil an verwertbaren Messungen stark erhöht. Dies wird durch die eingebettete Grafik bestätigt, die im Vergleich zu allen durchgeführten Experimenten denjenigen Anteil an Messungen zeigt, die mindestens ein dichtes TC lieferten. Bei Verwendung der Oberflächenmodifikation mit SMCC sind somit bis zu 55 % aller Experimente auswertbar, während ohne Beschichtung speziell bei Verwendung des kleineren Atto637-MBP nur noch etwa 20 % aller Experimente benutzt werden können.

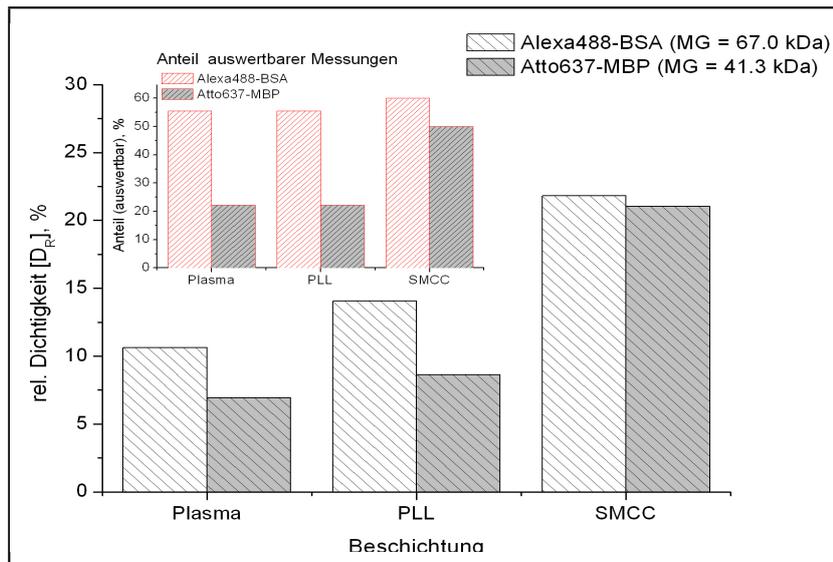


Abb. 12.4.: Vergleich der relativen Dichtigkeit D_R in Prozent zwischen drei unterschiedlichen Oberflächenmodifikationen von Polycarbonat

Grau: (a) Plasmacleaner (1 min, 50 % Intensität) (b) Poly-L-Lysin Schicht nach Plasmacleaner (10 min; RT) (c) SMCC Beschichtung nach [10.2], jeweils mit Alexa488-BSA und Atto637-MBP als Dichtigkeitskontrolle. **Rot,innen:** Prozentualer Anteil auswertbarer Messungen mit dichten TCs im Vergleich zur Gesamtzahl aller durchgeführten Messungen

Trotz der bereits genannten methodischen Verbesserungen traten immer zu bestimmten Monaten Probleme mit der Dichtigkeit der isolierten *Xenopus laevis* Kernmembranen auf. Es lag deshalb nahe zu vermuten, dass die Oozytenbeschaffenheit, sowie auch die Zusammensetzung der Kernmembran, jahreszeitlichen Schwankungen unterliegen. Einen Beweis für diese Annahme lieferte die Aufschlüsselung des Anteils an dichten TCs nach Monaten in Abbildung [12.5,links]. Denn nach einem Minimum an dichten TCs im Februar und März steigt deren Anteil kontinuierlich und erreicht ein Maximum in den Sommermonaten Juni bis September. Die Zahlenwerte über den einzelnen Säulen stehen jeweils für die Anzahl an insgesamt ausgewerteten membranbedeckten Vertiefungen, die in die Statistik einfließen. Dabei konnte keine Beziehung zwischen der Anzahl an Messwerten pro Monat und der jeweiligen relativen Dichtigkeit nachgewiesen werden, denn die relative Dichtigkeit im Oktober lag um etwa die Hälfte niedriger als im Juli, obwohl doppelt so viele TCs in die Berechnung einbezogen wurden. Bei der Mittelung wurde zwar nicht zwischen den verwendeten Dichtigkeitskontrollen, Beschichtungen und Transportsubstraten unterschieden, aber darauf geachtet, dass neben gleichen Mikroskopeinstellungen und präparativen Bedingungen (Raumtemperatur, Isolation, Zugabe), auch im Bezug auf die vorher genannten Punkte eine ähnliche Variation innerhalb der Monate vorlag. Eine Auftragung des Dichtigkeitsanteils getrennt zwischen unbeschichteten und SMCC-beschichteten Messarrays ergab keine Korrelation zwischen SMCC-Beschichtung und erhöhter Dichtigkeit. Im Februar, einem Monat

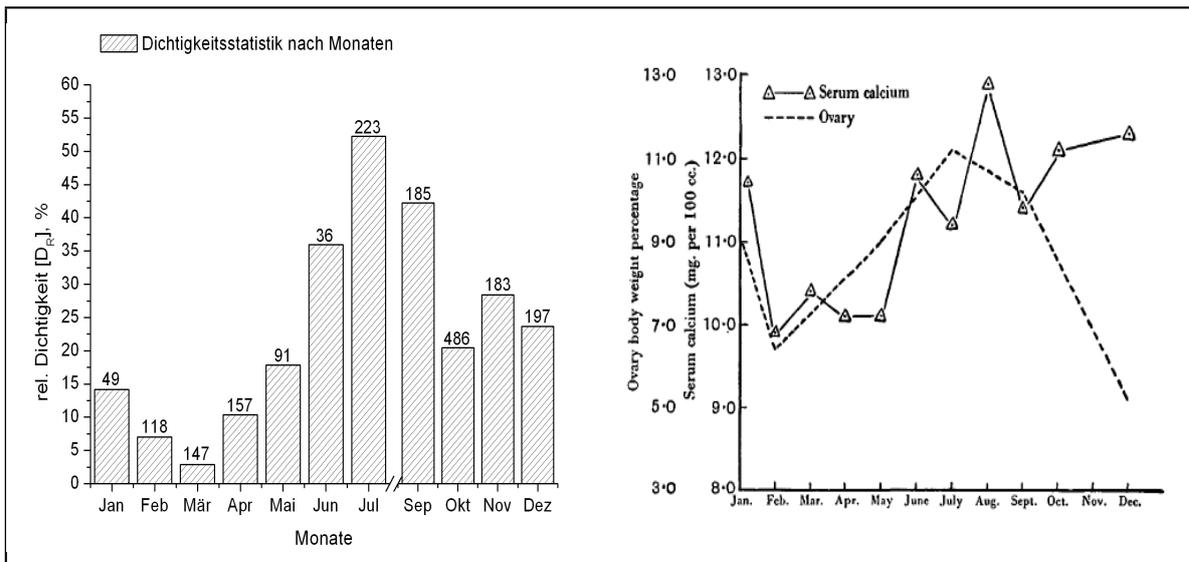


Abb. 12.5.: Jahreszeitliche Schwankungen der Dichtigkeit von isolierten *Xenopus laevis* Kernmembranen

links: Mittlere relative Membrandichtigkeit in Prozent im Bezug zur Gesamtzahl der membranbedeckten TCs (Zahlenwerte); **rechts:** Jahreszeitliche Veränderung des Calciumspiegels im Serum von *Xenopus laevis* Fröschen und des Anteils des Ovariengewichts im Vergleich zum Körpergewicht (Quelle: H. Zwarenstein, H.A. Shapiro⁴⁰)

mit schlechter Membrandichtigkeit, lagen sowohl die Werte für die unbeschichteten als auch für die SMCC-beschichteten Messarrays sehr niedrig, während im September die unbeschichtete Oberfläche bessere Ergebnisse lieferte (Daten nicht gezeigt). Die in Abbildung [12.5,links] dargestellte Gesamtstatistik reicht folglich aus, um die wesentlichen Unterschiede zu erkennen, da die einzeln nach der Beschichtung aufgelistete Statistik keinen zusätzlichen Informationsgehalt bietet.

Interessanterweise überlagert sich der Anstieg der Membrandichtigkeit aus Abbildung [12.5] gleichzeitig mit den Monaten, in denen die *Xenopus laevis* Frösche in ihrem natürlichen Lebensraum in Südafrika mit der Fortpflanzung beginnen.¹⁰¹ Die Fortpflanzungszeit der Frösche erstreckt sich über die regenreichen Monate vom späten Winter bis Frühling d.h. über die Monate Dezember bis April oder bezogen auf die Nordhalbkugel von Juni bis Dezember. Genau in dieser Zeit etwa von Juni bis November bilden die Frösche, die in ihrem natürlichen Lebensraum untersucht wurden, in Korrelation mit einem erhöhten Serumcalciumspiegel größere Ovarien aus, wie in der rechten Abbildung [12.5] deutlich wird. Es liegt also nahe zu vermuten, dass der Anstieg der Membrandichtigkeit in Verbindung steht mit den Veränderungen wie z.B. Ovariengröße im Zuge der Fortpflanzung. Die Frösche werden zwar in temperierten Wassertanks gehalten, aber wie in der Literatur teilweise berichtet wird, kann es auch bei in Gefangenschaft lebenden Fröschen als Folge eines falschen Tageslichtzyklus zu jahreszeitlichen Schwankungen in der Beschaffenheit der Oozyten kommen.^{20,101} Diese Schwankungen wirken sich offen-

sichtlich auch auf die Beschaffenheit der Kernmembranen aus, die eine Abnahme oder Zunahme der Membrandichtigkeit verursachen. Trotz dieser Korrelation bleibt zu klären, worin genau die Ursache für eine veränderte Membrandichtigkeit liegt, sei es in einer veränderten Anheftungsfähigkeit auf der Oberfläche, sei es in einer veränderten NPC-Durchlässigkeit oder einer veränderten Festigkeit bzw. Elastizität der Kernmembran. Zudem wäre es für künftige Transporteranalysen ratsam, die Haltungsbedingungen der *Xenopus laevis* Frösche genau zu überprüfen und speziell auf die Einhaltung von gleichen Tag/Nacht-Zyklen, sowie auf das Vorhandensein fensterloser Räume zu achten.

12.3. Entwicklung verbesserter Messarrays aus Teflonmaterialien

Die in der Literatur beschriebenen⁵⁸ und größtenteils in dieser Arbeit benutzten Messfelder mit $50\ \mu\text{m}$ großen Vertiefungen in Polykarbonat besitzen einige Nachteile, die eine Verkleinerung des Durchmessers der Vertiefungen, um beispielsweise Zellkerne aus *Saccharomyces cerevisiae* zu messen, erschweren. Dazu zählt das reduzierte Detektionsvolumen, bedingt durch einen deutlichen Unterschied bei den Brechungsindizes der Pufferlösung ($n_D \approx 1.33$) und der Polykarbonatwände ($n_D \approx 1.58$). Ebenso wirkt sich die Autofluoreszenz der TC-Ränder vor allem bei 488 nm Anregung, verursacht durch die Herstellungsmethode der Laserablation,⁵⁸ nachteilig aus. Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb versucht, besser geeignete Materialien zu finden, die sowohl keinen der genannten Nachteile aufweisen, als auch leichter mikro- und nanostrukturierbar sind, um Vertiefungen mit deutlich kleinerem Volumen und einer einheitlichen Geometrie herzustellen. Dies ermöglicht eine erhöhte Statistik pro durchgeführter Messung, verbunden mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit eine hohe Anzahl an dichten, auswertbaren Löchern zu erhalten. Gleichzeitig können durch eine Reduktion des Durchmessers statt der bisherigen Messungen von NPC-Ensembles und mittleren Flussraten nun einzelne NPCs charakterisiert werden,⁸¹ wie in Abschnitt [10] näher erläutert, um beispielsweise herauszufinden, ob es verschiedene Untergruppen von NPCs gibt, die unterschiedliche Transportfunktionen erfüllen.

Transparente Materialien mit einem Brechungsindex in der Nähe von Wasser, die eine hohe Transmissionsrate für den sichtbaren Wellenlängenbereich aufweisen, sind relativ schwer zu finden. Einzig Teflon-Derivate bieten genau diese Eigenschaften, von denen kommerziell lediglich gelöstes TeflonAFTM (DuPont) und TeflonFEP Folie (DuPont) erhältlich sind. Eine chemische Strukturierung von Teflon kann aufgrund der stark hydrophoben, folglich schwer benetzbaren Oberfläche und aufgrund des inerten Verhaltens gegenüber sehr vielen Chemikalien nicht durchgeführt werden, so dass physikalische Methoden, wie das Nanoimprinting-Verfahren und das Ionenätzen mittels eines fokussierten Galliumstrahls ("Focussed Ion Beam") angewendet wurden.

In Kooperation mit der Festkörperphysik der Ruhr-Universität Bochum konnte ein erster Prototyp hergestellt werden, der rechteckige Vertiefungen mit $3 \times 3\ \mu\text{m}$ und einer Tiefe von $2\ \mu\text{m}$ in TeflonAFTM enthielt. Die hierbei verwendete Methode des Materialabtrags mittels eines fokussierten Galliumionenstrahls stellte sich jedoch aufgrund der

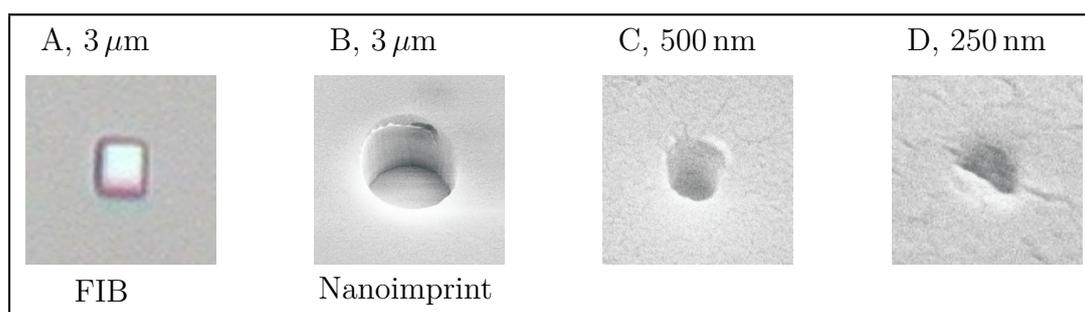


Abb. 12.6.: Aufnahmen der neuen TC-Arrays in TeflonAFTM und TeflonFEP
A: $3 \times 3 \mu\text{m}$ Vertiefungen in TeflonAFTM, strukturiert durch FIB (Festkörperphysik, Bochum), Durchlichtaufnahme **B-D:** TC mit $3 \mu\text{m}$ (B), 500 nm (C) und 250 nm (D) Durchmesser in TeflonFEP, hergestellt durch Nanoimprinting (Firma: Bessy AZM), EM-Aufnahme

seriellen Durchführung als sehr zeitaufwendig heraus, so dass nach einer Alternative gesucht wurde, um besonders kostengünstig größere Stückzahlen der Locharrays zu produzieren. Deshalb wurde letztendlich das Nanoimprinting-Verfahren verwendet und in Kooperation mit dem Bessy AZM in Berlin realisiert, die die Herstellung eines Druckstempels aus Silizium sowie das Prägen der Vertiefungen sowohl in TeflonAFTM als auch in TeflonFEP übernehmen. Dieses Verfahren erlaubte die Herstellung von Vertiefungen mit $3 \mu\text{m}$, 500 nm und 250 nm Durchmesser. In der folgenden Abbildung [12.6] sind die geprägten Strukturen beider Prototypen zu sehen. Daraus wird deutlich, dass sich mit beiden Techniken $3 \mu\text{m}$ breite Vertiefungen mit sehr regelmäßiger Geometrie herstellen lassen. Lediglich die noch kleineren Löcher mit 500 nm und 250 nm Durchmesser wurden nur unvollständig in die TeflonFEP Folie geprägt, da während der Herstellung geschmolzenes Teflon in die kleinen Vertiefungen zurücklief (siehe Bild D).

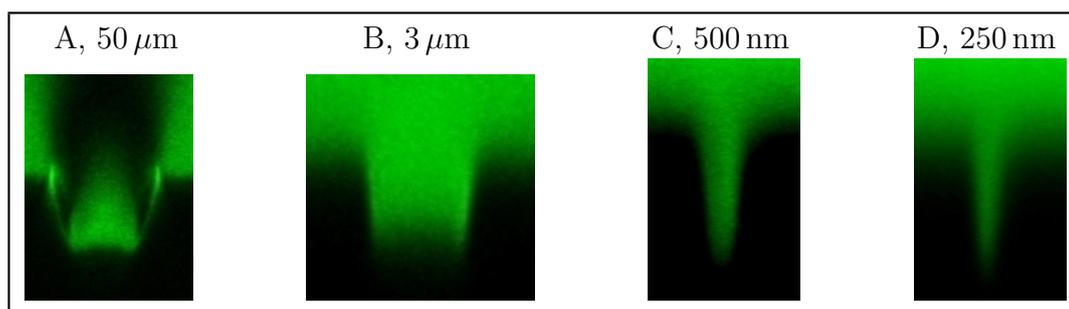


Abb. 12.7.: Detektionsvolumen der mit Alexa488 Fluorophor gefüllten Messvertiefungen im xz-Schnitt
A: TC in Polykarbonat 20x vergrößert (Durchmesser: $50 \mu\text{m}$; Tiefe: $50 \mu\text{m}$), hergestellt mittels Laserablation (Firma: Bartels Mikrotechnik); **B-D:** TC mit $3 \mu\text{m}$ (B), 500 nm (C) und 250 nm (D) Durchmesser in TeflonFEP 63x vergrößert, hergestellt durch Nanoimprinting (Firma: Bessy AZM)

Wie in Abbildung [12.7, C und D] zu erkennen, zeigen auch die kleineren Löcher, nachdem sie im Ultraschallbad mit Alexa488 Fluorophore befüllt wurden, eine gleichmäßige Verteilung der Fluorophore in den Vertiefungen. Dies wiederum deutet auf eine ausreichend gute Prägung der Vertiefungen hin. Die in Abbildung [12.6,D] noch zu erkennenden Materialreste wurden vermutlich durch die Vibrationen des Ultraschallgeräts entfernt, so dass offene gereinigte Vertiefungen entstanden. Die Vorteile des neuen Materials und Herstellungsverfahrens werden durch einen Vergleich mit den bisher verwendeten Messarrays aus Polykarbonat sehr anschaulich dargelegt. Denn in Abbildung [12.7, B-D] ist im Gegensatz zu Abbildung A keine Autofluoreszenz des Materials in Form von stärker fluoreszierenden Rändern zu erkennen. Die ebenfalls in Abbildung A zu sehende Löschung der Fluoreszenz in der Nähe der TC-Wände, die verursacht wird durch einen großen Unterschied bei den Brechungsindizes von Polykarbonat und Puffer, findet sich erwartungsgemäß bei den TeflonFEP Vertiefungen nicht mehr, da deren Brechungsindex in der Nähe von wässrigen Lösungen bei 1.34-1.35 liegt. Eine Anpassung des Brechungsindex des Materials an die wässrige Lösung in den TCs bietet somit den Vorteil das gesamte TC-Volumen als Detektionsbereich zur Verfügung zu haben, was sich bei sehr kleinen Vertiefungen vorteilhaft auf die Signalstärke auswirkt. Gleichzeitig sollte sich durch eine Anpassung der Brechungsindizes das konfokale Volumen des Mikroskops vor allem in z-Richtung deutlich verkleinern. Als Folge einer solchen reduzierte z-Ausdehnung kann in sehr kleinen TCs das gesamte konfokale Anregungs- und Detektionsvolumen unterhalb der Oberfläche positioniert werden. Ein limitierender Faktor bei der Herstellung von Vertiefungen mit sehr kleinem Durchmesser ist das Aspektverhältnis zwischen Tiefe zu Durchmesser der TCs. Dieses hat für Teflon Materialien maximal einen Wert von 6,⁹⁰ wodurch die Tiefe sehr kleiner TCs mit einem Durchmesser von z.B. 250 nm auf 1.5 μm limitiert wird. Die Größe des konfokalen Volumens, welches das minimale Volumen der TCs festlegt, wurde deshalb mit Hilfe von fluoreszierenden Beads bestimmt, deren Ausdehnung mit 100 nm unterhalb der Auflösungsgrenze eines konfokalen Mikroskops liegt. Nach Immobilisierung der Partikel auf der Oberfläche des jeweiligen Materials lässt sich anhand der Punktverwaschungsfunktion die Ausdehnung des konfokalen Volumens in allen drei Raumrichtungen ermitteln.

Die Bestimmung des konfokalen Volumens aus den gemessenen PSFs (Tabelle [12.1]) zeigt, dass die Anpassung des Brechungsindex durch Verwendung von TeflonFEP oder TeflonAFTM im Vergleich zu Polykarbonat eine verbesserte Auflösung vor allem in z-Richtung ergibt. Zwar besitzt Glas einen Brechungsindex, der näher am Polykarbonat und weiter entfernt von wässrigen Lösungen liegt, stellt aber mit einem konfokalen Volumen von $4.1 \times 10^{-2} \mu\text{m}^{-3}$ noch das beste Material dar, da die meisten Objektive für Glasmaterialien optimiert wurden. Dem Glaswert sehr nahe kommen die Teflonmaterialien, allen voran TeflonAFTM, das in z-Richtung eine Halbwertsbreite der PSF von 1156 nm und ein konfokales Volumen von etwa $5.3 \times 10^{-2} \mu\text{m}^{-3}$ aufweist. Die Werte für die unterschiedlich dick mit Siliziumdioxid bedampften TeflonFEP Folien liegen nur etwas höher als für TeflonAFTM. Die Siliziumdioxid-Schicht scheint dabei die optischen Eigenschaften des Materials nur geringfügig zu verschlechtern und erhöht gleichzeitig den Anteil an hydrophilen Gruppen auf der Oberfläche, die eine Anheftung der *Xenopus laevis* Kernmembranen und eine bessere Benetzbarkeit der TCs ermöglichen. Anhand

Tab. 12.1.: Halbwertsbreite (FWHM) der Punktverwaschungsfunktion eines 100 nm großen Transfluorbeads auf der Oberfläche der genannten Materialien

<i>Material</i>	n_D	$FWHM^a$ nm			V_{conf}^b $\times 10^{-2} \mu m^3$
		x	y	z	
Glas	1.46	295 ± 17	291 ± 32	908 ± 71	4.1 ± 1.1
Polykarbonat	1.58-1.59	395 ± 21	410 ± 16	2929 ± 103	24.8 ± 3.3
TeflonAF TM	1.31	307 ± 10	286 ± 16	1156 ± 42	5.3 ± 0.7
TeflonFEP + 5 nm SiO_2	≈ 1.34 -1.35	344 ± 14	320 ± 31	1678 ± 46	9.7 ± 1.7
TeflonFEP + 20 nm SiO_2	≈ 1.34 -1.35	315 ± 7	343 ± 27	1762 ± 71	10.0 ± 1.5

^a Objektiv: 63x Ölimmersion; Anregungswellenlänge: 488 nm

^b konfokales Volumen V_{conf} : Ellipsoid = $4/3 \cdot \pi \cdot FWHM(x)/2 \cdot FWHM(y)/2 \cdot FWHM(z)/2$

der Halbwertsbreite der PSF in z-Richtung für TeflonFEP mit 20 nm SiO_2 kann eine untere Grenze für die Tiefe der TCs festgelegt werden, bei der sich das konfokale Anregungsvolumen noch vollständig innerhalb der Vertiefungen befindet. Sie liegt bei etwa 1.8 μm .

12.4. Diskussion und Ausblick

Die genauere Evaluation der in dieser Arbeit verwendeten OSTR-Methode zur Analyse von Membrantransportern lieferte eine wichtige Grundlage für weitere Messungen, die nicht nur ermöglichte Fehlerquellen auszuschließen, sondern auch durch die GFP-Statistik zeigte, mit welcher Genauigkeit Geschwindigkeitskonstanten bestimmt werden können. In den meisten Fällen waren die Importmessungen wegen Schwierigkeiten beim Pufferaustausch fehleranfälliger, meist zu erkennen an unterschiedlich steilen Abfällen in der Fluoreszenzintensität der offenen Referenz-TCs, die ein Maß für den schnellen, gleichmäßigen Pufferaustausch darstellen. Aus dem Fehlerintervall von 3σ für die GFP-Diffusion bestimmt sich derjenige Unterschied in den Geschwindigkeitskonstanten und Flussraten, der noch zuverlässig aufgelöst werden kann. Er liegt für die hier verwendete Methode bei einer Verdopplung der k-Werte bzw. der Flussraten. Kleinere Unterschiede gehen in der starken Variationsbreite unter und können nicht entsprechenden externen Einflussgrößen zugeordnet werden. Folglich lässt sich die Messung der passiven Diffusion von GFP durch den NPC gut als standardisierte Kalibrierung der Methode nutzen. Wofür auch spricht, dass in der Literatur bereits mehrere Werte zum GFP-Import und Export bekannt sind^{58,87} und zusätzlich zum langsamen Transport keine vorgelagerten Bindungsgleichgewichte wie im Fall der Transportine auftreten.

Besonders ins Gewicht fallen Fehler, die durch manuelle Präparation und Zugabe der Transportlösung zur Messkammer entstehen. Deshalb würde eine automatisierte Zugabe

mit einer steuerbaren Spritzeneinheit verhindern, dass Geschwindigkeit und Position der Zugabe stark variieren. Die zahlreichen Tests und Experimente haben ebenfalls gezeigt, dass die Methode relativ sensibel auf saisonale Schwankungen der Oozytenqualität und auf Veränderungen der Oberflächenbeschaffenheit reagiert. Dies wird dadurch erschwert, dass eine weiterführende quantitative Charakterisierung der Anheftung von Membranen auf Oberflächen fehlt und lediglich empirisch versucht wird, die jeweiligen biologischen Proben auf einer Oberfläche zu adherieren. Dies trifft auch auf Kernmembranen aus anderen Organismen wie beispielsweise *Saccharomyces cerevisiae* zu, die ebenfalls schwer auf der Oberfläche anzuheften sind (persönliche Kommunikation mit der Doktorandin Julia Farr aus AG Prof. Peters). Dennoch hat die OSTR-Methode nicht zuletzt aufgrund der möglichen Parallelisierbarkeit das Potential, routinemäßig für Analysen von Transportern und Kanälen aller Art eingesetzt zu werden, sofern experimentelle Herausforderungen wie Isolation der Membranen, Herstellung optisch geeigneter Messarrays mit Vertiefungen von Durchmessern kleiner 300 nm, sowie Anheftung auf technischen Oberflächen ausreichend gelöst werden.

Ein wesentlicher Grundstein für die Entwicklung neuer Messarrays zur breiteren Anwendung der Methode konnte durch die Analyse der optischen Eigenschaften erster Prototypen gelegt werden. Speziell das Nanoimprint-Verfahren erweist sich für eine industrielle Herstellung von Messvertiefungen mit einheitlicher Geometrie und geringer Größe gut geeignet, da es relativ kostengünstig, parallelisierbar und leicht durchführbar ist. Erste Tests mit den in Kooperation hergestellten Prototypen aus TeflonFEP und TeflonAFTM konnten ferner zeigen, dass die Materialien neben einer hohen Transmissionsrate im sichtbaren Spektralbereich, keine Autofluoreszenz für die Anregungswellenlängen 488, 532 und 633 nm aufwiesen. Die Anpassung des Brechungsindex konnte die PSF vor allem in z-Richtung nachhaltig verkleinern, so dass in Teflon trotz der Limitierung des Aspektverhältnisses kleinere Vertiefungen hergestellt werden können als in Polykarbonat. Zudem wurde durch Bedampfung der Oberfläche mit Siliziumdioxid eine Anheftung der Kernmembranen aus *Xenopus laevis* Oozyten erreicht, die allerdings nicht ausreichte, um eine Membrandichtigkeit bei einem ersten Transportversuch zu bewirken. Weitere Experimente konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht durchgeführt werden, da sich nach Ende der Kooperation mit dem Bessy AZM in Berlin kein Nachfolger finden lies, der die Produktion der Messarrays in größeren Stückzahlen übernahm, um die entwickelten Arrays weiteren Tests zu unterziehen. Eine Reinigung der bereits vorhandenen Messarrays aus TelfonFEP konnte ebenfalls nicht erreicht werden, da ein Einweichen in Lösungsmitteln bereits ohne Ultraschallbehandlung ein Ablösen der laminierten TeflonFEP-Folie zur Folge hatte. Neben einer Verbesserung der Membrandichtigkeit müsste das Problem der Positionierung des Messfeldes zum Beispiel anhand von sichtbaren Markierungen gelöst werden, um die sehr kleinen Vertiefungen schneller zu finden. Ähnlich wie bei den Proben Tellern in der Elektronenmikroskopie wären Tische mit genau definierten Ablagen für die Proben denkbar, die nach Programmierung eines Koordinatennetzes eine Ansteuerung der Probe durch Eingabe der jeweiligen Koordinaten ermöglichen. Dies ließe sich durch entsprechende Computersoftware ebenso wie die Zugabe der Transportlösung gut automatisieren.

13. Analyse der Export-Kompetenz des ribosomal assoziierten Arx1

Am Export ribosomaler Vorstufen vom Nukleus ins Cytoplasma sind eine Reihe nicht-ribosomaler Proteine beteiligt, zu denen Adapterproteine wie Alb1, Nmd3 oder Transporterproteine wie Xpo1, Mex67/Mtr2 aus *Saccharomyces cerevisiae* zählen. Experimente in der Gruppe von Prof. Ed Hurt in Heidelberg konnten einen weiteren potentiellen Transportrezeptor für pre-60S Untereinheiten in Hefe identifizieren, welcher zwar seiner Funktion als Transportin entsprechend mit den FG-Nukleoporinen im NPC-Kanals wechselwirkte, aber keine strukturelle Homologie zur Importin- β Familie, sondern stattdessen zur Familie der Methionin-Aminopeptidasen aufwies. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob Arx1 trotz dieser strukturellen Abweichung als Transportrezeptor wirken kann und im Zuge dessen ohne zusätzliche Cofaktoren die Fähigkeit besitzt, zwischen Kern und Cytoplasma zu shutteln. Die OSTR-Technik als *in vitro*-Membrantransporteranalyse kann für genau solche Fragestellungen als die optimale Methode betrachtet werden. Der Vorteil dieser Methode liegt dabei in der Untersuchung des Einflusses einzelner isolierter Komponenten auf den zellulären nukleocytoplasmatischen Transportweg ohne den bei *in vivo* Messungen oftmals störenden, weil undefinierten Hintergrund.

Im folgenden Abschnitt [13.1] konnte somit gezeigt werden, dass Arx1 ebenso wie andere Transportrezeptoren in der Lage ist, alleine ohne zusätzliche Adapter- und Transporterproteine den NPC in beide Richtungen zu durchqueren, um in beide Kompartimente, den Kern und das Cytoplasma zu gelangen. Des Weiteren wurden die Geschwindigkeitskonstanten für die Arx1-Diffusion im Vergleich zu den Struktur- und Sequenzhomologen Map1, Ebp1 für beide Richtungen bestimmt, sowie die dazugehörigen molekularen Flussraten pro NPC berechnet.

13.1. Geschwindigkeitskonstante k und molekularer Fluss Φ

Die im folgenden Abschnitt dargestellten Ergebnisse wurden zwar zusammen mit unseren Kooperationspartnern Prof. Ed Hurt und Bettina Bradatsch aus Heidelberg bereits in der Zeitschrift *Molecular Cell*, Vol.27(5) veröffentlicht, jedoch ergaben sich aus weiteren Experimenten neue Erkenntnisse, die zu einer Weiterentwicklung der Auswertung und somit zu leicht veränderten Ergebnissen führten. Einerseits werden die experimentellen Daten nicht mehr durch eine monoexponentielle Funktion angenähert, die durch den theoretisch vorhandenen Nullpunkt geht, sondern die eine zusätzliche Offset-Variable enthält, die der vorhandenen Hintergrundfluoreszenz bzw. der Autofluoreszenz

des Materials Rechnung trägt. Andererseits wurde zwecks Einheitlichkeit das Dichtigkeitskriterium auch für die Alexa488-Arx1 Transportmessungen von $< 50\%$ auf $< 30\%$ herabgesetzt.

13.1.1. Arx1-Export: Vom Nukleus ins Cytoplasma

Das Arx1 Protein, sowie das homologe Protein Map1 aus *Saccharomyces cerevisiae* und das humane Ebp1 wurden von Bettina Bradatsch (Prof. Ed Hurt, Heidelberg) rekombinant in *Escherichia coli* hergestellt, aufgereinigt und anschließend mit Alexa488-Maleimid an den Cysteinen markiert. Der Markierungsgrad, angegeben als mittlere Anzahl an Farbstoffen pro Molekül, lag für Alexa488-Arx1 bei 0.44, für Alexa488-Ebp1 zwischen 0.40-0.44 und für Map1 bei 0.43, so dass relativ hohe Proteinkonzentrationen (Tabelle 13.1) für die Transportmessungen eingesetzt wurden. Die Ergebnisse der analytischen SDS-PAGE in Abbildung [13.1,C] bestätigen die hohe Reinheit der verwendeten, exprimierten Proteine, wobei Map1 sowie Ebp1 im Verhältnis zum Proteinstandard eine geringere Strecke im Gel zurücklegten als aufgrund ihres Molekulargewichts von 42.7 kDa und 47.4 kDa zu erwarten gewesen wäre. Dies kann vermutlich auf ein verändertes Laufverhalten der Proteinstandards zurückgeführt werden, da auch das Arx1 Protein mit einem Molekulargewicht von 64.6 kDa vergleichsweise zu weit oben im Gel zu finden ist.

Nach Zugabe von 10 μl Transportlösung mit Alexa488-Arx1 zur Messkammer, in der eine präparierte *Xenopus laevis* Kernmembran einige der 50 x 50 μm Vertiefungen abdeckt, konnte wie in Abbildung [13.1, A 1. Zeile] erkennbar ein langsamer, kontinuierlicher Einstrom von Alexa488-Arx1 in die membranbedeckten TCs beobachtet werden. Gleichzeitig lässt sich für das Kontrollmolekül, in diesem Fall TexasRed markiertes Dextran mit einem Molekulargewicht von 70 kDa ¹, nur eine sehr geringe Fluoreszenzintensität nachweisen.

Die passive Diffusion in die offenen Referenz-TCs verläuft für beide Substrate, sowohl für TRD70 als auch für Alexa488-Arx1, erwartungsgemäß sehr schnell, so dass bereits nach 176 s die maximale Fluoreszenzintensität erreicht wird (Abb.[13.1],B). Diese bleibt bis zum Ende der Messung konstant, so dass zusätzliche Einflüsse auf die Transportkinetik, wie Rückdiffusion aus den Vertiefungen in die Kammer, sowie Bleichen ausgeschlossen werden können. Im Gegensatz dazu ist nach 176 s in den membranbedeckten Vertiefungen wenig Arx1 vorhanden, entsprechend etwa 45 % der Maximalintensität. Somit wird, wie in den Abbildungen [13.1, A & D] zu erkennen, erst zum Ende der Messung bei 945 s die Gleichgewichtskonzentration der offenen Referenz-Vertiefungen erreicht.

Wird der zeitliche Verlauf der normierten Fluoreszenzintensität, wie in Abbildung [13.1, D] dargestellt, so zeigt sich im Falle des Arx1 Proteins ein annähernd monoexponentieller Anstieg der Intensität und somit auch der Konzentration. Dies entspricht dem

¹TRD70 wurde hier nach vierfacher Filtration mit Microcon Zentrifugenfiltern verwendet; die Schwierigkeiten mit TRD70 als Dichtigkeitskontrolle in diesen Experimenten führte zu den erwähnten Verbesserung der Dichtigkeitskontrolle, sowie der Anheftung der Membranen; siehe Abschnitt [12.2]

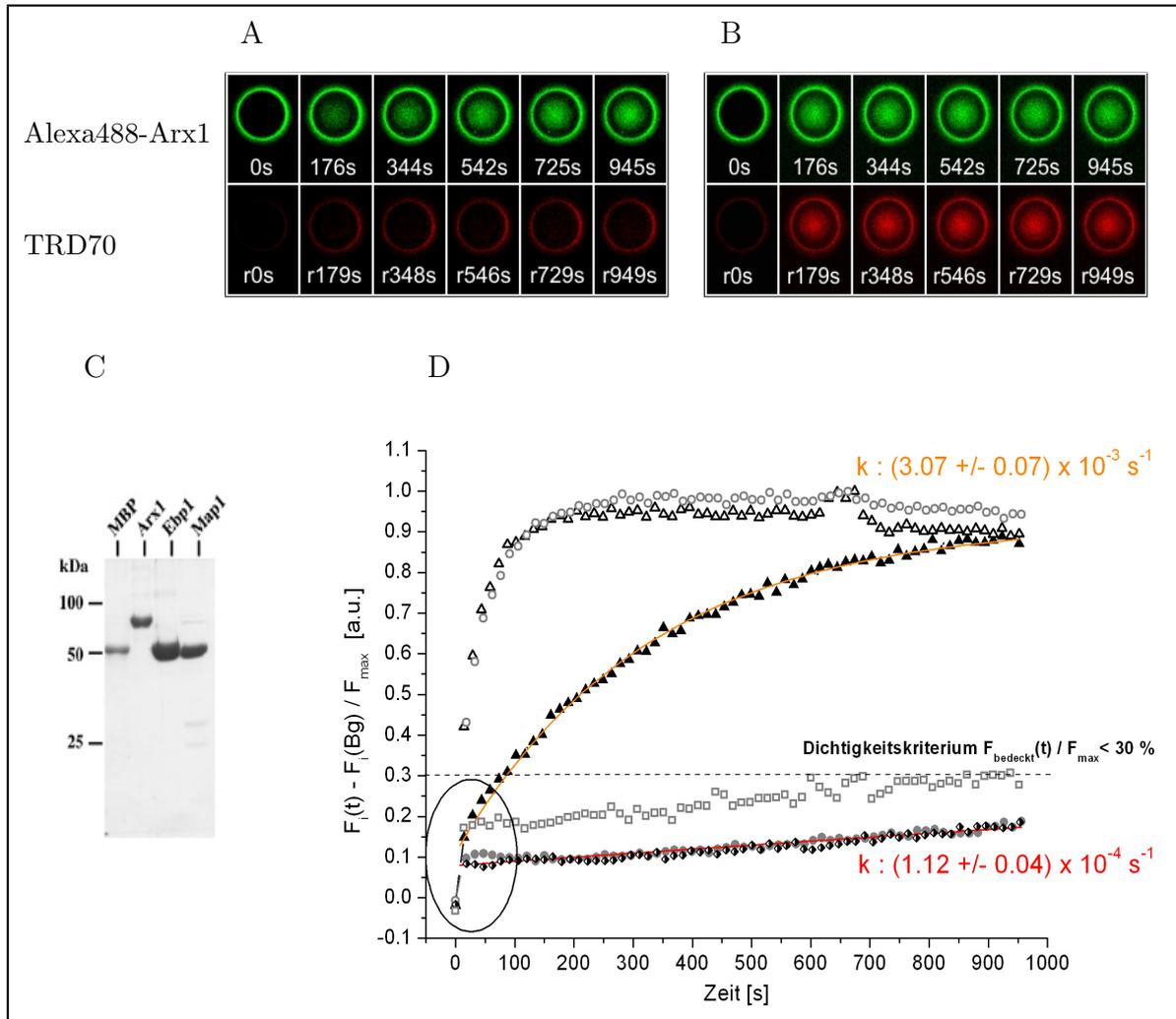


Abb. 13.1.: Export: Erleichterte Diffusion des Arx1 Proteins aus dem Nukleus mit dazugehöriger Transportkinetik

A: membranbedeckte TCs, **B:** offene Referenz TCs, **C:** Analytische SDS-PAGE nach Coomassie-Brilliant Blue Färbung der Proteinbanden Arx1 (64.6 kDa), Map1 (42.7 kDa), Ebp1 (47.4 kDa) [Quelle: B. Bradatsch] **D:** Zeitabhängiger Plot der normierten Fluoreszenzintensität von Alexa488-Arx1 ($\blacktriangle, \triangle$, grün), Alexa488-Map1 (\square), Alexa488-Ebp1 (\blacklozenge) und der Kontrolle TRD70 (\bullet, \circ , rot), teilweise mit dazugehörigen Fitkurven (orange & rote Linie); **Kreis:** Abweichung vom Fit; Bereich des schnellen Farbstoffeinstroms

theoretischen Verlauf bei der Diffusion eines Substrats durch eine semipermeable Membran, wie z.B. die Kernmembran mit den eingelagerten Kernporenkomplexen. Bei einer dichten Versiegelung der TCs durch die Kernmembran und dem Molekulargewicht des Alexa488-Arx1 von 65.2 kDa, welches deutlich über der Ausschlussgrenze der NPCs von 40 kDa^{55,66} liegt, kann somit davon ausgegangen werden, dass der beobachtete Einstrom auf eine erleichterte Diffusion des Arx1 Proteins durch den zentralen NPC-Kanal zurückzuführen ist. Dabei bindet Arx1, wie bereits durch Immunpräzipitations- und Oberflächenplasmonresonanz-Experimente nachgewiesen,¹³ direkt an die FG-Nukleopore im Innern des NPC-Kanals und diffundiert unterstützt durch die FG-Interaktionen entlang des Konzentrationsgradienten aus dem Nukleus in die Messvertiefungen. Dagegen gelangt das ähnlich große inerte TRD70 Kontrollsubstrat nur bis zu einem Wert von etwa 20 % im Vergleich zur Maximalintensität in das entsprechende TC, so dass bei Arx1 von einem spezifischen, bindungsabhängigen Transport ausgegangen werden kann.

Map1, das ebenso wie Arx1 zur Familie der Methionin-Aminopeptidasen gehört, zeigte in einem unabhängigen Experiment bei einer vergleichbaren Konzentrationsdifferenz von $\Delta C = 2.9 \mu\text{M}$ (Arx1: $3.75 \mu\text{M}$), dass es nicht spezifisch durch den NPC wandert, sondern sehr langsam in die membranbedeckten Vertiefungen einströmt (Abb. [13.1]). Denn zum Ende der Messung nach 945 s erreicht es lediglich etwa 30 % der Maximalintensität. Dabei ist zu beachten, dass Map1 im Vergleich zu Arx1 ein deutlich kleineres Molekulargewicht von nur 43.3 kDa besitzt. Dementsprechend konnte für das humane Sequenzhomolog Ebp1, das mit einem Molekulargewicht von 48 kDa ebenfalls knapp über der Ausschlussgrenze des NPCs liegt, kein spezifischer Export aus dem Nukleus beobachtet werden. Denn der Intensitätsverlauf für Ebp1 liegt, wie in Abbildung [13.1,D] dargestellt, auf gleicher Höhe wie derjenige für die TRD70 Dichtigkeitskontrolle aus dem Arx1 Experiment.

In Abbildung [13.1] werden beide Intensitätsverläufe, sowohl von Alexa488-Arx1, als auch von TRD70 durch die bereits angesprochene monoexponentielle Kurve mit Offset ohne den theoretisch vorhandenen Nullpunkt angenähert. Abgesehen vom sehr steilen Anstieg zu Beginn der Messung passt die exponentielle Fitfunktion nach etwa 50 s gut an die experimentellen Daten und bestätigt somit die Theorie bei der davon ausgegangen wird, dass die erleichterte Diffusion durch den NPC geschwindigkeitsbestimmend gegenüber der Kinetik des vorgelagerten Bindungsgleichgewichtes ist. Der besagte schnelle Anstieg der Intensität in den ersten 25-50 s der Messung, dessen Ratenkonstante um einen Faktor 40 größer ist als für den Arx1 Export, kann nur hinreichend erklärt werden, wenn davon ausgegangen wird, dass der freie Alexa488 Fluorophor nach der Proteinmarkierung nicht ausreichend abgetrennt wurde und in die Mess-TCs einströmt. Diese Annahme wird bestärkt durch die Beobachtung, dass dieser schnelle Einstrom in die membranbedeckten TCs bei allen Messungen sowohl mit Alexa488-Arx1, als auch mit Alexa488-Map1 oder Alexa488-Ebp1 in unterschiedlichen Ausprägungen zu erkennen ist. Der hier verwendete monoexponentielle Fit mit Offset trägt genau diesem Effekt sowie der vorhandenen Autofluoreszenz Rechnung, da er die Kurve nicht durch den theoretischen Nullpunkt legt, sondern weiter oben beginnen lässt.

Tab. 13.1.: Mittlere Ratenkonstante $\langle k \rangle$ und mittlerer molekularer Fluss $\langle \Phi_{norm} \rangle$ für die erleichterte Diffusion des Arx1 Proteins im Vergleich zu den Sequenz-bzw. Funktionshomologen Map1 und Ebp1

<i>Protein</i>	M_R	C_{Ch}	$\langle k \rangle \pm \sigma$	$\langle \Phi_{norm} \rangle \pm \sigma$
	kDa	bei $t = 0$ μM	$\times 10^{-3} s^{-1}$	bei $\Delta C = 1 \mu M$ $mol \cdot s^{-1} \cdot NPC^{-1}$
Alexa488-Arx1	65.2	3.75	4.8 ± 1.2 (22)	2.2 ± 0.5
Alexa488-Map1	43.3	2.9	0.28 ± 0.12 (8) ^a	- ^b
Alexa488-Ebp1	48.0	2.8	0.20 ± 0.09 (10)	0.14 ± 0.15

^a Statistik nur möglich, wenn als Dichtigkeitskriterium $F(t)/F_{max}(t) < 50\%$ statt der üblichen $< 30\%$ gewählt wird

^b Angabe eines Flusswertes, aufgrund großer Schwankungen nicht möglich

Die veränderte Auswertung der Arx1-Daten ergibt für die erleichterte Diffusion von Arx1 aus dem Nukleus eine mittlere Geschwindigkeitskonstante von $4.8 \pm 1.2 \times 10^{-3} s^{-1}$, die trotz der deutlich geringeren Anzahl von nur 22 verwertbaren Messungen sehr gut mit der bereits veröffentlichten Geschwindigkeitskonstante von $4.2 \pm 1.0 \times 10^{-3} s^{-1}$ übereinstimmt.¹³ Daraus errechnet sich bei einer Konzentrationsdifferenz von $\Delta C = 1 \mu M$ und einer NPC-Dichte⁵⁶ von $50 \text{ NPC}/\mu m^2$ eine mittlere molekulare Flussrate von 2.2 Molekülen pro NPC pro Sekunde. Im Vergleich dazu verlässt das viel kleinere, nur 26.8 kDa große GFP den Nukleus mit einer um die Hälfte niedrigeren Flussrate von 1.1 Molekülen pro NPC pro Sekunde und $1 \mu M$ Konzentrationsdifferenz. Demnach kann bei einem mehr als doppelt so großen Protein wie Arx1 von einer signifikanten Beschleunigung des Diffusionsprozesses als Folge einer Bindung an die FG-reichen Regionen der Nukleopore ausgegangen werden, da diese Änderung stärker ist als die mit GFP bestimmte Messgenauigkeit (siehe Abschnitt [12.1]). Die Flussrate für Ebp1, dessen Diffusion durch den NPC stark verlangsamt ist, liegt deutlich unter derjenigen für Arx1. Jedoch lies sich nach dem neuen Dichtigkeitskriterium von $F(t)/F_{max}(t) < 30\%$ keine einzige verwertbare Map1 Messung finden, so dass das bereits für die Veröffentlichung verwendete Dichtigkeitskriterium $< 50\%$ angewandt wurde, um eine Vergleichbarkeit mit Arx1 und Ebp1 zu ermöglichen. Map1 als aktive Methionine-Aminopeptidase besitzt laut Bindungsexperimenten¹³ keine Möglichkeit mit den FG-Regionen der Nukleopore wechselzuwirken und strömt nur sehr langsam mit einer mittleren Ratenkonstante von $0.28 \pm 0.12 \times 10^{-3} s^{-1}$ in die membranbedeckten TCs. Einen ähnlich langsamen Einstrom zeigt Ebp1, das mit einer mittleren Ratenkonstante von $0.20 \pm 0.09 \times 10^{-3} s^{-1}$, entsprechend einem molekularen Fluss von 0.14 Molekülen pro NPC pro Sekunde und $1 \mu M$ Konzentrationsdifferenz, in die bedeckten TCs wandert. Im Gegensatz zu den Ebp1 Experimenten, lies sich für Map1 kein Flusswert berechnen, da dieser aufgrund starker Schwankungen bei der erreichten maximalen Endkonzentration relativ große Abweichungen zeigte.

13.1.2. Arx1-Import: Vom Cytoplasma zum Nukleus

In Anlehnung an die GFP-Testreihe werden auch im Fall von Alexa488-Arx1 beide Richtungen der erleichterten Diffusion durch den NPC gemessen, indem die Kernmembran sofort im Anschluss an die jeweilige Exportmessung vorsichtig mit reinem Mock3 Puffer gespült wird, der mit einer leicht erhöhten Saccharosekonzentration von 120 mM versetzt wurde. Dies induziert durch Umkehr des Konzentrationsgradienten den Importprozess. Der Pufferaustausch erfolgt hierbei schneller als die vorherige Zugabe des Exportmixes, da nicht nur 10 μ l, sondern ein relativ großes Volumen von 35 μ l hinzugegeben werden muss. Der Wert des tatsächlich anliegenden Konzentrationsgradienten ist dabei nicht experimentell zugänglich, sondern wird indirekt aus der Fitfunktion und dem Verdünnungsfaktor ermittelt. Genauer gesagt, wird bei allen Importmessungen die jeweilige Konzentrationsdifferenz bestimmt, indem die Amplitude der monoexponentiellen Fitfunktion mit der Konzentration nach Verdünnung multipliziert wird. Dabei ist die Amplitude beim Importprozess gleichzusetzen mit der Differenz aus dem Maximalwert der jeweiligen Kurve minus dem Offset aus dem Fit.

Entsprechend der Darstellung des Exports, wird in Abbildung [13.2,A 1.Zeile] der Import des Alexa488-Arx1 Proteins aus den membranbedeckten TCs in den Nukleus gezeigt, wobei die Fluoreszenzintensität vom Anfangswert des Exports bei 0 s bis etwa 309 s deutlich langsamer abnimmt als in den offenen Vertiefungen der Abbildung [13.2,B]. Denn in den offenen Referenz-TCs ist im Vergleich zu den membranbedeckten TCs bereits nach 57 s kaum noch Fluoreszenz detektierbar. Die Fluoreszenzintensität der Dichtigkeitskontrolle besitzt zunächst ebenfalls den Wert aus der vorherigen Exportmessung und nimmt nach dem Pufferaustausch ähnlich schnell ab wie das Alexa488-Arx1 Protein. Gleichzeitig lässt sich, wie in der zweiten Zeile von Abbildung [13.2,A] zu sehen, in den membranbedeckten TCs nur sehr wenig Fluoreszenz der TexasRed-Dextran Kontrolle nachweisen. Diese liegt bei unter 20 % im Vergleich zu den offenen TCs, so dass wie schon beim Export von einer guten Membrananheftung und Dichtigkeit gesprochen werden kann.

Die Auftragung der normierten Fluoreszenzhelligkeit gegen die Zeit in Abbildung [13.2, C] zeigt für die membranbedeckten Vertiefungen eine langsame Abnahme der Fluoreszenzintensität der Dichtigkeitskontrolle bis auf unter 10 %. Dieser langsame Ausstrom ist im Gegensatz zum schnellen Einstrom kleinerer Fragmente während der vorher gezeigten Exportmessung (Abbildung [13.1, Kreis]), eher auf geringfügige Membranundichtigkeiten oder auf eine fließende NPC-Ausschlussgrenze von 40-60 kDa zurückzuführen. Im Fall der offenen Referenz-TCs nimmt die Intensität beider Substrate Alexa488-Arx1 und TRD70 erwartungsgemäß kurz nach dem Spülen rapide ab und bleibt bis auf einen geringfügigen Anstieg als Folge des sich neu einstellenden Verteilungsgleichgewichtes konstant. Der Endwert liegt nicht bei den theoretischen 0 % Fluoreszenz, sondern bei etwa 10-15 % des Maximalwertes zu Beginn der Importmessung. Die Fluoreszenzintensität des Alexa488-Arx1 Transportrezeptors nähert sich, wie bei vielen der ausgewerteten Messungen, dem Wert für die offenen Referenz-TCs. Jedoch kann diese unvollständige Abnahme nicht allein durch die Verdünnung der Probe erklärt werden, da die Zugabe

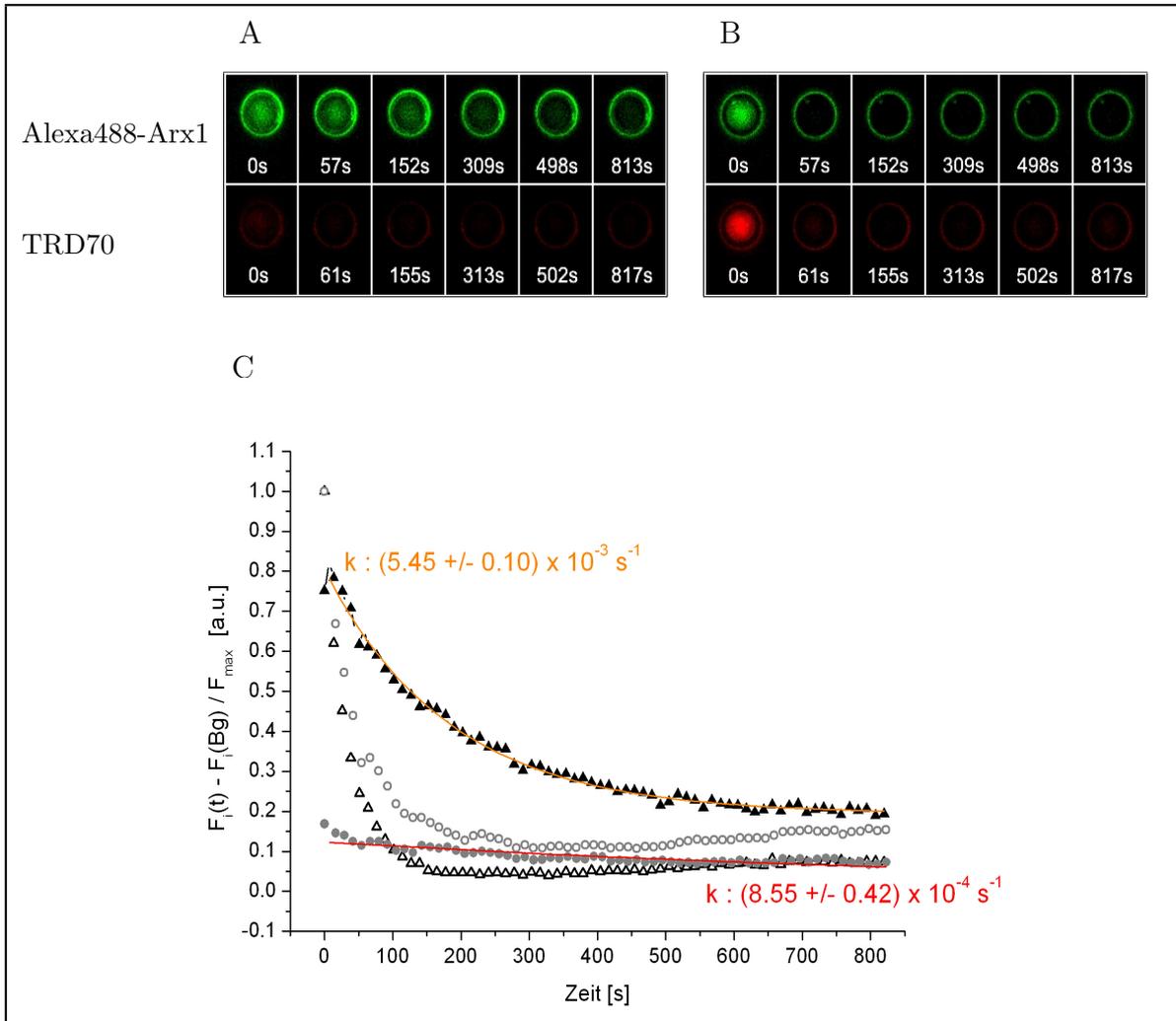


Abb. 13.2.: Import: Erleichterte Diffusion des Arx1 Proteins in den Nukleus mit dazugehöriger Transportkinetik

A: membranbedeckte TCs, **B:** offene Referenz TCs, **C:** Zeitabhängiger Plot der normierten Fluoreszenzintensität von Alexa488-Arx1 ($\blacktriangle, \triangle$, grün) und der Kontrolle TRD70 (\bullet, \circ , rot), teilweise mit dazugehörigen Fitkurven (orange & rote Linie)

von 35 μl Puffer zu dem 40 μl großen Reservoir über der Membran die Anfangskonzentration von Arx1 lediglich um 50 % auf etwa 1.75 μM erniedrigen würde. Wie in Kapitel [12] bereits erläutert, kann davon ausgegangen werden, dass die Ursache in einem unzureichenden Pufferaustausch liegt, der im Vergleich zu den Exportmessungen einen geringeren Konzentrationsgradienten zur Folge hätte. Sowohl die Alexa488-Arx1 als auch die TRD70 Transportkurve konnte entsprechend der Theorie mit einer monoexponentiellen Funktion gut angenähert werden, woraus sich für Arx1 eine Ratenkonstante von $(5.45 \pm 0.10) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ergab. Diese liegt im Vergleich zur Exportmessung in Abschnitt [13.1.1] um 78 % höher. Allerdings relativiert sich dieser große Unterschied durch die gemittelten Ratenkonstanten in Tabelle [13.2]. Dort werden die Ergebnisse aus allen ausgewerteten Importmessungen und Exportmessungen zur besseren Anschauung gegenübergestellt, wobei nicht bei allen Exportmessungen auch ein entsprechender Import durchgeführt wurde.

Tab. 13.2.: Vergleich zwischen Import und Export des Arx1 Proteins anhand der mittleren Ratenkonstante $\langle k \rangle$ und des mittleren molekularen Flusses $\langle \Phi_{norm} \rangle$ für die erleichterte Diffusion

<i>Protein</i>	M_R kDa	C_{Ch} bei $t = 0$ μM	$\langle k \rangle \pm \sigma$ $\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$	$\langle \Phi_{norm} \rangle \pm \sigma$ bei $\Delta C = 1 \mu\text{M}$ $\text{mol} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{NPC}^{-1}$
Alexa488-Arx1 _{exp}	65.2	3.75	4.8 ± 1.2 (22)	2.2 ± 0.5
Alexa488-Arx1 _{imp}	65.2	2.5	3.8 ± 1.6 (19)	1.3 ± 0.4

Der Vergleich in Tabelle [13.2] macht deutlich, dass die jeweiligen Geschwindigkeitskonstanten k zwar voneinander abweichen, aber aufgrund des großen relativen Fehlers von 25 % respektive 42 % des Messwertes dennoch innerhalb der einfachen Standardabweichung liegen. Folglich stimmen die Geschwindigkeitskonstanten für Import und Export im Rahmen der Messgenauigkeit überein. Dies ist für einen typischen Transportrezeptor, der an die FG-Nukleopore im NPC-Kanal bindet, zu erwarten, da dessen erleichterte Diffusion ohne kompartimentabhängige Bindungen an Proteine und ohne assoziierte Cofaktoren nur durch die Richtung des Konzentrationsgradienten bestimmt wird. Der Unterschied beim molekularen Fluss für den Import- und Exportprozess von Arx1 erklärt sich durch die lineare Abhängigkeit zwischen Ratenkonstante k und der anliegenden Konzentrationsdifferenz, die im Fall des Imports vermutlich geringer ausfällt.

13.2. Diskussion und Ausblick

Die kinetische Analyse des Arx1 Transportes durch den NPC konnte zeigen, dass Arx1 ohne Wirkung weiterer Cofaktoren richtungsunabhängig durch intakte Kernporenkomplexe diffundiert. Im Hinblick auf seine biologische Funktion als zusätzlicher Rezeptor während des Exports von 60S ribosomalen Vorstufen aus dem Nukleus stellt sich die Frage, ob Arx1 seine Funktion erfüllen kann, wenn die Transportrate für den Export

bei $(4.8 \pm 1.2) \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ liegt, was bei einer Konzentrationsdifferenz von $1 \mu\text{M}$ einem Transport von 2.2 Molekülen pro NPC pro Sekunde entspricht. Bisher bekannt ist lediglich eine Abschätzung des ribosomalen Transportes, der mit einem durchschnittlichen Wert von etwa 1 Ribosom pro NPC pro 3 s angegeben wird.^{13,32} Deren relativ langsame Flussrate im Vergleich zu den *in vitro* gemessenen Werten für Arx1 lassen sich möglicherweise durch die Größe der pre-60S Untereinheiten, die ein höheres Molekulargewicht als die reinen 60S Einheit mit 2800 kDa besitzen, erklären. Dabei unterstützt das von *R. Peters* entwickelte ROD-Modell,⁷⁹ die hier genannte Erklärung, denn das Modell bedingt eine indirekte Proportionalität zwischen Translokationsgeschwindigkeit und Durchmesser der Transportkomplexe. Im Fall von Ribosomen kann sogar davon ausgegangen werden, dass deren Durchmesser von etwa 25 nm im Bereich des maximalen NPC-Kanalradius von 39 nm⁷⁷ liegt und die Transportrate stark reduziert wird.⁷⁹ Dies kann auch der Grund sein, weshalb *in vivo* neben Arx1 noch zwei weitere Transportrezeptoren (NTRs) Xpo1 und Mex67/Mtr2 am Export der pre-60S Untereinheiten mitwirken, um ein günstigeres Verhältnis zwischen den großen ribosomalen Substraten und den an die FG-Regionen bindenden Proteinen herzustellen. Deshalb wäre es sicher von großem Interesse, die bisherigen Daten durch Transportanalysen mit isolierten pre-60S Vorstufen oder Teilen davon als Substrate zu ergänzen. Ein Vergleich der Translokationsrate eines Transportrezeptors mit derjenigen aller drei NTRs könnte Hinweise darauf liefern, ob die Transportrezeptoren, wie von *D. Görlich* postuliert, katalytisch d.h. beschleunigend auf den Transportprozess wirken und erst durch ihre konzertierte Funktionsweise nennenswerte Geschwindigkeiten für den ribosomalen Transport erreichen.

Energetisch betrachtet können im Fall sehr großer Komplexe wie Ribosomen ebenfalls nur möglichst viele gebundene NTRs den Energieverlust, verursacht durch Oberflächenladungen und Ablegen der Hydrathülle, kompensieren und infolge der freiwerdenden Bindungsenergie die nötige positive Energiebilanz bewirken. Es erscheint ein regelrechter Kraftakt zu sein, diese großen ribosomalen Vorstufen ins Cytoplasma zu transportieren. Dabei stellt sich sicherlich die Frage, ob spezielle NPC-Populationen ausschließlich für den Transport dieser großen ribosomalen Komplexe verantwortlich sind, damit die Vielzahl an nukleozytoplasmatischen Transportwegen nicht dauerhaft verlangsamt oder blockiert werden.⁹² Eine solche Frage ließe sich mit der besagten Transporteranalyse nur beantworten, wenn Messarrays mit sehr viel kleineren Vertiefungen hergestellt werden, die eine Analyse von einzelnen Transporterpopulationen ermöglichen.

Im Allgemeinen kann bei Betrachtung der gesamten zellulären Umgebung ferner davon ausgegangen werden, dass eine sehr hohe Gesamtkonzentration an Makromolekülen zu erwarten ist, die in *Escherichia coli* abhängig von der Wachstumsphase in einer Größenordnung von 200-300 g/l liegt,²⁶ das heisst weit entfernt von der hier verwendeten Menge von ungefähr 0.1 g/l. Dieser Effekt der von *R.J. Ellis* als "molecular crowding" beschrieben wird, beruht auf der Tatsache, dass Makromoleküle wegen der sterischen Abstoßung ein sogenanntes Ausschlussvolumen besitzen und sich nicht beliebig annähern können. Demnach würde sich eine so hohe Konzentration zum einen verlangsamernd auf die freie Diffusion auswirken und somit auf diffusionskontrollierte Prozesse, bei denen die Diffusion zum NPC geschwindigkeitsbestimmend ist. Zum Anderen würde sich, im Gegensatz zu den bereits beschriebenen verlangsamernden Wirkun-

gen, die Geschwindigkeit der Bindung von Transportrezeptoren an die FG-Regionen der Nukleopore erhöhen. Dies wiederum verschiebt das dazugehörige Gleichgewicht in Richtung Bindung. Eine Möglichkeit, den Einfluss einer zellulären Umgebung mit hoher Makromolekülkonzentration zu simulieren, läge in der Zugabe von inerten Proteinen in einer hohen physiologisch relevanten Konzentration, die weder unspezifisch an die Kernmembran noch an die Kernporenkomplexe binden. Deshalb sollten *in vitro*-Messungen, die eine genaue Analyse der einzelnen Komponenten ohne Störfaktoren oder zelluläre Einflüsse ermöglichen, nur als komplementäre Ergänzung zu den notwendigen *in vivo* Messungen gesehen werden. Genau diese Unabhängigkeit von zellulären Störfaktoren oder zellulärem Hintergrund stellt jedoch die Stärke jeder *in vitro*-Methode dar, sofern sie sich am lebenden Vorbild orientiert, da in großer Menge Proteine, Inhibitoren oder Pharmaka individuell im Hinblick auf ihre Auswirkung z.B. auf den ribosomalen nucleocytoplasmatischen Transportweg getestet werden können.

14. Kinetische Charakterisierung des viralen RRE-RNA Transports

Viren, die aufgrund ihrer Größe ein stark reduziertes Genom enthalten und selbst keinen Stoffwechsel besitzen, müssen eine Vielzahl an Proteinen aus ihrer jeweiligen Wirtszelle nutzen, um ihre Vermehrung sicherzustellen. Dazu zählen beispielweise Zellrezeptoren für die Anheftung, DNA- und RNA-Polymerasen für die Replikation und Transkription, Transportfaktoren für den nukleocytoplasmatischen Transport der RNA-Transkripte und Ribosomen für die Proteinbiosynthese. Besonders entscheidend ist hierbei das Ausschalten zellulärer Kontrollmechanismen, um ungestört und unerkannt in der Wirtszelle zu verbleiben. Ein solcher Mechanismus, der speziell auch bei Retroviren wie dem humanpathogenen HIV-1 eine Rolle spielt, stellt die Exportkontrolle der RNA-Transkripte im Zellkern dar, die nur vollständig-prozessiert und gespleißt aus dem Nukleus transportiert werden dürfen. Diese Kontrolle müssen Retroviren ausschalten, da sie ihre vielfältigen Strukturproteine aus ihrem relativ kurzen Genom nur herstellen können, wenn sie unvollständig gespleißte oder gar nicht gespleißte RNA-Transkripte herstellen. HIV-1, das sein RNA-Genom in Form eines DNA-Provirus in das Genom der Wirtszelle integriert, hat hierfür ein spezielles System aus einer RNA-Erkennungssequenz und einem Transportadapterprotein entwickelt. Als RNA-Erkennungssequenz wirkt eine komplexe 224 Nukleotide lange RNA-Loopstruktur in der Nähe des *env*-Gens, das sogenannte Rev-Responsive-Element, das von dem viruseigenen Adapterprotein Rev erkannt und maskiert wird, so dass der Export von ungespleißter, Intron enthaltender Virus-RNA über das Crm1-Exportsystem der Wirtszelle erfolgen kann. Folglich bewirkt eine nicht funktionelle RRE-RNA eine vollständige Inhibition der Virusreplikation, da das Intron enthaltende RNA-Genom des HIV-1 Virus durch das zelluläre System gespleißt und infolgedessen unvollständig ins Cytoplasma transportiert wird. So können keine funktionsfähigen Viruspartikel zusammengesetzt werden, weshalb dieser wichtige Schritt in der Virusvermehrung ein potentiell wichtiges Ziel für antivirale Pharmaka darstellt. Vor diesem Hintergrund kann die Etablierung eines *in vitro*-Testsystems zur quantitativen Analyse des RRE-RNA Transportweges einen wichtigen Beitrag für künftige Untersuchungen von neuartigen Wirkstoffen liefern oder im Bereich der Grundlagenforschung die Wirkung neuer zellulärer Cofaktoren analysieren.

14.1. *In vitro*-Transkription der RRE-RNA

Zur exemplarischen Untersuchung dieses viralen RNA-Exportweges, genügt die Herstellung des isolierten Rev-Responsive-Elements, da dieser Teil der viralen RNA als Erkennungssequenz für das viruseigene Rev Protein ausreicht, welches wiederum über seine

NES und NLS-Sequenz körpereigene Transportrezeptoren rekrutiert. Die RRE-Sequenz wurde als Teil des Reportervektors pLRedR von unserem Kooperationspartner *Kamyar Hadian* (Gruppe Prof. Brack-Werner, GSF Neuherberg),¹¹⁵ zusammen mit gereinigtem rekombinant hergestelltem RevGFP-StrepTag und GFP-StrepTag Kontrollprotein erhalten. Das StrepTag, eine kurze Aminosäuresequenz, dient hierbei lediglich der Affinitätsreinigung der exprimierten Proteine über eine sogenannte StrepTactin-Sepharose mit immobilisiertem Streptavidin. Lange RNA Sequenzen lassen sich in der Regel relativ einfach enzymatisch mit Hilfe der T7-RNA Polymerase transkribieren, sofern das zugrunde liegende DNA-Template direkt vor der Klonierungsstelle einen T7 Promotor enthält, an den das Enzym bindet. Das pLRedR allerdings enthält zwar den T7 Promotor, aber vor der RRE-Sequenz sowohl ein rot fluoreszierendes DsRed Protein als auch kurze Bereiche aus dem HIV-1 Genom, die zusammen mit der RRE-Sequenz transkribiert würden. Dies macht die Klonierung der RRE-Sequenz in einen speziell für die *in vitro*-Transkription geeigneten Vektor, wie beispielsweise pGEM-3Zf(+) oder pTZ19R, notwendig, um ein definiertes Transkript der reinen RRE-RNA Sequenz zu erhalten. Die Identifikation der positiven Klone, die die RRE-Sequenz als Insert enthalten, erfolgte mittels der in Abschnitt [7.9] beschriebenen Blau-Weiß-Selektion. Im Anschluss an die Klonierung wurde die korrekte Orientierung der RRE-RNA durch einen Kontrollschnitt mit der Endonuklease HindIII kontrolliert (Ergebnis nicht gezeigt) und die Sequenz der RRE-Sequenz durch Sequenzierung und Vergleich mit den Sequenzen aus Datenbank und Literatur, wie in der folgenden Abbildung gezeigt, überprüft.

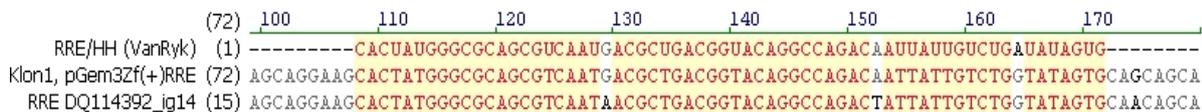


Abb. 14.1.: Sequenzalignment mit VektorNTI Advance 10 (Invitrogen)

- 1.Zeile:** RRE/HH (Quelle: D.I. VanRyk, S. Venkatesan⁹⁴);
- 2.Zeile:** RRE/HH Sequenz aus dem pGEM-3Zf(+) Vektor eines positiven Klons (weiße Kolonie);
- 3.Zeile:** RRE-Sequenz DQ114392ig14 aus der Datenbank

Die RRE-Sequenzen der *in vitro*-Transkriptionsvektoren, in Abbildung [14.1] pGEM-3Zf(+)RRE als exemplarisches Beispiel gezeigt, wiesen eine hohe Similarität zu den Sequenzen verschiedener HIV-1 Stämme aus der NCBI Datenbank auf. Der in Abbildung [14.1] gelb unterlegte Bereich stellt die hochaffine Rev-Bindungsstelle dar, dessen Sequenz bis auf ein Nukleotid an Position 164 mit den Angaben aus der Literatur übereinstimmt. Demnach wird keine Beeinträchtigung der RRE-Erkennung durch Rev erwartet. Denn zum einen findet sich an der angesprochenen Position 164 eine Übereinstimmung zwischen Datenbank-Sequenz und pGEM-3Zf(+)RRE Vektor. Zum anderen liegen die abweichenden Nukleotide d.h. mögliche Mutationen in einem Bereich, der für die Sekundärstrukturbildung der RRE sowie für die Rev Bindung unerheblich sind. In Folge der hohen Variabilität im Virusgenom von HIV finden sich unter den einzelnen in der Datenbank aufgelisteten Stämmen zudem häufig deutliche Unterschiede in der Nukleotidsequenz, die keine Auswirkung auf die Funktionsweise der jeweiligen Rev-Responsive Element Bereiche haben.^{53,83,94} Die Abweichungen an Position 129 und

Position 153 zwischen dem isolierten Vektor aus einem der positiven Klone und der Datenbank können vermutlich auf diese Variationen zurückgeführt werden.

Im Anschluss an die Sequenzanalyse wurden diejenigen Vektoren, die ein korrektes RRE-Insert enthielten, in Bakterien vermehrt, isoliert und mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease linearisiert, um das DNA-Template für die *in vitro*-Transkription zu erhalten. Zur Verwendung des Transkripts in nukleocytoplasmatischen Transportmessungen mit isolierten *Xenopus laevis* Kernmembranen müsste dieses noch mit einem geeigneten Fluoreszenzfarbstoff markiert werden.

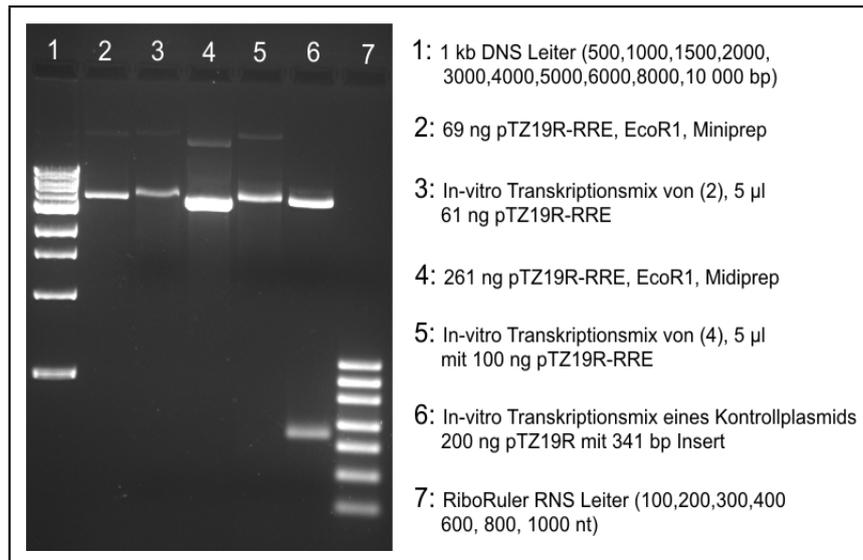


Abb. 14.2.: 2% Agarosegel zur Kontrolle der *in-vitro* Transkription der RRE-RNA mit pTZ19R als Vektor-Template und der T7-RNA Polymerase

Sowohl die in Abbildung [14.2] gezeigte *in vitro*-Transkription mit pTZ19R-RRE, als auch weitere Transkriptionen mit pGEM-3Zf(+)-RRE lieferten kein Transkript. Dabei war nicht von Bedeutung mit welcher präparativen Isolationsmethode, sei es als sogenannte Midi- oder Minipräparation, die jeweiligen linearisierten Transkriptionsvektoren gewonnen wurden, wie ein Vergleich der Bahnen 3 und 5 in Abbildung [14.2] verdeutlicht. Im Vergleich dazu beweist die zusätzlich zum DNA-Template detektierte Bande in Bahn 6 mit einer Länge zwischen 300-400 Basen, dass unter Verwendung des gleichen Transkriptionsmixes inklusive T7-RNA-Polymerase das 341 Basen lange Insert des pTZ19R-Kontrollvektors vollständig synthetisiert werden konnte. Ein präparativer Fehler kann aufgrund der Positivkontrolle somit ausgeschlossen werden. Die leicht verkürzte Wanderungsstrecke des *in vitro*-Transkriptionsmixes im Vergleich zum jeweiligen DNA-Template (siehe Bahn 2 & 3, sowie Bahn 4 & 5) lässt sich auf eventuell noch gebundenes Enzym zurückführen, welches die Größe und Ausdehnung des pTZ19R-RRE Vektors geringfügig erhöht und somit ähnlich einem Gelshift zu einer Retardierung der Probe führt. Weitere Versuche das Vollängen-RRE Transkript zu erhalten, wie die Herstellung eines besonders reinen DNA-Templates aus dem pTZ19R-RRE Vektor mittels PCR oder die Verwendung einer neu bestellten T7-RNA-Polymerase, blieben ebenfalls erfolglos.

Deshalb wurde als weitere Strategie die chemische Synthese der RNA durch die Firma Biospring in Frankfurt gewählt, um die kinetischen Transportmessungen durch den NPC mit RevGFP-StrepTag und Crm-1 verwirklichen zu können. Dies bietet zwar den Vorteil gleichzeitig mit der Synthese am 5'-Ende der RRE-RNA die gewünschte Fluoreszenzmarkierung in Form eines mit Cy3-modifizierten Nukleotids anzubringen, führt aber zu dem Nachteil, die RRE nicht in ihrer gesamten Länge synthetisieren zu können. Ein geeignetes verkürztes Segment der RRE-RNA stellt der Bereich von Nukleotid 50-113 dar, der die zentrale, hochaffine Bindestelle für Rev bildet und dessen Stammschleifen ("stem-loops,") häufig in II A/B/C oder B/B1/B2 unterteilt werden.⁹⁴ Im Folgenden wird diese verkürzte RRE-Sequenz in Anlehnung an *D.I. Van Ryk* und *S. Venkatesan*⁹⁴ als RRE/HH-Fragment bezeichnet.

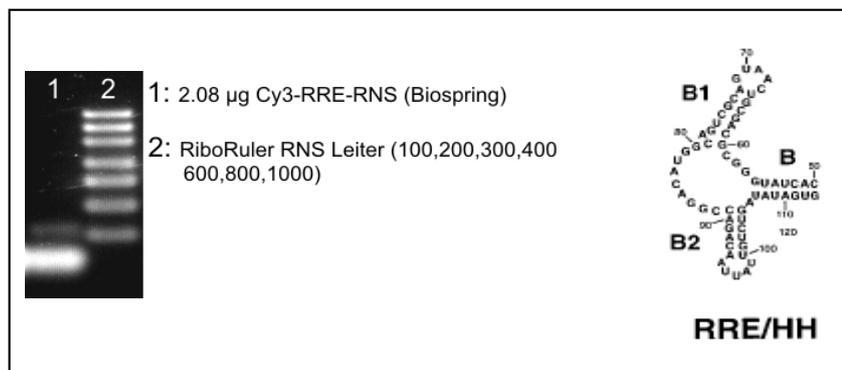


Abb. 14.3.: links: 2% Agarosegel mit dem von Biospring Laboratories synthetisierten Cy3-RRE/HH-Fragment aus 63 Nukleotiden (Sequenz 50-113 der Vollängen-RRE); rechts: RRE/HH-Sequenz aus *D.I. Van Ryk* und *S. Venkatesan*⁹⁴

Das Agarosegel [14.3,links] zur Qualitätskontrolle des synthetisierten RRE/HH-Fragments mit einer 5'-Cy3 Markierung zeigt eine einzelne Bande, deren Länge ermittelt aus einer Eichgerade des RNA-Längenstandards etwa 69 Nukleotide beträgt. Dieser Wert liegt nahe an dem zu erwartenden Wert von 63 Nukleotiden für die zentrale Rev-Binderegion von Nukleotid 50-113 der vollständigen RRE-Sequenz, so dass von einer vollständigen Synthese ausgegangen werden kann. Die Probe besitzt zudem eine hohe Qualität und Reinheit, da weitere Fragmentbanden mit kürzeren Sequenzen aus Syntheseabbrüchen fehlen. Das RRE/HH-Fragment wird deshalb, sowohl für den Bindungsassay mit RevGFP-StrepTag als auch für die *in vitro*-Messungen der NPC-Translokationskinetik, direkt, ohne weitere Reinigung, verwendet. Als Vergleich ist in Abbildung [14.3,rechts] die Sekundärstruktur der zentralen hochaffinen Rev-Bindestelle RRE/HH zu sehen, deren Stammschleifen-Struktur für das synthetisierte Fragment ebenfalls so erwartet wird.

14.2. Bindungsnachweis zwischen RevGFP und Cy3-RRE/HH-Fragment

In zahlreichen Untersuchungen konnte nicht nur die RRE-Rev Bindung mittels Gelshift nachgewiesen werden,^{19,68} sondern auch in Oberflächenplasmonresonanz-Experimenten die Dissoziationskonstante für den Komplex aus RRE/HH-Fragment und Rev ermittelt,⁹⁴ sowie mittels NMR die Sekundärstruktur dieser Bindung⁵³ aufgeklärt werden. Folglich ist eine Bindung des Rev Proteins an das RRE/HH-Fragment theoretisch zu erwarten. Trotzdem stellt sich im Anschluss an die Qualitätskontrolle des erhaltenen RRE/HH-Fragments die Frage, ob das mit Cy3 markierte virale RNA-Fragment von dem hier verwendeten Rev-GFP Fusionsprotein als Substrat erkannt und gebunden wird, obwohl GFP mit seinen 26.9 kDa als Fusionspartner deutlich größer ist als das kleine nur 13 kDa große Revprotein. Denn aus diesem deutlichen Größenunterschied könnte eine sterische Hinderung resultieren, die eine Bindung an die RRE-Struktur ausschließt.

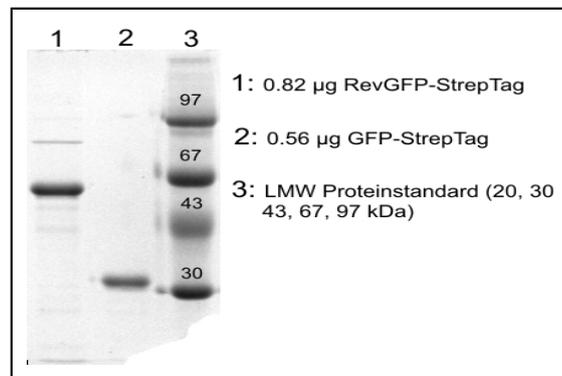


Abb. 14.4.: Coomassie-gefärbtes 12%iges SDS-Acrylamidgel zur Qualitätskontrolle der RevGFP-StrepTag, sowie GFP-StrepTag Proteinproben von *Kamyar Hadian* (GSF, Neuherberg)

Zunächst konnte in einem SDS-Acrylamidgel, die hohe Reinheit des RevGFP-Proteins bestätigt werden. Denn wie Abbildung [14.4, Bahn 1] verdeutlicht, finden sich neben der Hauptbande von RevGFP-StrepTag, die in der Höhe eines Proteins mit einem Molekulargewicht von etwa 59.7 kDa läuft, nur eine vernachlässigbare Anzahl an gering konzentrierten unspezifischen Banden. In gleicher Weise findet sich in der GFP-StrepTag Probe in Bahn 2 der obigen Abbildung nur eine detektierbare Proteinbande, deren Molekulargewicht von ungefähr 31.6 kDa allerdings etwas über dem erwarteten Wert von 27.9 kDa liegt. Die Abweichung des theoretisch Molekulargewichts von 40.1 kDa für das RevGFP-StrepTag Fusionsproteins von dem ermittelten Wert von 59.7 kDa erscheint zwar etwas hoch, aber angesichts der Tatsache, dass auch das GFP-StrepTag Protein etwas zu hoch detektiert wird, können diese Effekte auf veränderte Laufeigenschaften des Proteinstandards zurückgeführt werden.

Die sehr reinen RevGFP-StrepTag und GFP-StrepTag Proben konnten somit im Folgenden zur Verifikation einer spezifischen Bindung des viralen Rev an das synthetisierte

Cy3-RRE/HH-Fragment verwendet werden. Zur Analyse mittels Gel-Shift-Assay wurden das rekombinant hergestellte RevGFP-StrepTag, als auch die Negativkontrolle GFP-StrepTag, in vierfachem molaren Überschuss mit RRE-RNA inkubiert und auf einem Agarosegel hinsichtlich ihrer jeweiligen Laufstrecken verglichen. Die Negativkontrolle erlaubt es die Spezifität der Bindung nachzuweisen und somit eine mögliche Interferenz des StrepTag-Affinitätsmarkers mit der spezifischen Rev-RRE/HH Bindung auszuschließen, da dieser sonst enzymatisch entfernt werden müsste.

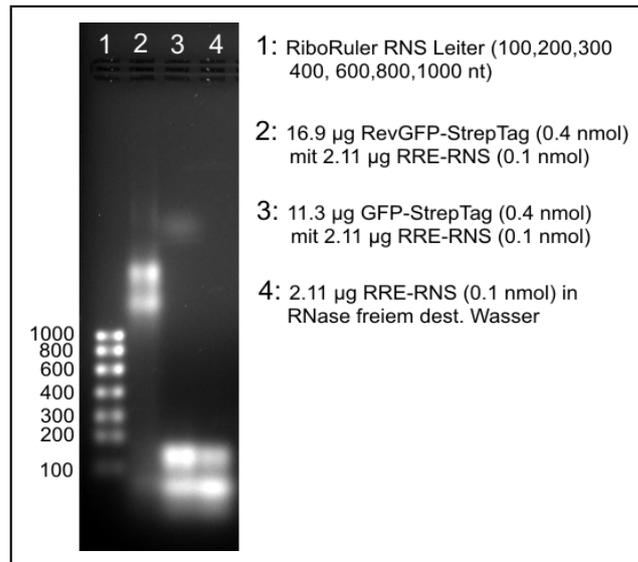


Abb. 14.5.: 2% Agarosegel zum Nachweis der Interaktion zwischen RevGFP-StrepTag und RRE durch einen bindungsabhängigen Gelshift

Bahn 1: RiboRuler-RNA Marker; **Bahn 2:** Gelshift nach 10 min Inkubation eines vierfachen molaren Überschusses an RevGFP-StrepTag mit Cy3-RRE/HH; **Bahn 3:** Negativkontrolle, gleiche Mischung wie Bahn 2 mit GFP-StrepTag und RRE/HH, Nachweis der Spezifität der Interaktion; **Bahn 4:** RRE/HH-Vergleichsprobe; alle drei Mischungen wurden unter gleichen Bedingungen inkubiert

Während GFP-StrepTag (Abbildung [14.5], Bahn 2) die Mobilität der durch Ethidiumbromid detektierten RRE-RNA nicht veränderte, konnte für das RevGFP-StrepTag eine deutliche Reduktion der Mobilität in Form eines bindungstypischen Bandenshifts beobachtet werden, wie in Abbildung [14.5] deutlich zu erkennen ist. Dies beweist nicht nur die Bindungsfähigkeit von RevGFP, sondern auch die Spezifität der Interaktion mit dem RRE, da sich nur im Fall des spezifischen Bindungspartners RevGFP ein Komplex bildet, welcher im Agarosegel retardiert wird. Die RRE-RNA in Bahn 3 der Abbildung [14.5] bildet eine Doppelbande aus, die nach Vergleich mit der relativen Mobilität der RNA-Leiterbanden eine Länge von 77, sowie 145 Nukleotiden aufweist. Dies spricht für eine Dimerbildung, die in der Literatur bereits für die im Vergleich zur RRE/HH noch weiter verkürzte Stammschleife IIB der RRE-RNA⁷ beschrieben wurde. Denn im Gegensatz zur Qualitätskontrolle in Abbildung [14.3] konnten die hier verwendeten Proben

nicht, wie zur Auflösung von Sekundärstrukturen üblich, aufgeköcht werden, um die bei Interaktionen zwischen RNA und Protein vorherrschenden schwachen Wechselwirkungen nicht zu zerstören. Interessanterweise wird auch die Dimerstruktur des RRE/HH-Fragments vom Rev-Protein erkannt und gebunden, da die doppelte Bande auch nach dem Mobilitätsshift noch zu erkennen ist.

In ersten OSTR-Transportversuchen mit RevGFP-StrepTag ohne Substrat bildeten sich große fluoreszierende Aggregate, die selbst nach mehrmaligem Zentrifugieren nicht ausreichend abgetrennt werden konnten, um Messungen durchzuführen. Genau diese Interaktionsfähigkeit benötigt Rev, um seine Funktion als Adapterprotein für retrovirale mRNAs zu erfüllen.^{53,83} Denn wie erwähnt, ermöglicht erst eine Maskierung der viralen RNA durch gebundene Rev-Multimere, dass die intronenthaltende RNA der natürlichen zellulären Exportkontrolle entgeht und folglich nicht im Nukleus zurückgehalten, sondern für die Virusreplikation ins Cytoplasma transportiert wird. In einem nativen Acrylamidgel, welches den Nachweis von Bindungen ermöglicht, sollte anhand eines Mobilitätsshifts geklärt werden, ob sich die Rev-Aggregate, vermutlich gebildet über deren Multimerisierungsdomäne, nach Zugabe des RRE/HH-Bindungspartners auflösen. Dabei wird erwartet, dass bei der verwendeten äquimolaren Mischung nur 1:1 Komplexe aus Rev-Monomeren und den vorher nachgewiesenen RRE/HH-Dimeren zu beobachten sind.

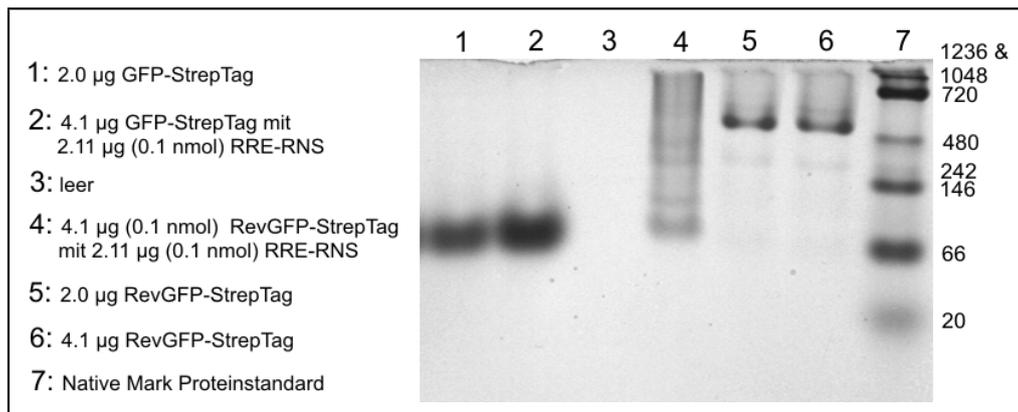


Abb. 14.6.: Native Polyacrylamidgelelektrophorese mit 8 % Trenngel zum Nachweis hochmolekularer RevGFP-StrepTag Aggregate

Bahn 1 & 2: Negativkontrolle mit GFP-StrepTag als Vergleich, jeweils ohne und mit RRE-RNA, **Bahn 4:** Auflösung der RevGFP-StrepTag Aggregate aus Bahn 5 & 6 nach Zugabe von RRE-RNA, **Bahn 5 & 6:** hochmolekulare RevGFP-StrepTag Aggregate mit MW \approx 500 kDa

Das Molekulargewicht der hochmolekularen Aggregate aus RevGFP-StrepTag Monomeren in Abbildung [14.6, Bahn 5,6] lässt sich durch Vergleich mit einer Eichgeraden des nativen Proteinstandards auf etwa 500 kDa schätzen. Allerdings muss hierbei beachtet werden, dass für die GFP-StrepTag Negativkontrolle ein unerwartet hohes Molekulargewicht von 73.5 kDa ermittelt wird, das selbst unter der Annahme einer möglichen GFP-Dimerbildung (theoretisches MW = 55.8 kDa) nicht ausreichend erklärt werden

kann. Die aus der Laufstrecke der Proteinbanden ermittelten absoluten Werte für das Molekulargewicht sind somit nur als Richtwerte anzusehen, vor allem weil die Mobilität im nativen Gel wegen der fehlenden Maskierung durch die negativen Ladungen des SDS von vielen intrinsischen Proteineigenschaften beeinflusst wird. Trotzdem konnte die Auflösung der RevGFP-StrepTag Aggregate nach Zugabe des Cy3 markierten RRE/HH-Fragments in Bahn 4 der Abbildung [14.6] eindeutig bewiesen werden, da die Proteinbande bei etwa 500 kDa nach RRE/HH-Bindung nicht nur verschmiert wird, sondern auch einzelne niedermolekulare Banden sichtbar werden. Demnach scheint das gewählte molare Mischungsverhältnis von 1:1 nicht auszureichen, um die Aggregate vollständig aufzulösen. Stattdessen bilden sich eine Vielzahl von unterschiedlichen Komplexen mit verschiedenen Rev-RRE Verhältnissen, die sich über einen breiten Molekulargewichtsbereich verteilen. Die unterste Bande in dieser Verteilung hat ein geschätztes Molekulargewicht von 89 kDa, was einem Komplex aus zwei RRE/HH-Molekülen mit ungefähr 20.8 kDa und einem RevGFP-StrepTag-Protein mit 40.9 kDa entspräche. Dies ist unter den gegebenen Bedingungen nachvollziehbar, denn die Cy3 markierte RRE/HH-RNA liegt gemäß Abbildung [14.5] als Dimer vor, wenn die Proben, wie auch in diesem Fall geschehen, vor dem Gelauftrag nicht mehr denaturiert werden. Wie ein Vergleich mit der GFP-StrepTag Negativkontrolle Abbildung [14.6, Bahn 1 & 2] zeigt, werden die vorliegenden GFP-Dimere in Anwesenheit von RRE/HH nicht aufgelöst. Dies liefert folglich den Beweis, dass die gebildeten hochmolekularen Aggregate Rev-spezifisch sind und nicht durch den GFP-Fusionspartner verursacht werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Cy3 markierten RRE/HH-Moleküle zur Dimerbildung neigen, während sich RevGFP-StrepTag-Proteine über ihre Multimerisierungsdomänen zu hochmolekularen Aggregaten verbinden. Beide beobachteten Eigenschaften interferieren jedoch nicht mit der spezifischen Interaktion zwischen RevGFP-StrepTag und RRE/HH-Fragment, die beide trotzallem einen für Transportstudien unerlässlichen 1:1 Komplex bilden. Somit eignen sie sich als Substrat für die Untersuchung des Crm1 abhängigen retroviralen Exportweges in Form von nukleocytoplasmatischen Transportstudien, die in den folgenden Abschnitten dokumentiert werden.

14.3. Analyse des Transportrezeptors Crm1

Das humane Crm1-Protein stellt als einer der zellulären Transportrezeptoren ein optimales Zielprotein für Viren dar, die sich so die hohe Effizienz des Crm1 Exportrezeptors zu Nutze machen, um ihren Replikationszyklus zu vervollständigen. Aus der Vielfalt an viralen Exportprozessen, an denen Crm1 beteiligt ist, seien hier nur exemplarisch der Export intronenthaltender mRNA aus HIV-1³⁴ oder viraler Hüllproteine, wie pp65 aus dem Cytomegalivirus,⁹⁵ genannt. In dieser Arbeit soll durch eine systematische, quantitative Untersuchung des Crm1 Transportweges auch im Hinblick auf beteiligte Cofaktoren, wie das Guaninnukleotid-bindende Protein Ran oder die Helikase DDX3,¹¹⁹ eine Basis für ein tieferes Verständnis der viralen Transportwege geschaffen werden. Daneben bietet die Etablierung eines Testsystems für den retroviralen RRE-RNA Export die Möglichkeit, Inhibitoren oder Pharmaka auf ihre Wirksamkeit hin zu untersuchen. Die

in vitro-Transporteranalyse hat hierbei den Vorteil, dass jede der Komponenten eines Exportkomplexes einzeln, in definierten Mischungsverhältnissen, getestet werden kann.

14.3.1. Expression, Reinigung und Markierung

Die Bildung eines exportkompetenten Komplexes umfasst nicht nur die in Abschnitt [14.2] bereits nachgewiesene Bindung des viralen Rev-Proteins an die RRE-RNA, sondern auch die Erkennung der Rev-NES Sequenz durch das Exportin Crm1 in Anwesenheit von RanGTP. Deshalb wurde Crm1 mit einem C-terminalen sechsfachen Histidin-Tag in *Escherichia coli* Zellen vom Stamm TG1 exprimiert, affinitätschromatographisch gereinigt und mit Alexa568-Maleimid an exponierten Cysteinen markiert. Dadurch kann das Karyopherin Crm1 sowohl einzeln als auch im Komplex mit Cy3-RRE/HH und RevGFP, jeweils in Abhängigkeit von RanGTP, analysiert werden. RanGDP wurde zwar in unserer Gruppe durch *Katja Zerf* hergestellt, das GTP-beladene Ran jedoch vom MPI in Dortmund (Kontakt: *Christine Nowak*) bezogen, da dort sowohl langjährige Expertise mit GDP-GTP Nukleotidaustausch bei Ran-Proteinen, als auch die entsprechende instrumentelle Ausstattung mit einer HPLC zur Qualitätskontrolle vorlag.

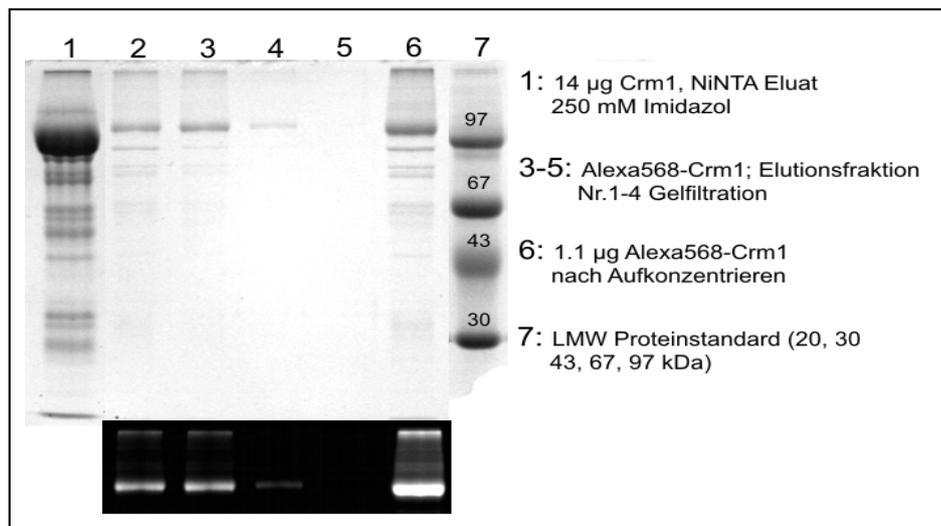


Abb. 14.7.: SDS-PAGE zur Reinheitskontrolle des exprimierten Crm1 und zur Überprüfung der Markierung mit Alexa568-Maleimid; **oben:** Coomassie gefärbtes 12% Trenngel; **unten:** Obiges Gel vor der Färbung unter UV-Licht zur Detektion der Alexa568 Fluoreszenz

Das SDS-Gel in Abbildung [14.7, Bahn 1] zeigt neben der deutlichen Crm1-Bande, die anhand des Proteinstandards einem 105 kDa großen Protein entspricht, mehrere unspezifische Banden von Proteinen mit niedrigerem Molekulargewicht. Trotz mehrmaligen Spülens der Ni-NTA Beads konnten diese Verunreinigungen nicht gut abgetrennt werden. Weitere Reinigungsversuche, sowohl durch eine Gelfiltration mit Sephadex G200

Beads (siehe Abschnitt [9.4]), als auch mittels Ionenaustauscherchromatographie (siehe Abschnitt [9.5]) brachten keine nennenswerte Verbesserung der Probenreinheit und führten letztendlich zu einem inaktiven Crm1-Protein, das in der Transporteranalyse keine Exportkompetenz mehr aufwies. Die Schwierigkeiten bei der Abtrennung der Verunreinigungen könnten darauf hindeuten, dass es sich bei den niedermolekularen Banden um unvollständig exprimierte, verkürzte Crm1-Fragmente handelt. Diese These wird von *M. Fornerod*³⁴ unterstützt, der beobachtete, dass sich bei bakterieller Expression unvollständig exprimierte Crm-1 Fragmente bilden. Obwohl sich damit nicht erklären lässt, warum die kleineren Fragmente sich weder durch eine entsprechende Gelfiltration noch durch Ionenaustauschchromatographie abtrennen ließen. Einzig mögliche Erklärung hierfür wäre, dass sich über unspezifische Interaktionen Komplexe aus dem vollständig exprimierten Crm1-Protein und den kürzeren Fragmenten bilden, die im denaturierenden SDS-Gel wieder getrennt werden. Trotzdem werden dadurch, wie die nachfolgenden Versuche zeigen, weder die spezifischen Bindungen an RevGFP und RanGTP noch an phenylalaninreiche Nukleoporine verhindert, da das Crm1 Protein weiterhin seine Funktion als Exportrezeptor übernehmen kann.

Angesichts der Tatsache, dass die verkürzten Crm1-Fragmente im Vergleich zum vollständig exprimierten Protein deutlich geringer konzentriert und vermutlich nicht mehr funktionsfähig sind, kann das exprimierte Crm1 trotzdem für die *in vitro*-Transportversuche verwendet werden, da eine funktionspezifische Interaktion mit den Bindungspartnern nicht zu erwarten ist. Die Markierung des Crm1-Proteins erfolgte über chemische Kopplung an ein aktiviertes Alexa568-Maleimid unter Bildung einer Thioesterbindung (Umesterung). Eine Kontrolle des ungefärbten SDS-Gels unter UV-Licht, wie in Abbildung [14.7, unten] zu sehen, beweist, dass vorwiegend das vollständig-exprimierte Crm1-Protein aus der Hauptbande mit Alexa568 Fluorophor markiert wurde. Der Markierungsgrad als Verhältnis zwischen Fluorophor- zu Proteinkonzentration liegt bei etwa 2.4 Fluorophoren pro Protein. Ebenfalls gezeigt sind in den Bahnen 2-4 die einzelnen Elutionsfraktionen der Gelfiltration, die zur Abtrennung des ungebundenen Alexa568 Fluorophors nach Methode [8.3] durchgeführt wurde.

14.3.2. Abhängigkeit von Energie liefernden Prozessen

Die Beteiligung des RanGTP-Proteins am Crm1 abhängigen nukleocytoplasmatischen Export wird seit längerem diskutiert.^{4,18,51} Nur ein energieliefernder Prozess, wie die GTP-Hydrolyse kann eine Konformationsänderung des Crm1-Proteins bewirken, in dessen Folge sich die zuvor gebildeten Exportkomplexe auflösen. Dafür benötigt Ran die Interaktion mit RanGAP einem aktivierenden Protein, das die GTP-Hydrolyse am Ran-Protein induziert. RanGAP existiert in der Zelle in zwei Formen, einer, die an Nup358 gebunden ist, sowie einer, die im Cytoplasma gelöst ist. Es stellt sich somit die Frage, ob RanGTP bereits ohne Bildung eines Exportkomplexes, also ohne Substrat, den Crm1-Transportprozess beeinflusst. Denkbar wäre beispielsweise eine beschleunigende Wirkung auf die Abdissoziation des Crm1-Proteins von der terminalen Nup214-Nup88

Bindestelle am NPC. Diese Veränderungen sind mit der hier verwendeten *in vitro*-Transporteranalyse nur detektierbar, wenn sich die molekularen Flussraten um mindestens einen Faktor 2 unterscheiden, wie die GFP-Analyse aus Abschnitt [12.1] ergab. Dazu werden nach [10] sowohl Export-, als auch Importmessungen mit Alexa568 markiertem Crm1 in Anwesenheit von RanGTP und RanGDP durchgeführt und sowohl untereinander, als auch mit den Messungen ohne Ran verglichen.

Bei allen in Abbildung [14.8] dargestellten Transportmessungen bestätigt der grafische Plot der normierten Fluoreszenzintensität eine optimale Dichtigkeit der isolierten Kernmembranen, da die Fluoreszenz des Atto637 markierten MBP-Kontroll-proteins bei 15-20% der Gesamthelligkeit und damit deutlich unter dem Dichtigkeitskriterium von < 30% liegt. Die ebenfalls ermittelten Leckraten (rot dargestellte Werte) sind vernachlässigbar klein gegenüber den gemessenen Transportraten für Crm1, so dass ein nennenswerter Einfluss auf die Kinetik ausgeschlossen werden kann. Bei intakter *Xenopus laevis* Kernmembran und funktionsfähigen NPCs ist Crm1 wegen seines im Vergleich zum inerten MBP-Kontrollprotein deutlich höheren Molekulargewichts von 124.2 kDa nicht in der Lage, die zentrale Pore (Durchmesser: 10 nm) passiv zu durchqueren. Einzig dessen Interaktion mit den FG-Wiederholungssequenzen der Nukleopore im NPC-Kanal ermöglicht eine Diffusion in die membranbedeckten TCs. Somit kann von einem spezifischen Transport von Crm1 ausgegangen werden. Bestärkt wird dies durch die in Abbildung [14.8,A] gezeigte Beobachtung, dass Crm1 nicht nur die Kernporen durchqueren kann, sondern sich in den membranbedeckten TCs sogar anreichert. Besonders deutlich wird die Akkumulation durch Vergleich der Fluoreszenzintensitäten der offenen mit denjenigen der membranbedeckten TCs von Abbildung B. In der membranbedeckten Vertiefung ist die Fluoreszenzintensität zum Ende der Messung bei 1131 s deutlich höher als in den offenen Referenz-TCs, die einen Vergleichswert für die jeweilige Gleichgewichtskonzentration liefern. RanGTP vermag somit das Alexa568-Crm1 über den eigentlichen Gleichgewichtszustand hinaus, entgegen dem Konzentrationsgradienten, bis zum 1.65-fachen der Konzentration in den offenen Referenz-TCs anzureichern. Dagegen erfolgt der Export des Crm1-Proteins ohne Energie lieferndes RanGTP und ohne RanGDP in Abbildung [14.8,C] nicht einmal bis zum vollständigen Konzentrationsausgleich zwischen den membranbedeckten und den offenen Referenz-TCs. Ein vergleichbarer Verlauf wird auch in Abbildung D bei Anwesenheit von RanGDP beobachtet. In beiden Fällen liegt das Transportmaximum bei 80% Fluoreszenzintensität im Vergleich zum Gleichgewichtswert der offenen Referenz-Vertiefungen.

In allen drei Messungen zu beobachten ist der relativ konstante Verlauf der Fluoreszenzintensität in den offenen Referenz-TCs, beispielhaft in Abbildung [14.8,B] für den Transport mit RanGTP dargestellt. Das teilweise plötzliche Absinken der Intensität, welches bei den Messungen in Abbildung A und D zum Ende hin aufgetreten ist, wird auf Artefakte zurückgeführt. Ein Fokusdrift, der bei dem hier verwendeten Mikroskop häufiger auftrat (siehe hierzu Importmessungen), kann ausgeschlossen werden, da die Änderung der Fluoreszenzhelligkeit nur in den offenen TCs, nicht aber in den membranbedeckten TCs oder im Hintergrund, zu sehen war.

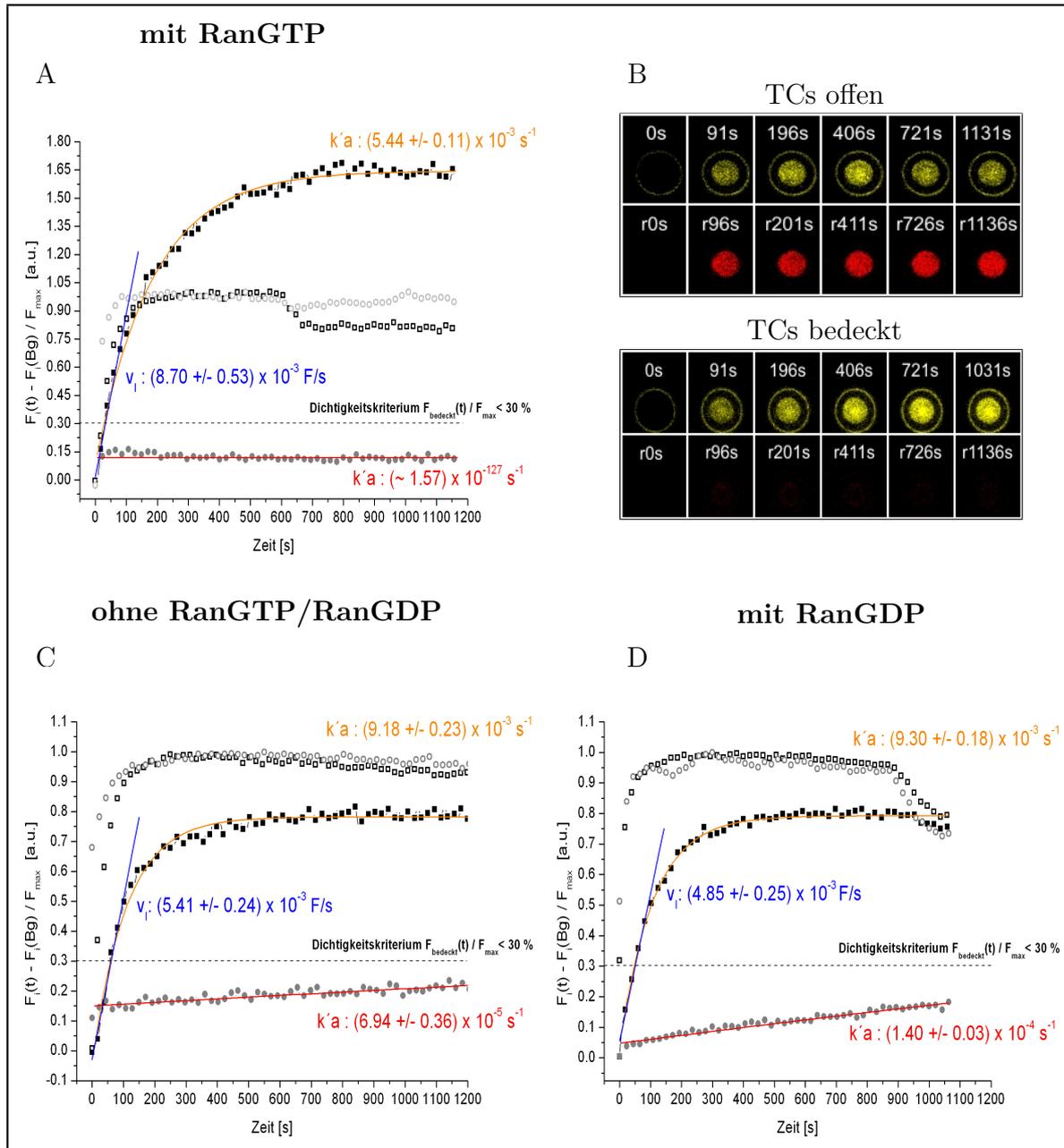


Abb. 14.8.: Einfluss der RanGTPase auf den Crm1 Exportprozess

Grafische Plots zeigen zeitlichen Verlauf der normierten Fluoreszenzintensität und exponentielle Fitkurven (orange & rote Linie); **A & B:** Cytoplasmatische Akkumulation von Alexa568-Crm1 (■, □, orange/gelb) in Anwesenheit von RanGTP, dazugehörige Bildserie; **C:** erleichterte Diffusion von Alexa568-Crm1 ohne RanGTP und ohne RanGDP; **D:** erleichterte Diffusion von Alexa568-Crm1 mit RanGDP; **A-D:** Atto637-MBP (●, ○, rot) Dichtigkeitskontrolle

Gemäß der Theorie eines Zweikompartimentsystems mit semipermeabler Membran, kann der Anstieg der Alexa568-Crm1 Fluoreszenz in den membranversiegelten TCs aller in Abbildung [14.8] gezeigten Messungen mit einer exponentiellen Funktion gut angenähert werden. Die daraus ermittelten apparenten Geschwindigkeitskonstanten für die Rückdiffusion k'_a liegen für die Messung mit RanGTP (A) deutlich höher als für die Messungen mit RanGDP (D) bzw. ohne Ran (C), die beide innerhalb der Fehlergrenzen vergleichbare k-Werte liefern. Demnach verläuft die Rückdiffusion des Crm1 in Anwesenheit von RanGDP mit einer Ratenkonstante von $9.3 \pm 0.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, und bei Anwesenheit von RanGTP deutlich langsamer mit einem k-Wert von $5.4 \pm 0.1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Dieser Transportratenunterschied ist bei der beobachteten Akkumulation zu erwarten, da der Export in die TCs im Vergleich zur Rückdiffusion beschleunigt bzw. bevorzugt wird. Wie Gleichung [3.15] verdeutlicht, wird die Amplitude A der exponentiellen Fitfunktion bestimmt durch das Verhältnis der beiden Geschwindigkeitskonstanten k_a und k'_a für Hin- und Rückreaktion. Folglich muss bei einer Akkumulation das Verhältnis k_a/k'_a , d.h. der Anreicherungsfaktor, größer als Eins sein. Für den Crm1-Export gilt somit ein Verhältnis k_a/k'_a von 1.65.

Als Maß für die Geschwindigkeit der Hinreaktion d.h. des Transportes in die membranbedeckten TCs kann die initiale Geschwindigkeit v_I zu Beginn der Messung herangezogen werden. Sie ist proportional zur Ratenkonstante k_a der Hinreaktion. Die Anfangsgeschwindigkeit wird bestimmt, indem eine Geradengleichung an die ersten zehn Werte einer Exportkurve angenähert wird. Alternativ können auch die molekularen Flussraten verglichen werden, wie in der abschließenden Tabelle [14.1] geschehen, da in deren Berechnung sowohl die Geschwindigkeitskonstante k_a , als auch die Konzentration des Transportrezeptors $[T_R]_0$ zu Beginn der Messung eingehen (siehe Gleichung [3.18]). Für den Crm1 Export in Anwesenheit von RanGTP ergibt sich als Steigung der Gerade und damit als Transportgeschwindigkeit ein Wert von $8.7 \pm 0.5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Diese Exportgeschwindigkeit liegt im Vergleich zu den Messungen ohne Ran, die eine Anfangsgeschwindigkeit von $5.4 \pm 0.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ergaben, um einen Faktor 1.6 höher. Einen vergleichbar niedrigen Wert liefert auch die Messung in Anwesenheit von RanGDP, die ebenso wie die Messungen ohne Ran keine Akkumulation in den membranbedeckten TCs zeigte. Wegen der Proportionalität zwischen der initialen Geschwindigkeit v_I und der Ratenkonstante k_a erlaubt die Anfangsgeschwindigkeit bei gleicher Konzentration an Alexa568-Crm1 eine Aussage über die Exportrate k_a . Diese liegt in Anwesenheit von GTP beladenem Ran (A) deutlich höher als ohne Ran (C) oder mit GDP beladenem Ran (D). Dies bestätigt die oben gemachte Annahme, dass der Export von Crm1 bei Anwesenheit von RanGTP beschleunigt wird, während bei den Messungen ohne Ran oder mit RanGDP die Rückdiffusion gegenüber dem Exportprozess bevorzugt wird. Deshalb liegen ihre Amplitudenwerte auch etwas unter dem Gleichgewichtswert von 1.

Ein sich anschließender Pufferaustausch bewirkt eine Umkehr der Transportrichtung, so dass Crm1 kontinuierlich aus den TCs diffundiert. Dies wird bei allen Importmessungen in Abbildung [14.9] durch die abfallenden Kurven für Alexa568-Crm1, sowie durch die Abnahme der Fluoreszenzintensität im membranbedeckten TC von Abbildung B verdeutlicht. Des Weiteren findet der Import des Crm1-Proteins zurück in den geöffneten Nukleus, d.h. aus den TCs, nicht vollständig statt, da am Ende der Mes-

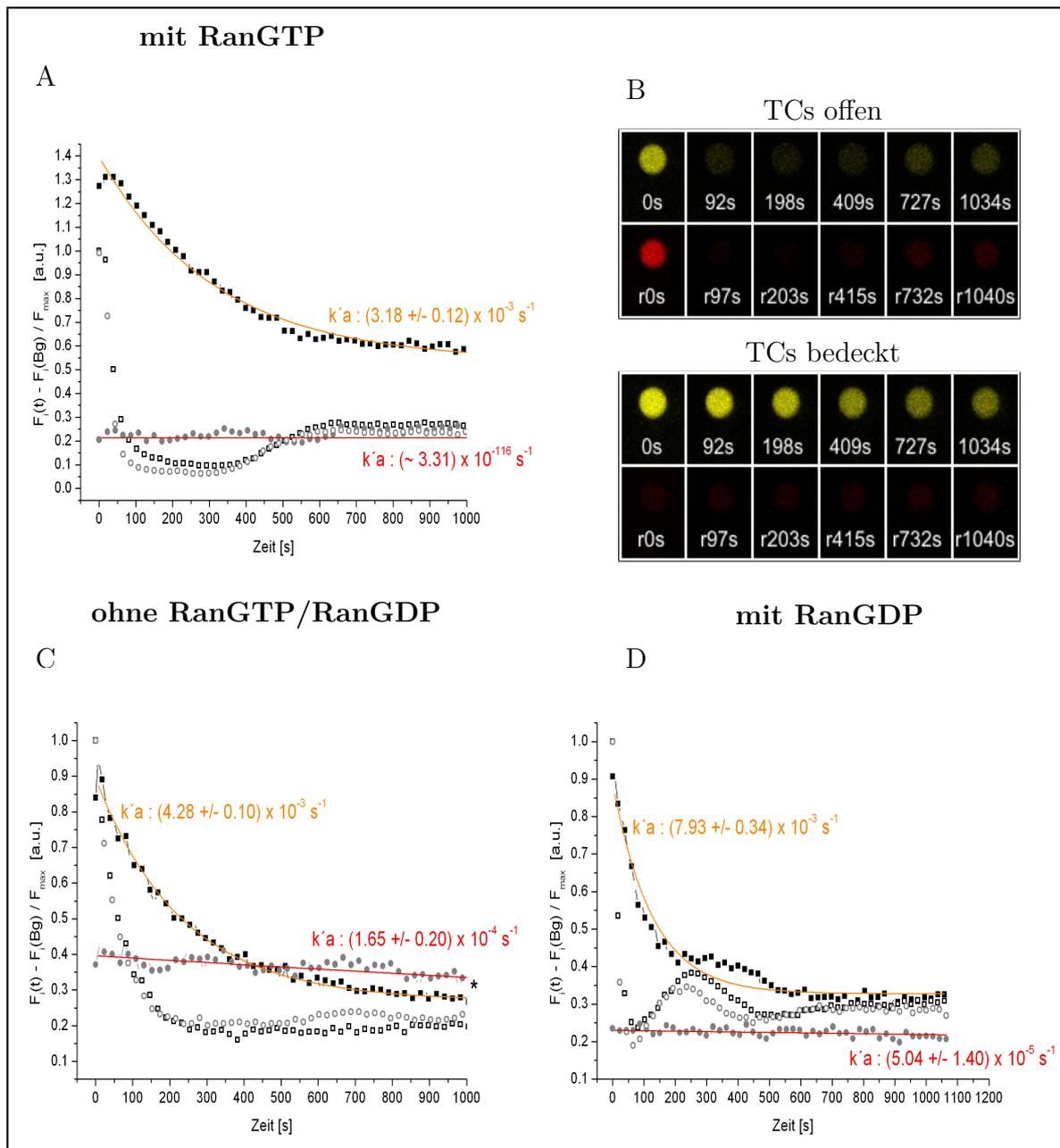


Abb. 14.9.: Einfluss der RanGTPase auf den Crm1 Importprozess

Grafische Plots zeigen zeitlichen Verlauf der normierten Fluoreszenzintensität und exponentielle Fitkurven; textbfA & B: Alexa568-Crm1 (■, □, orange/gelb) Import in Anwesenheit von RanGTP; dazugehörige Bildserie; C: Alexa568-Crm1 Import ohne RanGTP und ohne RanGDP (*: oberhalb des Dichtigkeitskriteriums); D: Alexa568-Crm1 Import mit RanGDP; A-D: Atto637-MBP(●, ○, rot) Dichtigkeitskontrolle

sung die Fluoreszenzintensität noch relativ hoch bei etwa 25 % des Maximalwertes liegt. Im Fall der Importmessung mit RanGTP sind dies sogar 60 % des Maximalwertes. Dies deutet zunächst auf die bereits erwähnte Problematik des Pufferaustausches bei den Importmessungen hin, der in den wenigsten Fällen wirklich vollständig erreicht wird. Der tatsächlich vorliegende Konzentrationsgradient als treibende Kraft für die erleichterte Diffusion durch den NPC ist somit bei der Importmessung nicht bekannt, sollte aber auf jeden Fall niedriger sein als bei den jeweiligen Exportmessungen. Die wellenförmigen Schwankungen der Fluoreszenzintensität bei den offenen Referenz-TCs der Messungen A und C, konnten eindeutig einem Fokusdrift zugeordnet werden, da sie sich auch bei der Hintergrundfluoreszenz (nicht gezeigt) und wie in Abbildung C sogar in abgeschwächter Form in der Crm1-Transportkurve wiederfinden.

Auffällig ist dabei, dass sich nur im Fall der Messung mit RanGTP (A) die Endpunkte der offenen und membranbedeckten Vertiefungen bei 1034 s in ihrer Fluoreszenzintensität unterscheiden, wie besonders anschaulich in Abbildung B gezeigt. Der Endwert in den offenen Referenz-TCs liegt mit 20 % der Anfangsintensität deutlich unter den 60 % für den Crm1-Import. Die offenen Referenz-TCs dienen hierbei als Kontrolle für einen optimalen Pufferaustausch. Demnach ist die geringere Rückdiffusion des Crm1-Proteins aus den TCs nicht auf das bereits genannte unzureichende Herauswaschen der fluoreszierenden Substrate zurückzuführen. Stattdessen kann die Ursache nur in einer verringerten Geschwindigkeit des Imports im Vergleich zum Export liegen. Demnach werden Netto weniger Crm1-Proteine aus den TCs entfernt als durch die erleichterte Diffusion in die TCs nachgeliefert werden. Nur wenn auch die freie Rückdiffusion aus den offenen Referenz-TCs nicht vollständig abläuft, kann der Unterschied des Endwertes bei 1034 s auf einen geringeren Konzentrationsgradienten zurückgeführt werden. Ein solcher Unterschied besteht bei den Messungen ohne Ran (C) oder mit RanGDP (D) nicht. Hier liegen die Endpunkte für die offenen und membranbedeckten TCs annähernd auf gleicher Höhe. Wie in Kapitel [3] erläutert wird für die Import- und Exportprozesse dieselbe Fitfunktion verwendet. Beim Import entspricht die Konstante B dem Endwert, der nach dem Pufferaustausch erreicht wird. Theoretisch sollte dieser Endpunkt bei Null oder wenn beispielsweise die Autofluoreszenz des Materials berücksichtigt wird beim Offset y_0 liegen. Im Experiment zeigt sich jedoch, dass relative Werte um die 0.2-0.6 im Vergleich zur Anfangskonzentration erreicht werden. Vor allem der besonders hohe Wert von 0.6 für die Messung mit RanGTP kann durch einen Offset nicht mehr erklärt werden, so dass in diesem Fall der Endpunkt dem Wert der Konstante B entsprechen muss. Folglich ist dieser abhängig von dem Verhältnis k_a/k'_a und liegt bei der Messung mit RanGTP (A) höher, da hier, wie bereits für den Export gezeigt, die Raten für den Import und Export unterschiedlich groß sind. Im Fall der anderen Messungen d.h. ohne Ran (C) und mit RanGDP (D) ist der Einfluss des Ratenverhältnisses eher geringer einzuschätzen, da dort die Fluoreszenzintensität zum Ende der Messung etwa dem Wert für die offenen Referenz-TCs entspricht. Die Abweichung vom theoretischen Nullpunkt kann hierbei durch den unzureichenden Pufferaustausch erklärt werden.

Wie bei den Exportdaten konnte der Abfall der normierten Fluoreszenzintensität für den Crm1-Import in den Nukleus bei allen drei grafischen Plots gut durch eine entsprechende exponentielle Funktion angenähert werden. Dies war jedoch aufgrund zahlreicher Arte-

Tab. 14.1.: Mittlere Ratenkonstante $\langle k \rangle$ und mittlerer molekularer Fluss $\langle \Phi_{norm} \rangle$ für die erleichterte Diffusion von Alexa568-Crm1 (124.2 kDa) in Abhängigkeit von der Ran-GTPase als Energiesubstrat

<i>Protein</i>	C_{Ch}	$\langle k'_a \rangle$ x 10^{-3} s^{-1}	$\langle \Phi_{norm} \rangle$ bei $\Delta C = 1 \mu M$ $mol \cdot s^{-1} \cdot NPC^{-1}$
Kern → Cytoplasma			
A568-Crm1 – Ran	$1 \mu M$	9.7 ± 1.3 (9)	4.2 ± 0.5
A568-Crm1 + RanGTP		5.5 ± 2.0 (24)	4.8 ± 1.3
A568-Crm1 + RanGDP		11.6 ± 4.8 (31)	4.8 ± 2.5
Cytoplasma → Kern			
A568-Crm1 – Ran	$1 \mu M$	4.6 ± 0.7 (5)	1.7 ± 0.2
A568-Crm1 + RanGTP		3.9 ± 0.9 (3)	1.9 ± 0.3
A568-Crm1 + RanGDP		6.9 ± 4.0 (26)	2.4 ± 1.4

fakte nur bei sehr wenigen Messungen tatsächlich möglich. In Importexperimenten werden über den Fit ebenfalls die apparenten Ratenkonstanten k'_a bestimmt, die in diesem Fall aber der makroskopischen Transportrichtung entsprechen. Trotzdem unterscheiden sich die aus dem Import erhaltenen k'_a -Werte von denjenigen die beim Exportexperiment ermittelt wurden. Dies wird besonders auch in der zusammenfassenden Tabelle [14.1] deutlich, in der die Mittelwerte aus allen Messungen dargestellt sind.

Der in den Einzelmessungen dargelegte Unterschied in der Rückdiffusionsrate k'_a zwischen den Translokationsprozessen in Anwesenheit von RanGTP und ganz ohne Ran wird in Tabelle [14.1] bestätigt. Ebenso liegen die Werte der Crm1-Rückdiffusion mit RanGDP und ohne Ran in einer vergleichbaren Größenordnung, vor allem wenn die relativ großen Fehlerintervalle berücksichtigt werden. Der Unterschied zwischen den Messungen mit RanGTP und mit RanGDP kann nicht als signifikant bezeichnet werden. Jedoch liegt in Abwesenheit von Ran die apparente Ratenkonstante für die Rückdiffusion geringfügig höher als für den RanGTP Prozess. Damit kann die Anreicherung zumindest in diesem Fall ausreichend erklärt werden.

Ein deutlicheres Ergebnis sollte die Berechnung der normierten Molekülflüsse pro NPC liefern. Dabei werden, wie Gleichungen [3.17,3.18] in Abschnitt [3] verdeutlichen, nicht nur die jeweiligen k-Werte sondern auch die jeweiligen Amplituden der exponentiellen Fitfunktion berücksichtigt. Die mittlere Anzahl an Crm1-Molekülen, die bei einer Konzentrationsdifferenz von $1 \mu M$ durch den NPC fließen, lässt sich bei allen drei Messungen kaum unterscheiden. Deren Werte liegen egal ob mit oder ohne RanGTP durchschnittlich bei etwa 4 Molekülen pro NPC pro Sekunde. RanGTP scheint somit die initiale Flussrate nicht zu beeinflussen, sondern lediglich das Fließgleichgewicht in Richtung Export zu verschieben. Gegen das Argument spricht, dass die molekularen Flüsse für den Import von Crm1 sowohl bei An- als auch bei Abwesenheit von RanGTP etwa gleich

groß sind und im Bereich von 2 Molekülen liegen. Im Fall einer Akkumulation wie bei der RanGTP Messung wäre ein Verhältnis zwischen Export- und Importfluss von größer 1 zu erwarten. Dies wird durch die Flusswerte für Export und Import in Tabelle [14.1] bestätigt, da diese ein Verhältnis von 2.5 liefern. Im Gegensatz dazu sollte dasselbe Flussverhältnis für die Messungen mit RanGDP oder ohne Ran in der Nähe von 1 liegen, da in diesem Fall keine der Richtungen bevorzugt wird und keine Anreicherung stattfindet. Die Werte liegen allerdings in einer ähnlichen Größenordnung wie bei RanGTP. Im Fall von RanGDP beträgt das Verhältnis 2 und ohne Ran ebenfalls 2.5. Eine Anreicherung lässt sich so nicht schlüssig erklären, obwohl sich diese in 24 unabhängigen Exportmessungen mit Alexa568-Crm1 und RanGTP beobachten ließ. Eine mögliche Erklärung liegt in den angesprochenen Schwierigkeiten bei der Durchführung der Importmessungen, wie ein unzureichendes Spülen, sowie zahlreiche Messartefakte, die bei einigen Messungen zu geringeren Importraten geführt haben könnten. Dies würde auch den angesprochenen Unterschied zwischen den k'_a -Werten aus den Import- und den Exportmessungen erklären.

Zusammenfassend lässt sich feststellen: Crm1, welches strukturelle Charakteristika eines Transportrezeptors, wie FG- und NES-Bindedomäne, aufweist, vermag ebenso wie das vorab getestete Arx1 entlang eines Konzentrationsgradienten durch den NPC zu diffundieren. Dies gilt auch für das im Rahmen dieser Arbeit rekombinant hergestellte und markierte Alexa568-Crm1. Bis auf die beobachtete Akkumulation konnte ein Effekt des energiereichen Cofaktors RanGTP mit der hier verwendeten Methode nicht festgestellt werden, obwohl dessen GTP-Hydrolyse unter Anderem auch ein Abdissoziieren von den FG-Nukleoporinen initiieren sollte. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Crm1, wie alle Transportrezeptoren, keine der beiden Translokationsrichtungen ausschließlich bevorzugt, sondern in beide Richtungen diffundieren kann, wenn auch mit unterschiedlichen Geschwindigkeiten.

14.4. Analyse des Exports und Imports viraler RRE/HH-RNA

Der zelluläre Crm1-Transportweg wird von dem humanen Retrovirus HIV-1 für den Export seiner ungespleißten, bzw. teilweise gespleißten RNA-Transkripte benutzt. Dieser Schritt ist für die erfolgreiche Replikation des Virus unbedingt erforderlich, da diese RNA-Transkripte für wichtige Struktur- und Hüllproteine kodieren, die für den Zusammenbau eines funktionsfähigen Viruspartikels notwendig sind. Deshalb stellt das HIV-1 Virus das Rev-Protein, einen eigenen Adapter, zur Verfügung, der seine ungespleißten Transkripte durch Bindung an das Rev-Responsive-Element vor der RNA-Exportkontrolle der Wirtszelle schützen soll. Gleichzeitig verfügt Rev über eine leucinreiche NES-Sequenz, die den zellulären Transportrezeptor Crm1 rekrutiert. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob das Minimalsystem aus RevGFP, RRE-RNA und dem im vorherigen Kapitel charakterisierten zelleigenen Transportrezeptor Crm1 wirklich ausreicht, um die RRE-RNA aus dem Zellkern zu transportieren oder ob noch weitere Cofaktoren benötigt werden. Zudem sollte gerade bei beladenen Transportinen

die induzierte GTP-Hydrolyse an der terminalen NPC-Bindestelle eine wichtige Funktion übernehmen, da, wie bereits angedeutet, der Exportkomplex nach GTP-Hydrolyse und Konformationsänderung des Crm1 Proteins auseinanderfällt. Im diesem Kapitel wird mit Hilfe der bekannten *in vitro*-Transporteranalyse, das minimale Exportsystem für die virale RRE-RNA gesucht, sowie der Einfluss des GTP beladenen Ran Proteins auf den Transportprozess analysiert.

14.4.1. Abhängigkeit von Energie liefernden Prozessen

In Anlehnung an die vorherigen Exportmessungen werden zum Test des viralen RRE-RNA Systems ebenfalls 10 μ l Transportlösung mit allen notwendigen Komponenten in das 30 μ l Reservoir der Messkammer getropft. Hierfür wird die Transportlösung direkt vor der Messung mit RNase freiem Mock3 Puffer angesetzt, um eine Degradation der RRE-RNA durch RNase zu verhindern, und nach einer Inkubationszeit von etwa 5 min vorsichtig zugegeben. Das Cy3 markierte RRE/HH-Fragment mit der hochaffinen Rev-Bindestelle imitiert die ungespleißten viralen RNA-Substrate, die dieses Element ebenfalls als Erkennung für das HIV-1 Adapterprotein Rev enthalten. Rev wird bei allen Experimenten in Form eines GFP Fusionsproteins verwendet, während Crm1 in unmarkierter Form eingesetzt wird. Als Kontrollprotein dient Atto637-MBP, welches sich nach Abschnitt [12.2] besonders gut zur Überprüfung der Membranintegrität und optimalen Membrananheftung eignet. Selbst bei einer seriellen Aufnahme der Fluoreszenzbilder muss darauf geachtet werden, dass die Fluorophore, wenn sich die Anregungsspektren geringfügig überlagern, im Detektionskanal gut voneinander getrennt werden. Je mehr markierte Spezies für die Transportmessung verwendet werden, desto schwieriger wird eine solche Trennung. Dieser sogenannte „Crosstalk“ wurde vorab in einer Einzelmessung bei gleichen Mikrokopeinstellungen, aber mit nur einer fluoreszenzmarkierten Spezies, überprüft und konnte für den hier gezeigten viralen Transportassay ausgeschlossen werden. In dieser Arbeit gelangen somit zum ersten Mal OSTR-Transportversuche mit drei markierten Substraten. Die Transportmessungen mit viralem RRE/HH-Substrat und Rev erfolgen ebenso wie die vorherigen Crm1-Messungen jeweils in An- oder Abwesenheit von RanGTP bzw. RanGDP.

Die Ausschnitte der Fluoreszenzbilder in Abbildung [14.10,B] zeigen, dass in den offenen Referenz-TCs bereits nach 143 s die Maximalintensität für RevGFP (grün), Cy3-RRE/HH (gelb) und Atto637-MBP (rot) erreicht wird. Diese bleibt bis kurz vor Ende der Messung relativ konstant und nimmt dann etwas ab, wie ein Vergleich der Intensitäten bei 834 s und 1035 s verdeutlicht. Im Gegensatz dazu ist in den membranbedeckten TCs nach 143 s für alle drei markierten Spezies kaum Fluoreszenz zu erkennen. Die Dichtigkeitskontrolle Atto637-MBP (rot) bleibt konstant bei einer sehr niedrigen Fluoreszenz, während RevGFP und Cy3-RRE/HH zusammen deutlich ansteigen. Sie erreichen zum Ende der Messung bei 1035 s sogar eine Fluoreszenzhelligkeit, die diejenige in den offenen Referenz-TCs mehrfach übersteigt. RevGFP wird somit zusammen mit seinem RRE/HH-Substrat in den membranbedeckten TCs angereichert.

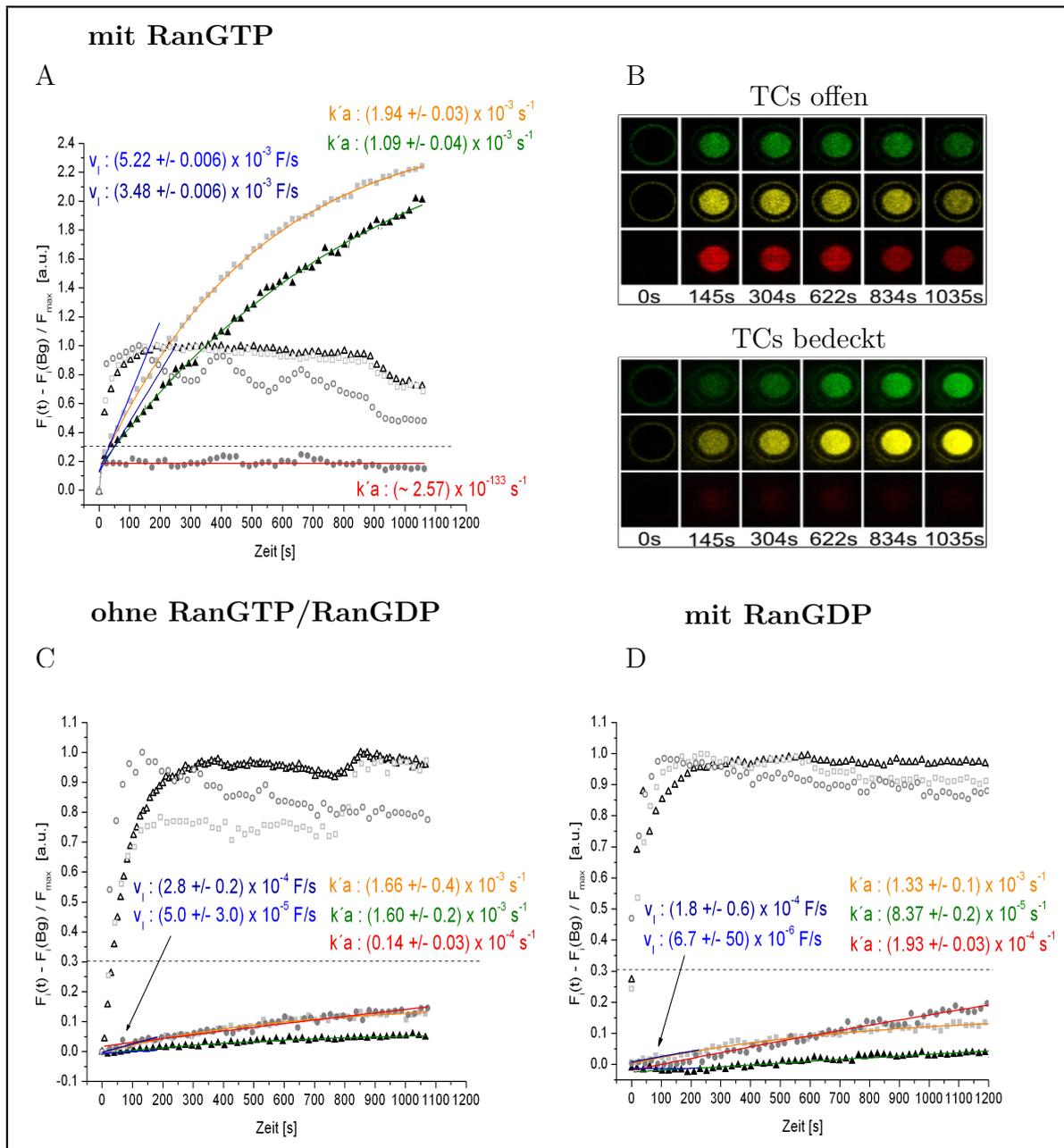


Abb. 14.10.: Einfluss der RanGTPase auf den RRE-RNA Exportprozess

Grafische Plots mit zeitlichem Verlauf der auf die Referenz-TCs normierten Fluoreszenzintensität; offene TCs mit offenen Symbolen und membranbedeckte TCs mit geschlossenen Symbolen dargestellt; **A:** Cy3-RRE (■, □, orange/gelb), RevGFP (▲, △, grün) und Crm1 mit RanGTP; **B:** Verlauf von A, gezeigt an einem membranbedeckten Beispiel-TC und einem Referenz-TC; **C:** Cy3-RRE, RevGFP und Crm1 ohne RanGTP und RanGDP; **D:** Cy3-RRE, RevGFP mit Crm1 und RanGDP; **A-D:** Atto637-MBP(●, ○, rot) Dichtigkeitskontrolle

Der graphische Plot in Abbildung [14.10,A] bestätigt diesen ersten Eindruck. Die Fluoreszenzintensität von RevGFP und Cy3-RRE steigt bei hoher Membrandichtigkeit bis auf etwa das 2.0-fache des Wertes in den offenen Referenz-TCs. Das bedeutet, dass die Exportrate k_a um einen Faktor 2 größer ist als die Rückdiffusion k'_a , da das Verhältnis der Hin- und Rückreaktionsraten dem Anreicherungsfaktor entspricht. Ebenso wie die Crm1-Kurven lassen sich auch die Exportkurven von RevGFP und RRE/HH sehr gut mit einer monoexponentiellen Funktion annähern. Die apparente Ratenkonstante k'_a für die Translokation von RevGFP und Cy3RR/HH liegt für die Messungen mit RanGTP (A) und ohne Ran (C) in einem ähnlichen Größenordnungsbereich. Dagegen weicht die Messung mit RanGDP (D) etwas davon ab. Allerdings sollte dabei bedacht werden, dass bei beiden Messungen, ohne Ran (C) und mit RanGDP (D), kaum von einer Translokation durch den Kern gesprochen werden kann. Folglich können sie durch eine monoexponentielle Funktion nur ungenau angenähert werden. Wie Abbildungen [14.10,D] klar verdeutlicht, reicht bei Ran bereits der Austausch des GTP-Nukleotids gegen ein GDP-Nukleotid aus, um einen Export von RevGFP und RRE/HH zu unterbinden. Erwartungsgemäß kann auch bei Abwesenheit von Ran kein Export mehr beobachtet werden. Diese Exportinhibierung ist sogar so effektiv, dass in beiden Fällen C und D die Kurven für RevGFP und Cy3-RRE/HH bei einer ähnlich niedrigen Intensität liegen, wie die Dichtigkeitskontrolle Atto637-MBP. Sie erreichen maximal einen Wert von 20 % relativ zur Intensität in den offenen Referenz-TCs und liegen damit sogar unterhalb des selbst gesetzten Dichtigkeitskriteriums von 30 % (gestrichelte Linie). Besonders auffällig im Fall der Akkumulation in Abbildung A ist sicher die Abweichung der Rate für RevGFP von derjenige für RRE/HH, obwohl beide theoretisch als Exportkomplex assoziiert an Crm1 durch den NPC wandern sollten. Der Exportkomplex wird vermutlich bereits in der Nähe des NPCs an den cytoplasmatischen Filamenten durch dort assoziiertes RanGAP, welches die GTP-Hydrolyse katalysiert, aufgelöst. RevGFP und Cy3-RRE/HH liegen im TC demnach getrennt voneinander vor. Der Ratenunterschied könnte also theoretisch für eine unterschiedliche intra-TC Diffusion der beiden Spezies sprechen, da aufgrund des Größenunterschieds zwischen dem 20.8 kDa großen Cy3-RRE/HH und dem 40.9 kDa großen RevGFP unterschiedliche Diffusionszeiten erwartet werden. Einige Vorarbeiten zur OSTR-Methode durch *Kiskin N.I.*⁵⁸ konnten jedoch nachweisen, dass die Diffusion zur konfokalen Beobachtungsebene 20 μm unterhalb der Membranoberfläche keinen wesentlichen Einfluss auf die Ratenkonstanten hat, sofern es sich um ausreichend langsame Prozesse mit einem molekularen Fluss kleiner 5 Moleküle pro NPC pro Sekunde handelt. Dies trifft auf die hier gezeigten Translokationsprozesse zu, wie die nachfolgende Tabelle [14.2] beweist.

Die apparenten Geschwindigkeitskonstanten k'_a aus dem Fit beschreiben jedoch nur die Geschwindigkeit der Rückdiffusion und stehen nur indirekt in Form des Anreicherungsfaktors k_a/k'_a mit der Rate k_a der Hinreaktion in Verbindung. Experimentell ergibt sich aus der Ableitung der Transportfunktion [3.10] für den Wert t gegen Null das Produkt aus der Ratenkonstante der Hinreaktion k_a und der Konzentration im Reservoir $[T_R]$ nach der Zugabe. Auch hier bietet es sich zum Vergleich an, die initiale Geschwindigkeit v_I zum Beginn der Messung grafisch zu ermitteln. Deshalb wird, wie bei den Crm1 Experimenten, eine Gerade an die ersten zehn Messpunkte der Transportkurve von RevGFP

und Cy3-RRE/HH angenähert, deren Steigung die Anfangsgeschwindigkeit angibt. Im Vergleich zu den Ratenkonstanten liefert die Anfangsgeschwindigkeit ein völlig anderes Ergebnis, bei dem deutliche Unterschiede zwischen den Messungen mit RanGTP (A) und ohne Ran (C) bzw. mit RanGDP (D) zu beobachten sind. Die Anfangsgeschwindigkeit in Anwesenheit von RanGTP (A) liegt im Vergleich zur Messung ohne Ran (C) für RevGFP um etwa einen Faktor 100 und für RRE/HH um einen Faktor 12 höher. Ein ähnliches Bild wird beim Vergleich mit der RanGDP-Messung erhalten. Entsprechend der Proportionalität zwischen initialer Geschwindigkeit und Ratenkonstante der Hinreaktion k_a bedeutet dieses Ergebnis, dass die Hinreaktion in Anwesenheit von RanGTP für beide Spezies deutlich beschleunigt wird. Dagegen kann die Rate für den Transport in die TCs bei den anderen beiden Messungen C und D als vernachlässigbar betrachtet werden. Die in Abbildung [14.10] dargestellten Ergebnisse beweisen, dass ohne RanGTP kein Exportkomplex aus Crm1, RevGFP und RRE/HH gebildet wird. Nur wenn ein solcher Exportkomplex durch Bindung des Crm1-Proteins an die NES-Sequenz des Rev-Proteins entsteht, kann auch die RRE-RNA zusammen mit dem Rev-Adapter exportiert werden. Bei Anwesenheit eines Substrats ist der Crm1-Export eindeutig RanGTP abhängig, wie bereits bei *M. Fornerod*³⁴ durch Crosslinking-Experimente mit Crm1 bestätigt wurde. Ohne einen Transportrezeptor wie Crm1 mit seiner FG-Binderegion können RevGFP und RRE/HH nicht mit dem NPC wechselwirken. Theoretisch wäre es für die 20.8 kDa große RRE/HH möglich, passiv, ohne Wechselwirkung mit den FG-Nukleoporinen, durch die schmale inneren NPC-Pore zu diffundieren. Nachdem dies in beiden Fällen, sowohl ohne Ran (C) als auch mit RanGDP (D) nicht beobachtet wird, kann davon ausgegangen werden, dass das Rev-Protein bereits an RRE/HH gebunden hat. Dies entspricht aufgrund der hohen Affinität zwischen Rev und RRE/HH Fragment ($K_D = 10^{-11}$ M)⁹⁴ und aufgrund des positiven Bindungsassay (siehe [14.5]) den Erwartungen.

Ein Vergleich mit den Crm1-Exportmessungen, die auch eine Akkumulation zeigten, ist in diesem Fall nicht möglich, da das unmarkierte Crm1 nur indirekt durch die Bindungspartner Rev und RRE/HH detektiert wird. Die fehlende Crm1-Markierung lag vornehmlich daran, dass ein geeigneter Fluorophor, welcher im Anregungsspektrum gut von den anderen drei Fluorophoren GFP, Cy3 und Atto637 getrennt werden kann, nicht gefunden werden konnte. Wie vorher bereits erläutert, wird damit gerechnet, dass Crm1 auch in den Messungen ohne Ran und mit RanGDP von Abbildung [14.10, C und D] durch den NPC diffundiert. Als Ergänzung wären folglich Messungen mit unmarkierter RRE/HH-RNA und Alexa568 markiertem Crm1 sehr interessant, da sie die Theorie der Bildung eines Exportkomplexes in Anwesenheit von RanGTP unterstützen würden.

Direkt im Anschluss an die Exportmessung wird der Importprozess zurück in den geöffneten Nukleus gestartet, indem durch Spülen mit 35 μ l Mock3 Puffer versucht wird, den Transportpuffer über der Membran auszutauschen. Dadurch wird eine Richtungs-umkehr des Konzentrationsgradienten erreicht. Trotz der oft genannten Schwierigkeiten bei der Durchführung der Importmessungen liefern die in Abbildung [14.11] gezeigten Daten einen weiteren Beweis dafür, wie wichtig für den Transportprozess die Bildung eines funktionsfähigen Exportkomplexes ist. Der Pufferaustausch bewirkt in Anwesenheit von RanGTP (A) eine völlige Inhibierung des Importprozesses, also der Rückreaktion,

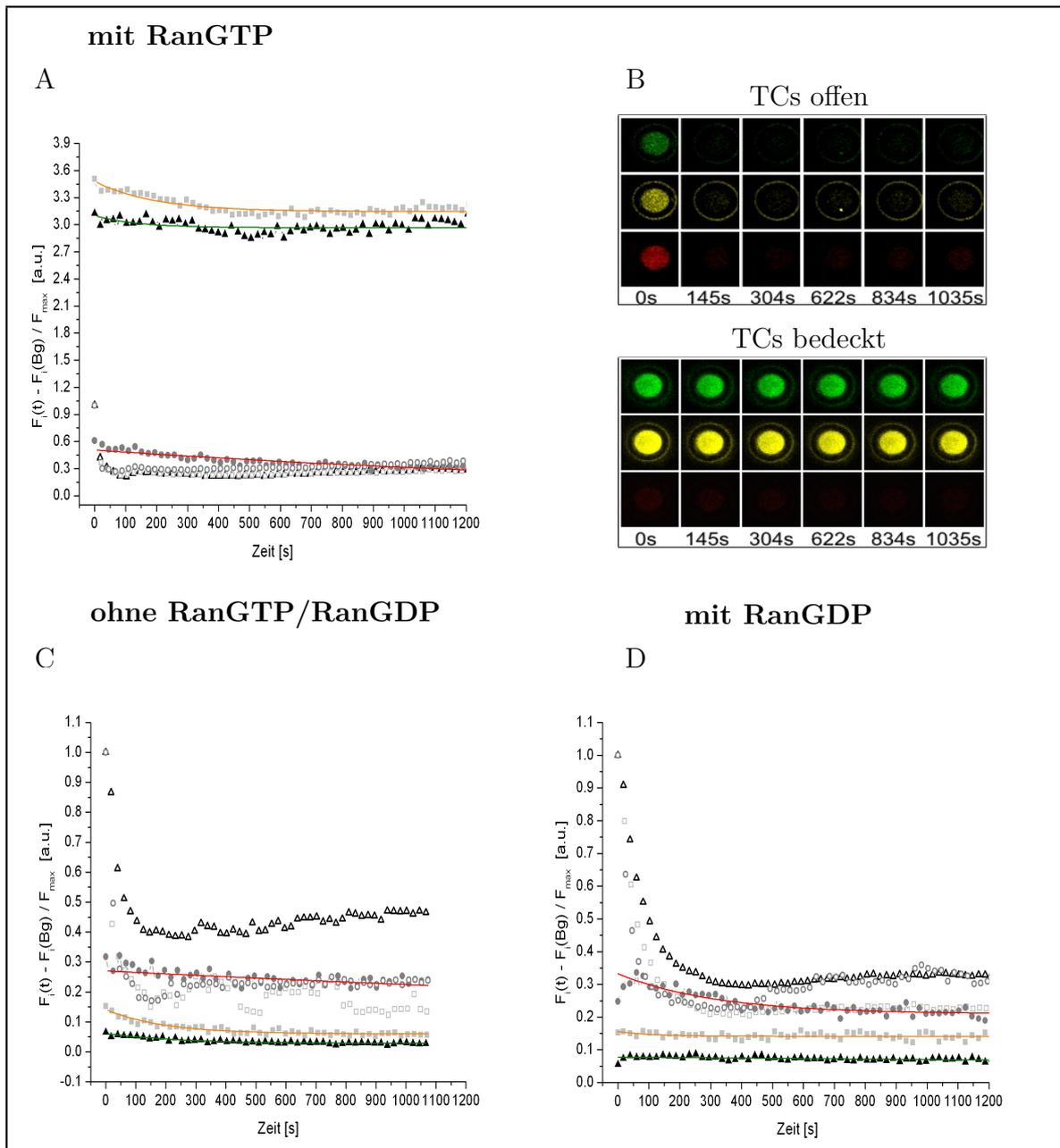


Abb. 14.11.: Einfluss der RanGTPase auf den RRE-RNA Importprozess

Grafische Plots mit zeitlichem Verlauf der auf die Referenz-TCs normierten Fluoreszenzintensität; offene TCs mit offenen Symbolen und membranbedeckte TCs mit geschlossenen Symbolen dargestellt; **A:** Cy3-RRE (■, □, orange/gelb), RevGFP (▲, △, grün) und Crm1 mit RanGTP; **B:** Verlauf von A, gezeigt an einem Beispiel-TC; **C:** Cy3-RRE, RevGFP und Crm1 ohne RanGTP; **D:** Cy3-RRE, RevGFP mit Crm1 und RanGDP; **A-D:** Atto637-MBP(●, ○, rot) Dichtigkeitskontrolle

so dass sowohl RevGFP als auch die Cy3-RRE/HH nicht mehr aus den membranbedeckten TCs diffundieren können. Die Fluoreszenzintensität von Cy3-RRE/HH und RevGFP in Abbildung [14.11,B], sowie die damit korrelierte Konzentration dieser beiden Crm1-Bindungspartner, bleibt vom Beginn der Messung bei 0 s bis zum Ende bei 1035 s auf einem vergleichbar hohen, konstanten Niveau. Diese Beobachtung wird durch den grafischen Plot von Abbildung A gestützt, da sich die Anreicherung von RevGFP und Cy3-RRE/HH in den membranbedeckten Vertiefungen über die gesamte Messzeit nicht verändert. Im Gegensatz dazu nimmt die Fluoreszenz in den offenen Referenz-TCs nach der induzierten Umkehr der Transportrichtung rapide schnell ab, so dass bereits bei 145 s kaum noch Fluoreszenz detektiert wird. Dabei unterstreicht die konstant niedrige Fluoreszenz der Dichtigkeitskontrolle Atto637-MBP die immer noch vorhandene gute Membrandichtigkeit.

Eine Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten wird bei den Importmessungen auch angesichts der bereits angesprochenen Schwierigkeiten nicht durchgeführt, da nur an sehr wenige Kurven eine monoexponentielle Funktion angenähert werden konnte. Denn die hohe Variabilität bei den Kurvenverläufen - d.h. ansteigend, parallel oder leicht abfallend - macht eine Vergleichbarkeit der erhaltenen Ratenkonstanten unmöglich. Jedoch zeigten alle mit RanGTP durchgeführten Transportmessungen übereinstimmend eine Inhibierung der Rückdiffusion der beiden Substrate RRE und Rev. Die durch den Exportvorgang erreichte Anreicherung beider Substrate in den membranbedeckten TCs blieb dabei in Anwesenheit von RanGTP während den gesamten 40 min Messzeit erhalten.

Ohne Ran (C) oder bei Zugabe von RanGDP (D) verlaufen die Transportkurven für RRE/HH und Rev (Abbildung 14.11) bei sehr niedrigen Fluoreszenzintensitäten unterhalb von 20 % der Maximalintensität der offenen Referenz-TCs. Die Konzentration von Cy3-RRE/HH und RevGFP in den bedeckten TCs liegt dabei deutlich unter derjenigen für das Kontrollprotein Atto637-MBP und somit auch unterhalb des Dichtigkeitskriteriums. Bereits der Exportprozess führte zu keinem nennenswerten Einstrom in die membranbedeckten Vertiefungen, so dass auch die Umkehr der Transportrichtung, keinen signifikanten Ausstrom von Cy3-RRE/HH bzw. von RevGFP aus den membranbedeckten TCs bewirkt.

Die Zusammenfassung der gemittelten Ergebnisse in Tabelle [14.2] veranschaulicht nochmals den Einfluss des energiereichen GTP-beladenen Ran Proteins auf den Export der viralen RRE-RNA. Betrachten wir zunächst einmal die apparente gemittelte Ratenkonstante $\langle k'_a \rangle$ der Rückdiffusion für die RRE/HH-RNA. Deren Wert liegt für die Messung ohne Ran mit $3.1 \pm 1.7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ deutlich höher als für die Messung in Anwesenheit von RanGTP mit einer Rate von nur $1.9 \pm 0.8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Die Messung mit RanGDP ergibt ebenfalls eine höhere Rate für die Rückdiffusion aus den TCs als mit RanGTP. Jedoch stellt sich die Frage, ob ein solcher Unterschied wirklich als signifikant angesehen werden kann. Denn auf der Grundlage der zur Validierung der Transporteranalyse eingesetzten GFP-Textmessungen in Abschnitt [12.1] muss ein Ratenunterschied von mindestens einem Faktor 2 vorliegen, um angesichts des großen Fehlerintervalls von einem signifikanten Unterschied zu sprechen. Obwohl die Werte unter Vorbehalt zu betrachten sind,

Tab. 14.2.: Abhängigkeit des RRE- und Rev-Export von der Ran-GTPase, Zusammenfassung aller Ergebnisse, Anzahl der ausgewerteten Messungen in Klammern angegeben

<i>Substrat</i>	C_{Ch} bei $t = 0$ μM	$\langle k'_a \rangle$ $\times 10^{-3}$ s^{-1}	$\langle \Phi_{norm} \rangle$ bei $\Delta C = 1 \mu M$ $mol \cdot s^{-1} \cdot NPC^{-1}$
Kern \rightarrow Cytoplasma			
Cy3-RRE, – TM , – Ran ^a	$0.7 \mu M$	1.0 ± 1.1 (35)	0.34 ± 0.21
Cy3-RRE, TM ^{a+} RanGTP		1.9 ± 0.8 (23)	2.7 ± 1.1
Cy3-RRE, TM ^{a–} Ran		3.1 ± 1.7 (13)	0.29 ± 0.21
Cy3-RRE, TM ^{a+} RanGDP		2.5 ± 0.7 (8)	0.24 ± 0.03
RevGFP, TM ^{b+} RanGTP	$1.6 \mu M$	1.0 ± 0.6 (23)	1.6 ± 0.7
RevGFP, TM ^{b–} Ran		2.9 ± 3.7 (13)	0.16 ± 0.28
RevGFP, TM ^{b+} RanGDP		0.25 ± 0.43 (8)	0.04 ± 0.02

^a TM = Transportmix mit RevGFP-StrepTag, Crm1

^b TM = Transportmix mit Cy3-RRE, Crm1

erklären sie dennoch die beobachtete Akkumulation in den membranbedeckten TCs. Denn die verringerte Rückdiffusion bei den RanGTP-Messungen geht einher mit einem bevorzugten Export in die TCs. Dies bedingt schließlich eine Verschiebung des Gleichgewichts in Richtung des Exportprozesses und liefert die beobachtete 2- bis 2.4-fache Anreicherung von RevGFP und RRE/HH. Die in Abbildung [14.10] ermittelte hohe Anfangsgeschwindigkeit unterstützt diese Vorstellung, da deren Wert proportional zur Transportrate der Hinreaktion k_a ist. Demnach bedingt eine hohe initiale Geschwindigkeit einen hohen k_a Wert, der im Vergleich zu den niedrigen k'_a -Raten, letztendlich zu einem beschleunigten Exportprozess und einer Anreicherung führt. Die RevGFP Daten aus Tabelle [14.2] stützen diese Argumentation, da auch dort die Ratenkonstante der Hinreaktion für die Messung ohne Ran deutlich höher liegt als für RevGFP mit RanGTP. In dieses Bild fügt sich der Wert aus der RanGDP-Messung nicht ein. Denn dieser liegt trotz des hohen Fehlers noch unterhalb der Rate für den Translokationsprozess in Anwesenheit von RanGTP. Dieser Unterschied relativiert sich allerdings, wenn die normierten molekularen Flüsse Φ_{norm} betrachtet werden.

Anhand der molekularen Flussraten in der letzten Spalte von Tabelle [14.2] wird deutlich, dass nur in Anwesenheit von RanGTP, eine nennenswerte Anzahl an markierten Substraten in die membranbedeckten Vertiefungen fließt. Der vorher angedeutete Unterschied bei der initialen Geschwindigkeit zwischen RevGFP und Cy3-RRE/HH in Abbildung [14.10] wird durch die gemittelten Flusswerte nicht mehr bestätigt. Der mittlere, normierte Molekülfluss von 2.7 ± 1.1 Molekülen pro NPC pro Sekunde für das Cy3-RRE/HH-Fragment liegt in einer vergleichbaren Größenordnung wie der mittlere, normierte Fluss für das RevGFP Protein mit 1.6 ± 0.7 Molekülen pro NPC pro Sekunde. Demnach ist davon auszugehen, dass Cy3-RRE/HH im Komplex mit RevGFP unter Mitwirkung des Crm1-Transportrezeptors durch den NPC transportiert wird. Bereits

das nur mit GDP beladene Ran-Protein inhibiert den molekularen Fluss von RevGFP und Cy3-RRE/HH merklich, um einen Faktor 50, respektive 6. Dieser deutliche Unterschied kann trotz der hohen Variation innerhalb der Methode zuverlässig aufgelöst werden. Folglich ist der Einfluss von RanGTP auf den Export der viralen RRE-RNA, hier in Form des HH-Fragments gemessen, eindeutig nachweisbar. Der Theorie nach bindet Crm1 zunächst RanGTP, das eine Konformationsänderung induziert, welche in kooperativer Weise die Interaktion mit NES-Substraten wie RevGFP begünstigt. Dadurch wird auch die RRE-RNA transportiert, da RevGFP selbst, wie in Abschnitt [14.2] gezeigt, mit der hochaffinen Struktur der RRE-RNA, dem HH-Fragment, interagiert. Cy3-RRE/HH alleine (siehe Abbildung [14.12] im folgenden Abschnitt) diffundiert ähnlich langsam in die membranbedeckten TCs wie die vollständigen Transportmischungen mit RevGFP, Crm1 aber ohne Ran. Dies könnte trotz der vorher gezeigten Bindungsassays ein Hinweis darauf sein, dass bei Abwesenheit von Ran die Cy3-RRE/HH Moleküle nicht an Rev gebunden sind und sich deshalb langsam durch den zentralen NPC-Kanal hindurchwinden. Der Komplex aus RRE/HH und RevGFP würde bei einem Molekulargewicht von 61.7 kDa aufgrund seiner Größe von der 10 nm breiten zentralen NPC-Pore ausgeschlossen werden.

14.4.2. Nachweis der Spezifität

Nach den bisherigen Ergebnissen lässt sich RanGTP eindeutig als wesentlicher Cofaktor für den viralen RRE-Export feststellen. Jetzt bleibt noch zu zeigen, dass auch alle anderen Komponenten des Transportkomplexes aus Rev, RRE/HH, Crm1 und RanGTP unbedingt für den Export benötigt werden. Dies wäre gleichzeitig auch ein Beweis für die Spezifität dieses Transports und für die Spezifität der jeweiligen beteiligten Interaktionen, wozu die Interaktion zwischen Rev-Protein und RRE/HH-Fragment in einer 1:1 Stöchiometrie, sowie zwischen NES-Domäne des Rev-Proteins und Crm1-Exportin zählen.

Bei allen in Abbildung [14.12] gezeigten Messungen wird deutlich, dass kein Transport mehr stattfindet, sobald eine der Komponenten des Exportkomplexes entfernt wird. Der sehr geringe passive Einstrom des RevGFPs liegt im Bereich der Dichtigkeitskontrolle Atto637-MBP und kann somit auf kleinere Membranundichtigkeiten zurückgeführt werden. Erwartungsgemäß verlaufen alle gezeigten Kurven (B-D) für das kleinere Cy3-RRE-Fragment oberhalb der Atto637-MBP-Dichtigkeitskontrolle. Damit ähneln sie allerdings den Kurven für die passive Diffusion des reinen Cy3-RRE/HH-Fragments von Abbildung A, das geringfügig in die membranbedeckten TCs einströmt. Ein nennenswerten Transport kann jedoch ausgeschlossen werden, da zum Ende der Messung die relative Cy3-RRE/HH-Fluoreszenz im Vergleich zu den offenen Referenz-TCs meist unterhalb des Dichtigkeitskriteriums von 30 % liegt. Dies gilt auch für RevGFP. Einzige Ausnahme bildet die Messung ohne RevGFP, bei der sich die Cy3-RRE/HH-Kurve knapp über der 30 %-Marke befindet.

Die Analyse des NPC-Transports ohne RRE/HH-Fragment beweist, dass das RevGFP-Fusionsprotein alleine nicht in der Lage ist, den NPC über eine Interaktion mit dem

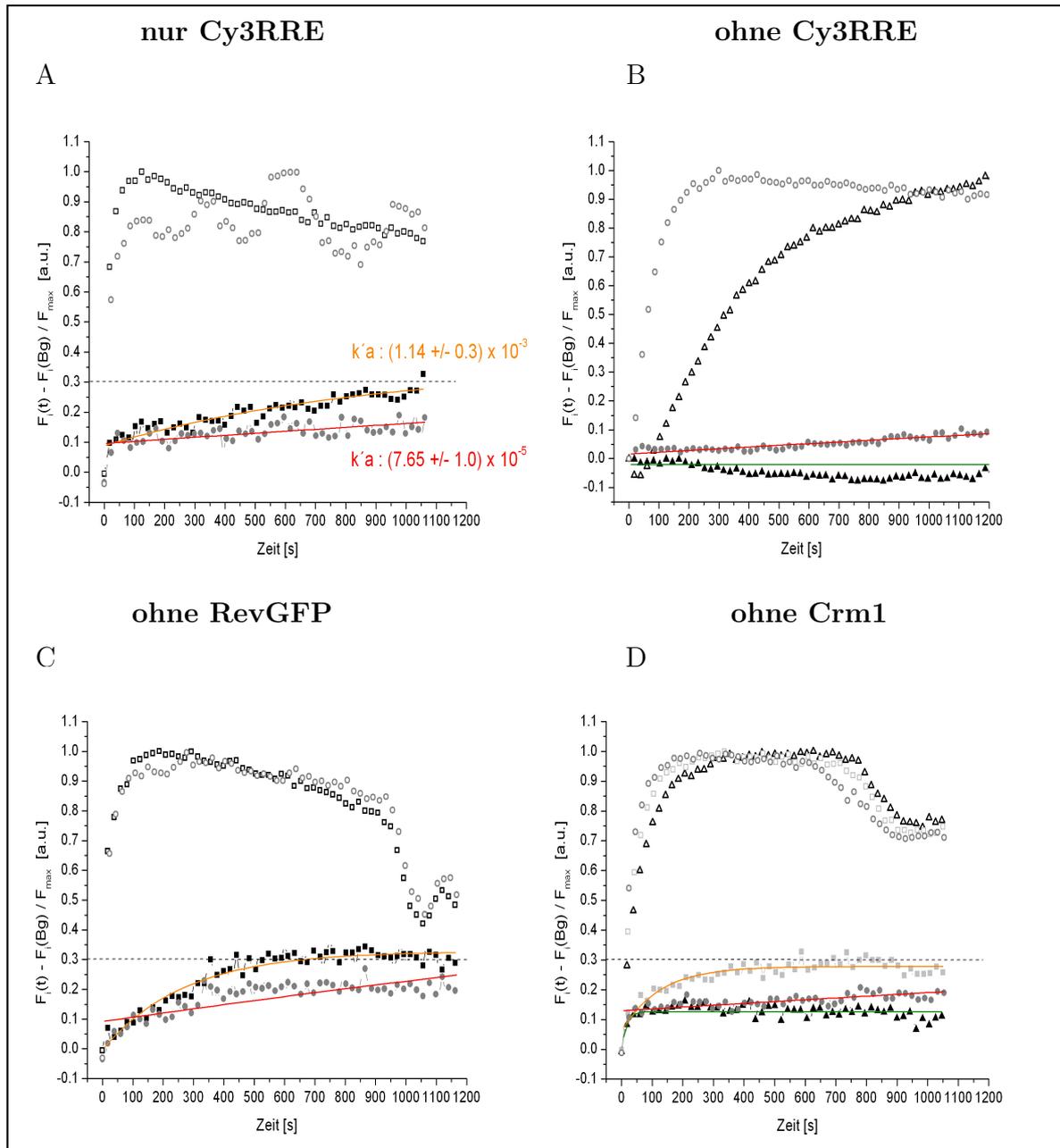


Abb. 14.12.: Ermittlung des minimalen Exportkomplexes für virale RRE-RNAs zeitlicher Verlauf der auf die Referenz-TCs normierten Fluoreszenzintensität; offene TCs mit offenen Symbolen und membranbedeckte TCs mit geschlossenen Symbolen dargestellt; **A:** nur Cy3RRE/HH-Fragment (■, □, orange/gelb); **B:** Transportmix mit RevGFP (▲, △, grün), Crm1, RanGTP ohne Cy3RRE/HH-Fragment; **C:** Transportmix mit Crm1, RanGTP, Cy3-RRE/HH-Fragment ohne RevGFP; **D:** Transportmix mit RevGFP, Cy3-RRE/HH Fragment, RanGTP ohne Crm1; **A-D:** Atto637-MBP(●, ○, rot) Dichtigkeitskontrolle

Transportrezeptor Crm1 zu durchqueren. Dies steht im Gegensatz zu den Experimenten von *D. Daelemans*, der eine Interaktion zwischen Crm1 und der leucinreichen NES-Sequenz des Rev-Proteins postuliert.^{5,18} Folglich müsste RevGFP laut *D. Daelemans* Vorstellungen sogar ohne Cy3-RRE/HH-Substrat aus dem Nukleus transportiert werden. In wie weit eine solche Bindung des Rev-Proteins an den Transportrezeptor auch ohne RRE-RNA von biologischer Relevanz ist und wie die Ergebnisse zur Crm1-Rev Bindung anderer Forschungsgruppen zu bewerten sind, wird noch ausführlicher in der Diskussion behandelt. Anzumerken wäre, dass es sich zwar bei Abbildung B um eine Einzelmessung handelt, da mehr auswertbare Ergebnisse mit einer dichten Membran nicht vorlagen. Jedoch konnte selbst bei den Messungen mit nicht dichter Membran kein Rev-Transport beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Die in Abbildung C und D für die offenen Referenz-TCs zu beobachtenden Abfälle der Fluoreszenzintensität zum Ende der Messung wurden durch den bereits angesprochenen Fokusdrift des Mikroskops verursacht, welches oftmals Stabilitätsprobleme aufwies. Jedoch werden die Ergebnisse durch die besagten Schwankungen nicht beeinflusst, wie die Daten belegen. Eine Erklärung für die periodischen Schwankungen in Abbildung A bei einer Anregungswellenlänge von 633 nm, die in gleicher Form auch bei der Messung von Abbildung [14.10,A] zu sehen sind, konnte nicht gefunden werden. Ein Einfluss auf die Transportkurven kann hier ebenfalls ausgeschlossen werden, da sich die Schwankungen nicht auf die Fluoreszenz der jeweiligen Crm1-Substrate in den membranbedeckten TCs übertragen.

Festgehalten werden kann als Ergebnis der hier dargestellten Messungen, dass die Interaktionen zwischen allen beteiligten Exportkomponenten spezifisch sind, da beispielsweise ohne RevGFP auch die RRE/HH-RNA nicht mehr durch Crm1 exportiert wird. Daneben kann RevGFP im Komplex mit dem RRE/HH Fragment nicht allein und unspezifisch an die FG-Schleifen der Nukleopore im NPC Kanal binden und so seinen Transport ohne Crm1 erreichen. Dies beweist wiederum, dass die Funktionalität der NPCs in den isolierten *Xenopus laevis* Kernmembranen erhalten blieb. Denn nur ein funktionsfähiger NPC kann als Barriere für inerte Moleküle fungieren, die wie RevGFP aufgrund ihrer Größe nicht passiv durch die zentrale Pore ohne FG-Schleifen diffundieren können. Das minimale Transportsystem für retrovirale RRE-RNAs, die in Form der zentralen Binderegion als RRE/HH Fragment untersucht wurden, besteht folglich aus Crm1, Rev und RanGTP.

14.5. Diskussion und Ausblick

Die Ergebnisse der vorangegangenen Abschnitte belegen eindeutig die Unidirektionalität des nucleocytoplasmatischen Transports retroviraler RRE-RNA-Substrate, da in Anwesenheit von RanGTP die Rückdiffusion von RevGFP und Cy3-RRE/HH inhibiert wird. Dies stellt neben dem bereits genannten energetischen Aspekt ein weiteres Indiz für eine GTP-Hydrolyse dar. Wie bereits in der Theorie zum Crm1-Transportrezeptor erläutert, bewirkt die GTP-Hydrolyse eine Konformationsänderung des Crm1-Proteins in dessen Folge sich der Exportkomplex aus RRE/HH, RevGFP und Ran auflöst. Die

gezeigten Messungen belegen demnach auf indirekte Weise zwei bereits bekannte Aspekte des nukleocytoplasmatischen Transportes: Erstens wird offensichtlich nur mit RanGTP ein Exportkomplex gebildet, denn sonst würde kein Export stattfinden. Zweitens kann nur eine RanGTP-Hydrolyse die notwendige Energie für eine Akkumulation gegen den Konzentrationsgradienten liefern, was in weiterführenden Experimenten mit nicht-hydrolysierbarem RanGTP zusätzlich belegt werden könnte.

Im Gegensatz dazu schlussfolgert *D. Daelemans*¹⁸ aus *in vivo*-Experimenten mit Crm1-GFP, dass Rev und Crm1 auch ohne RanGTP innerhalb der Nucleoli interagieren, da sich nach Anregung der Crm1-GFP Fusionsproteine auch die Fluoreszenz des FRET-Partners Rev-YFP nachweisen ließ. Diese Argumentation widerspricht jedoch der Tatsache, dass im Kern von lebenden Zellen wie bei den verwendeten HeLa-Zellen auch hohe Konzentrationen an RanGTP vorhanden sind, die eine Rev-Crm1 Bindung beeinflussen würden. Gleichzeitig stellt sich die Frage, ob eine Crm1-Rev Interaktion ohne die viralen RRE-Substrate und ohne RanGTP eine biologische Funktion übernimmt. Denn eigentlich sollte Rev erst mit Crm1 interagieren, wenn es sein für den Export bestimmtes RRE-RNA-Substrat gebunden hat. Bestätigt wird dies nicht nur durch die hier gezeigten Messungen, sondern auch durch *in vitro*-Crosslinking Experimente von *M. Fornerod*,³⁴ der eine Inhibierung der Rev-Crm1 Interaktion für RanT24N-GDP, einem Ran Protein das GTP nicht stabil binden kann, beobachtete. Crm1 hat zudem die Fähigkeit ohne RRE-RNA-Substrat zwischen Kern und Cytoplasma hin- und herzuwandern, wie in dieser Arbeit und allgemein bei *X. Zhang*¹²¹ gezeigt wurde. In seiner Funktion als Exportin sollte Crm1 erst durch eine RanGTP Bindung veranlasst werden, Substrate mit NES zu erkennen und zu transportieren. Crm1 besitzt allerdings für die relativ leucinreiche NES des Rev-Proteins eine recht geringe Affinität.⁴ Diese könnte jedoch durch die Homo-Multimerisierung auf der RRE-RNA erhöht werden, da mehrere NES-Sequenzen für eine Bindung zur Verfügung stehen und eventuell eine leichter zugängliche Orientierung innerhalb der multimerisierten Rev-Proteine erreicht wird.

Eine gleichzeitige Abhängigkeit des Crm1-Exports von ATP konnte im Fall des viralen RRE/HH-Fragments nicht beobachtet werden, was im Gegensatz zu *Zhangs* Arbeit steht, der in Mikroinjektionsexperimenten mit Zellkernen ATP als notwendigen Cofaktor identifizierte.¹²¹ Eine Beteiligung von ATP am Exportprozess wird teilweise durch die in Abschnitt [4.3] beschriebenen Experimente von *V.S.R.K. Yedavalli*¹¹⁹ gestützt, die belegen, dass eine defekte d.h. mutierte DDX3-Helikase den viralen Rev-RRE-Export zwar inhibiert, jedoch nicht vollständig ausschaltet. Denn DEAD-box Helikasen wie DDX3 benötigen Energie aus der ATP-Hydrolyse, um RNA-Strukturen oder RNA-Proteinkomplexe aufzulösen.^{91,119} Im Hinblick auf die vielfach diskutierte Beteiligung der Helikasen DDX3 oder An3^{119,121} am RNA-Export wäre es somit interessant, diese sowie weitere Cofaktoren des Crm1-Rev Exportweges im Vergleich zu den hier gezeigten Messungen zu untersuchen. Hierbei muss beachtet werden, dass die in Abschnitt [12.1] ermittelte Messgenauigkeit der verwendeten Transporteranalyse für den molekularen Fluss aus dem Kern bei 1.1 ± 0.7 Molekülen pro NPC pro Sekunde liegt, so dass sich der Fluss mindestens um einen Faktor 2 ändern muss, um mögliche Unterschiede bei Zugabe von Cofaktoren auflösen zu können.

Im Vergleich zu den in dieser Arbeit berechneten molekularen Flussraten für den Export der RRE-RNA liegt der Wert für das GST-GFP-NES Exportsubstrat (GGNES)⁹⁹ bei etwa 8.8 Molekülen pro NPC pro Sekunde. Letzterer Wert wurde allerdings auch bei einer Konzentrationsdifferenz von $2\ \mu\text{M}$ ermittelt, die um einen Faktor 2 höher ist als die theoretisch angenommene Konzentrationsdifferenz von $1\ \mu\text{M}$ im Fall des normierten Flusses. Wird diese Tatsache berücksichtigt, so müsste der molekulare Fluss für die RRE-RNA wegen der Proportionalität zwischen Fluss und anliegender Konzentrationsdifferenz bei etwa 5.4 Molekülen liegen, d.h. zweimal so schnell wie für $1\ \mu\text{M}$ angegeben. Das Reporterprotein aus GST-GFP mit einer NES wird in Anwesenheit von RanGTP schneller durch Crm1 exportiert als die RRE/HH-RNA mit dem Rev-Protein, obwohl beide Komplexe zusammen mit dem Exportin Crm1 ein ähnliches Molekulargewicht aufweisen. Im Fall von GGNES sind dies 53.7 kDa und bei RRE/HH mit Rev 61.7 kDa. Es wird somit erwartet, dass beide Exportkomplexe mit vergleichbarer Geschwindigkeit durch den NPC diffundieren. Dies könnte durchaus innerhalb der Fehlergrenzen der Fall sein, jedoch wird bei *J.P. Siebrasse*⁹⁹ kein Fehlerintervall angegeben.

Nicht nur eine Unidirektionalität des RRE-RNA-Transports d.h. eine Blockade des Rücktransports wird mit RanGTP erreicht, sondern auch ein Transport entgegen dem Konzentrationsgradienten über das Gleichgewicht hinaus. Dies spricht, wie gesagt, für eine GTP-Hydrolyse, da dabei ausreichend Bindungsenergie freigesetzt wird, die Konformationsänderungen von Proteinen hervorrufen kann. In deren Folge können somit Bindungen innerhalb von Exportkomplexen, wie diejenige zwischen Crm1 und Rev aufgelöst werden. Die Beteiligung weiterer aktivierender Faktoren wie RanGAP und RanBP1 an den cytoplasmatischen Filamenten oder aber auch Cofaktoren wie Helikasen werden dabei diskutiert.^{50,51,71} Die RanGTP-Hydrolyse wird dabei durch die katalytische Funktion von löslichem oder assoziiertem RanGAP ermöglicht. RanGAP in Lösung wird nach dem mehrmaligen Spülen der isolierten Kernmembranen nicht erwartet, so dass hierbei von gebundenem RanGAP ausgegangen wird. Demnach muss sich noch ausreichend RanGAP in der Nähe des gebundenen Crm1-Exportkomplexes befinden. RanGAP kann entweder direkt an der terminalen Bindestelle Nup214 oder vermittelt durch Nup358 an die cytoplasmatischen Filamente binden, um die GTP-Hydrolyse zu induzieren^{54,71} und eine Umkehr der Transportrichtung zu verhindern. Als weiterführendes Experiment würde sich ein Immunnachweis mit spezifischen Anti-RanGAP Antikörpern anbieten. Dieser könnte beweisen, ob RanGAP nach dem Spülen weiterhin an die NPCs der isolierten Kernmembranen gebunden ist. Eine Inhibierung der cytoplasmatischen Crm1-Bindestelle durch einen Anti-Nup214 Antikörper wäre auch denkbar, jedoch experimentell schwer durchführbar. Denn Proteine verhindern die Anheftung der isolierten Kernmembranen auf der Oberfläche und können nicht passiv durch den NPC zur Bindestelle auf die andere Seite der Membran gelangen. Für eine bessere Vergleichbarkeit des viralen Transportweges mit den Crm1-Exportmessungen wäre es sicher von Vorteil, die RRE-Transportversuche mit Alexa568 markiertem Crm1 zu wiederholen. Daneben würde eine Verwendung der gesamten 240 nt langen RRE-RNA-Sequenz die Möglichkeit eröffnen, die Bindung zwischen RevGFP und RRE-RNA weiter zu charakterisieren. Wegen der viel beschriebenen Problematik bei den Importversuchen wären ergänzende Experimente z.B. mit digitonisierten Zellen sinnvoll, um die ermittelten Importraten

mit einer unabhängigen Methode zu ergänzen.

Abschließend lässt sich folgendes Transportmodell aufstellen: Crm1 bindet in Anwesenheit von GTP beladenem Ran-Protein die NES-Sequenz des Rev-Proteins, das wiederum mit der retroviralen Cy3-RRE/HH-Sequenz interagiert. Dieser Exportkomplex wird schließlich mit einer erhöhten Exportrate $k_a = 1.5-2.0 \times k'_a$ aus dem Kern transportiert. Durch die folgende GTP-Hydrolyse auf der cytoplasmatischen Seite wird eine Konformationsänderung induziert, wodurch der Exportkomplex auseinanderfällt. Die exportierten Komponenten RevGFP und Cy3-RRE/HH können im Anschluss daran nicht mehr in den Kern zurückdiffundieren. Im Gegensatz dazu diffundiert Crm1 mit einer Geschwindigkeit von 1.9 ± 0.3 Molekülen pro NPC pro Sekunde in den Nukleus zurück, um im Anschluss weitere Rev-RRE/HH Komplexe aus dem Nukleus zu transportieren.

15. Resümee

Die Wissenschaft fängt eigentlich erst da an interessant zu werden, wo sie aufhört

*(Justus von Liebig (1803-1873)
chemische Briefe)*

Aktive und passive Membrantransportprozesse werden auch in Zukunft im Fokus der Wissenschaft bleiben, da nicht nur ein großes pharmakologisches Interesse besteht, sondern viele grundlegende Transportmechanismen noch nicht ausreichend verstanden sind. Im Fall des Kernporenkomplexes könnte die Etablierung eines zuverlässigen Transportassays die Möglichkeit eröffnen, Inhibitoren zu testen, die im viralen Vermehrungszyklus des Mason-Pfizer-Monkey Virus oder des HI-Virus angreifen. Die OSTR-Methode bietet dafür optimale Voraussetzungen, weil einzelne Komponenten und deren Einfluss auf die Transportgeschwindigkeit des gesamten Translokationsprozesses individuell überprüft werden können. Jedoch sollte eine pharmakologisch interessante Methode zur Analyse von Membrantransportvorgängen nicht nur universell auf alle Arten von Transportern und Kanäle anwendbar sein, sondern auch eine entsprechend hohe Ausbeute an verwertbaren Messungen liefern. In dieser Hinsicht waren einige Verbesserungen der OSTR-Methode notwendig.

Zunächst brachte die Funktionalisierung der Polykarbonatoberfläche durch SMCC eine wesentliche Verbesserung der Versuchsausbeute, da die Kernmembranen über die Cysteinreaktivität der Maleimidgruppe am SMCC fester an die Poly-L-Lysin Schicht auf der Messarrayoberfläche gekoppelt wurden. Die Wahl der jeweiligen Dichtigkeitskontrolle beeinflusste ebenfalls die Messausbeute, da die Membrandichtigkeit durch die jeweilige Kontrolle zuverlässig angezeigt werden muss. Atto637-Fluoreszenzfarbstoffe eigneten sich im roten Spektralbereich aufgrund der geringeren Adsorptionsneigung und der hohen Wasserlöslichkeit besonders gut als Marker für die Kontrollproteine, unabhängig davon ob BSA oder MBP als Protein verwendet wurden. Weitere methodische Verbesserungen lagen im Materialbereich. Denn die bisherigen Messarrays aus Polykarbonat wiesen eine herstellungsbedingte Autofluoreszenz der TC-Ränder auf und führten durch den Brechungsindexunterschied zwischen Puffer und Material zu einem reduzierten Auflösungsvermögen des Fluoreszenzmikroskops. Die Messungen aus dieser Arbeit zeigten, dass mit TeflonAF alle genannten Nachteile des Polykarbonats verhindert werden konnten. Dadurch wurde die Basis für die Entwicklung kostengünstiger Messarrays mit deutlich kleineren, homogenen Vertiefungen gelegt, so dass zukünftig einzelne Transporter aufgelöst werden können. Die Hydrophibizität des Teflons würde zudem Transportstudien mit Kanälen ermöglichen, die in Liposomen rekonstituiert wurden. Kernmembranen dagegen können mit Hilfe einer Siliziumdioxid-Beschichtung gut auf der hydrophoben

Teflonoberfläche angeheftet werden. Trotzalledem werden weitere Verbesserungen benötigt, wenn das in dieser Arbeit vorgestellte Analyseverfahrens zuverlässig zum Screening von Cofaktoren, pharmologischen Substraten oder Mutanten der Transportproteine eingesetzt werden soll. Eine automatisierte Zugabe über eine Injektionsanlage würde beispielsweise die Variation und damit den Messfehler reduzieren. Ebenso müsste eine Möglichkeit gefunden werden, die beobachteten saisonalen Unterschiede in der Oozytenbeschaffenheit sowie in der Eignung der daraus isolierten Kernmembranen zu minimieren, um eine effektive Membrananheftung auf der Oberfläche zu erreichen. Die hohe Variation bei den sich anschließenden Importmessungen nach Richtungsumkehr könnten ausgeschlossen werden, indem systematisch nach den optimalen Versuchsparametern gesucht wird, die einen vollständigen und schnellen Pufferaustausch garantieren. Ergänzend sind weitere Importversuche z.B. mit digitonisierten Zellen oder mit intakten Kernen notwendig, um die Importraten mit einer unabhängigen Methode abzusichern.

Nach diesen Vorarbeiten konnten die Vorteile der OSTR-Methode genutzt werden, um wichtige zellbiologische Fragestellungen zu bearbeiten. Die Entdeckung, dass Arx1 mit den pre-60S Vorstufen der Ribosomen im Kern assoziiert ist und zudem an einige Nukleoporine des NPCs binden kann, stellte die Frage nach der Funktion des Arx1 Proteins. Diskutiert wurde beispielsweise die Beteiligung am Exportprozess der ribosomalen Vorstufen, der durch Xpo1 und Mex67/Mtr2 gleichermaßen vermittelt wird. Ein direkter Beweis dafür gelang erst durch die Experimente in dieser Arbeit. Diese belegen, dass Arx1 ohne weitere Cofaktoren und trotz seiner Größe von 65.2 kDa in der Lage ist, den NPC in beide Richtungen zu durchqueren. Der Export aus dem Nukleus erfolgte mit einem k -Wert von $4.8 \pm 1.2 \times 10^{-3} s^{-1}$, der Import mit $3.8 \pm 1.6 \times 10^{-3} s^{-1}$. Dabei wurde Arx1 in den membranbedeckten TCs weder an- noch abgereichert, so dass bei der erleichterten Diffusion durch den NPC keine Richtung bevorzugt wird. Dies entspricht dem typischen Verhalten eines Transportrezeptors, der an die Nukleoporine im NPC binden kann und nicht an energieverbrauchende Prozesse gekoppelt ist. Der initiale Fluss von Arx1 durch den NPC kann für beide Richtungen folglich gemittelt werden und liegt für eine Konzentrationsdifferenz von $1 \mu M$ bei etwa 2.9 ± 0.45 Molekülen pro NPC pro Sekunde. Als Negativkontrollen dienten dabei die Sequenz- und Funktionshomologen Map1 und Ebp1 (*Homo sapiens*), die beide keine Translokation durch den NPC zeigten. Arx1 konnte mit den gezeigten Messungen eindeutig als neuer Exportrezeptor für pre-60S Vorstufen identifiziert werden.

Das pharmakologische Interesse an viralen, nucleocytoplasmatischen Transportwegen steht außer Frage. Trotz vielfältiger Forschungen im Bereich des Exports und Imports retroviraler RNA-Substrate aus dem humanpathogenen HI-Virus, konnte selbst nach vielfältigen Bindungsstudien und Strukturuntersuchungen das minimale Transportsystem noch nicht direkt und eindeutig nachgewiesen werden. Zur Feststellung des Minimalsystems wurde in dieser Arbeit erstmalig ein Transportassay mit drei fluoreszenzmarkierten Substraten etabliert, der die gleichzeitige Messung der Transportkinetik nahezu aller potentiell am retroviralen Export beteiligten Spezies erlaubte. Dazu zählt zum einen das Karyopherin Crm1, welches leucinreiche NES-Sequenzen erkennt, sowie der retrovirale Rev-Adapter, der das Rev-Responsive-Element als Sekundärstruktur in ungespleißten retroviralen RNA-Transkripten bindet. Als Modell für alle ungespleißten bzw.

teilweise gespleißten RNA-Transkripte wurde eine verkürzte RRE-Sequenz in Form des RRE/HH-Fragments verwendet, nachdem deren Bindung an das Rev-Protein in einem Gelshift-Assay nachgewiesen werden konnte. Neben der fluoreszenzmarkierten Dichtigkeitskontrolle Atto637-MBP wurde Rev in Form eines GFP-Fusionsproteins eingesetzt, sowie das RRE/HH-Fragment mit einem Cy3-Farbstoff markiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit konnten eindeutig und mit einem direkten *in vitro*-Exportassay zeigen, dass das minimale Exportsystem aus Rev, RRE-RNA, Crm1 und RanGTP besteht. Das energie-reiche GTP beladene Ran ist dabei absolut essentiell, da ohne Ran auch kein Transport stattfindet, während mit Ran sogar eine Anreicherung in den membranbedeckten TCs beobachtet wird. Zudem wird beim Minimalsystem mit RanGTP die Rückdiffusion aus den TCs nicht nur gehemmt, wie bei Crm1 mit RanGTP, sondern sogar vollständig inhi-biert. Der retrovirale Export der RRE-RNA kann somit als unidirektionaler Transport bezeichnet werden. Bei der theoretischen Konzentrationsdifferenz von $1\ \mu\text{M}$ ergibt sich für RevGFP und Cy3-RRE/HH eine vergleichbare initiale Flussrate mit einem Mittelwert von 2.15 Molekülen pro NPC pro Sekunde. Im Gegensatz dazu konnte der Export des Alexa568-markierten Crm1-Proteins in Anwesenheit von RanGTP umgekehrt werden, wobei die Diffusion aus den TCs deutlich langsamer verlief als die Diffusion in die TCs. Dies macht deutlich, dass die Bildung eines Exportkomplexes aus RevGFP, RRE/HH-Substrat und Crm1/RanGTP entscheidend zur Unidirektionalität des Trans-portes beiträgt.

Daran könnten sich Experimente anschließen, die den Einfluss zusätzlicher Faktoren auf den retroviralen RRE-RNA-Transportweg analysieren, wie beispielsweise der DDX3-Helikase. Ebenso ließen sich Inhibitoren des RRE-RNA-Exportweges auf ihre Wirksamkeit hin überprüfen. Des Weiteren würde die Verwendung der gesamten, 240 nt langen RRE-RNA Sequenz wichtige Hinweise zum *in vivo*-Mechanismus liefern, denn sie erlaubt eine Titration der RRE-RNA mit ansteigenden Konzentrationen an Rev-Monomeren, die in kooperativer Weise an die RRE-RNA binden. Dadurch könnte geklärt werden, ob die Exposition mehrerer leucinreicher NES-Sequenzen eine Erhöhung der Transport-geschwindigkeit zur Folge hat. Denkbar wäre, dass bei maximal bis zu zehn gebundenen Rev-Monomeren, so viele NES-Sequenzen zugänglich werden, dass auch mehrere Crm1 Proteine daran binden und über eine konzertierte Wirkung den Export der RRE-RNA beschleunigen. Weitere Beweise für einen direkten Einfluss der GTP-Hydrolyse auf die Transportgeschwindigkeit könnten durch Versuche mit nicht-hydrolysierbaren GTP-Analogen, wie GppNHp, erbracht werden. Gleichzeitig ließe sich auch die termina-le Bindestelle am NPC blockieren, die ebenfalls für die GTP-Hydrolyse von großer Bedeutung ist. Eine der großen Herausforderungen für zukünftige Forschungen besteht sicher darin, die bisher experimentell zugängliche, apparente Geschwindigkeitskonstante des Gesamtprozesses in diejenigen der einzelnen molekularen Reaktionen aufzulösen. Dies ermöglicht einen Vergleich der einzelnen molekularen Geschwindigkeiten, wie beispielsweise zwischen der Geschwindigkeit der Bildung des Exportkomplexes und der Geschwindigkeit der Assoziation am NPC. Realisierbar wäre eine solche Analyse durch eine Kombination der verschiedenen *in vivo*- und *in vitro*-Methoden, wie Einzelmolekülspektroskopie, FRET, OSTR sowie zeitauflösende Videomikroskopie und systemanalytische Berechnungen.

Abkürzungsverzeichnis

6-ACA	6- <u>A</u> mino <u>C</u> aproic <u>A</u> cid
Amps	Ammoniumpersulfat
Arx1	<u>A</u> ssociated with <u>R</u> ibosomal <u>e</u> xport complex, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
BSA	<u>B</u> ovine <u>S</u> erum <u>A</u> lbumine, <i>Bos taurus</i>
CCR5	<u>CC</u> Chemokine <u>R</u> eceptor Type 5, <i>Homo sapiens</i>
CD	<u>C</u> irculärer <u>D</u> ichroismus
CIP	<u>C</u> alf <u>I</u> ntestine <u>A</u> lkaline <u>P</u> hosphatase
Crm1	<u>C</u> hromosome <u>R</u> egion <u>M</u> aintenance 1 protein, <i>Homo sapiens</i> ; Xpo1 in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
CXCR4	<u>CXC</u> Chemokine <u>R</u> eceptor Type 4, <i>Homo sapiens</i>
Dbp5	<u>DEAD</u> <u>B</u> ox <u>P</u> rotein 5, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
DDX3	<u>DEAD</u> <u>B</u> ox <u>P</u> rotein 3, <i>Homo sapiens</i>
DEAD-box	D-E-A-D = Asp-Glu-Ala-Asp Box
DEPC	Diethylpyrokarbonat
DTT	Dithiothreitol
EBP1	NFKB-1, Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit, <i>Homo sapiens</i>
EM	Elektronenmikroskopie
Env	<u>E</u> nvelope Glykoprotein, <i>HIV-1</i>
FIB	<u>F</u> ocussed <u>I</u> on <u>B</u> eam
FRET	<u>F</u> örster <u>R</u> esonance <u>E</u> nergy <u>T</u> ransfer
FRAP	<u>F</u> luorescence <u>R</u> ecovery <u>a</u> fter <u>P</u> hotobleaching
FT-IR	<u>F</u> ourier <u>T</u> ransformation <u>I</u> nfrared Spectroscopy
GagPol	Polypeptid aus <i>HIV-1</i> , Hauptbestandteile: Matrixprotein p17, Capsidprotein p24, Nukleocapsidprotein p7, Reverse Transkriptase, Integrase

GFP	<u>G</u> reen <u>F</u> luorescent <u>P</u> rotein, <i>Aequorea victoria</i>
GTP	<u>G</u> uanosine <u>T</u> riphosphate
HEAT	<u>H</u> untington <u>E</u> longation faktor 3, Protein Phosphatase <u>2A</u> , Lipid Kinase <u>T</u> OR
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N ² -(2-Ethansulfonsäure)
HIV-1	<u>H</u> uman <u>I</u> mmunodeficiency <u>V</u> irus type 1
IPTG	Isopropyl-1-Thio- β -D-Galactosid
LMP-Agarose	<u>L</u> ow- <u>M</u> elting- <u>P</u> oint Agarose
LMW	<u>L</u> ow- <u>M</u> olecular- <u>W</u> eight Proteinmarker
MAP-1	<u>M</u> ethionine <u>A</u> mino <u>p</u> eptidase 1, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
MBP	<u>M</u> altose <u>B</u> inding <u>P</u> rotein, <i>Escherichia coli</i>
MDBK-Zellen	<u>M</u> adin- <u>D</u> arby <u>B</u> ovine <u>K</u> idney Zellen, <i>Bos taurus</i>
MG	Molekulargewicht
Nef	<u>N</u> egative <u>F</u> actor, <i>HIV-1</i>
NES	<u>N</u> uclear <u>E</u> xport <u>S</u> equence
NLS	<u>N</u> uclear <u>L</u> ocalisation <u>S</u> equence
NMD3	<u>N</u> on-sense <u>M</u> ediated mRNA <u>D</u> ecay Pathwayprotein 3, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
NTR	<u>N</u> uclear <u>T</u> ransport <u>R</u> eceptor
OSTR	<u>O</u> ptical <u>S</u> ingle <u>T</u> ransporter <u>R</u> ecording, Optische Einzeltransporteranalyse
PBS	<u>P</u> hosphate <u>B</u> uffered <u>S</u> aline
PSF	<u>P</u> oint <u>S</u> pread <u>F</u> unction, Punktverwaschungsfunktion
Ran	GTP-bindendes Kernprotein <i>Homo sapiens</i>
RCC1	<u>R</u> egulator of <u>C</u> hromosome <u>C</u> ondensation
Rev	<u>R</u> egulator of <u>E</u> xpression of <u>V</u> iral proteins, <i>HIV-1</i>
ROI	<u>R</u> egion of <u>I</u> nterest
RRE-RNA	<u>R</u> ev <u>R</u> esponsive <u>E</u> lement <u>R</u> ibonucleic <u>A</u> cid
RT	Raumtemperatur
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

SMCC	Succinimidyl-4-(N-Maleimidomethyl)Cyclohexan-1-Carboxylat
SUMO	Small <u>U</u> biquitin related <u>M</u> odifier
Tat	<u>T</u> rans <u>a</u> ctivating Regulatory Protein, <i>HIV-1</i>
TCEP	Tris-(2-Carboxyethyl)Phosphin
TCs	<u>T</u> est <u>C</u> hambers, Messvertiefungen
TeflonAF	Teflon <u>A</u> morphous <u>F</u> luorpolymer
TEMED	Tetramethylethylenediamin
Vpr	<u>V</u> iral <u>P</u> rotein <u>R</u> , <i>HIV-1</i>
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid

Literaturverzeichnis

- [1] ABLAN, S. u. a.: The role of cholesterol and sphingolipids in chemokine receptor function and HIV-1 envelope glycoprotein-mediated fusion. In: *Virology* 3 (2006), S. 104
- [2] ADACHI, Y. ; YANAGIDA, M.: Higher order chromosome structure is affected by cold-sensitive mutations in a *Schizosaccharomyces pombe* gene *crm1+* which encodes a 115-kD protein preferentially localized in the nucleus and its periphery. In: *J Cell Biol.* 108 (1989), Nr. 4, S. 1195–1207
- [3] AKEY, C. W. ; RADERMACHER, M.: Architecture of the *Xenopus* nuclear pore complex revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy. In: *J Cell Biol.* 122 (1993), Nr. 1, S. 1–19
- [4] ASKJAER, P. u. a.: RanGTP-regulated interactions of CRM1 with nucleoporins and a shuttling DEAD-box helicase. In: *Mol. Cell Biol.* 19 (1999), Nr. 9, S. 6276–6285
- [5] ASKJAER, P. ; JENSEN, T. H. ; NILSSON, J. ; ENGLMEIER, L. ; KJEMS, J.: The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. In: *J Biol. Chem.* 273 (1998), Nr. 50, S. 33414–33422
- [6] BALL, J. R. ; ULLMAN, K. S.: Versatility at the nuclear pore complex: lessons learned from the nucleoporin Nup153. In: *Chromosoma* (2005), S. 1–12
- [7] BATTISTE, J. L. ; TAN, R. ; FRANKEL, A. D. ; WILLIAMSON, J. R.: Binding of an HIV Rev peptide to Rev responsive element RNA induces formation of purine-purine base pairs. In: *Biochemistry* 33 (1994), Nr. 10, S. 2741–2747
- [8] BECK, M. u. a.: Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryo-electron tomography. In: *Science* 306 (2004), Nr. 5700, S. 1387–1390
- [9] BECSKEI, A. ; MATTAJ, I. W.: Quantitative models of nuclear transport. In: *Curr. Opin. Cell Biol.* 17 (2005), Nr. 1, S. 27–34
- [10] BEN-EFRAIM, I. ; GERACE, L.: Gradient of increasing affinity of importin beta for nucleoporins along the pathway of nuclear import. In: *J Cell Biol.* 152 (2001), Nr. 2, S. 411–417
- [11] BERNAD, R. ; ENGELSMA, D. ; SANDERSON, H. ; PICKERSGILL, H. ; FORNEROD, M.: Nup214-Nup88 nucleoporin subcomplex is required for CRM1-mediated 60 S preribosomal nuclear export. In: *J Biol. Chem.* 281 (2006), Nr. 28, S. 19378–19386

- [12] BERNAD, R. ; ENGELSMA, D. ; SANDERSON, H. ; PICKERSGILL, H. ; FORNEROD, M.: The Nup214/Nup88 nucleoporin subcomplex is required for CRM1 mediated 60S preribosomal nuclear export. In: *J.Biol.Chem.* (2006)
- [13] BRADATSCH, B. u. a.: Arx1 Functions as an Unorthodox Nuclear Export Receptor for the 60S Preribosomal Subunit. In: *Mol.Cell* 27 (2007), Nr. 5, S. 767–779
- [14] BRADFORD, M. M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. In: *Anal.Biochem.* 72 (1976), S. 248–254
- [15] COMPTON, S. J. ; JONES, C. G.: Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. In: *Anal.Biochem.* 151 (1985), Nr. 2, S. 369–374
- [16] CRONSHAW, J. M. ; MATUNIS, M. J.: The nuclear pore complex: disease associations and functional correlations. In: *Trends Endocrinol.Metab* 15 (2004), Nr. 1, S. 34–39
- [17] CULLEN, B. R.: Nuclear mRNA export: insights from virology. In: *Trends Biochem.Sci* 28 (2003), Nr. 8, S. 419–424
- [18] DAELEMANS, D. ; COSTES, S. V. ; LOCKETT, S. ; PAVLAKIS, G. N.: Kinetic and molecular analysis of nuclear export factor CRM1 association with its cargo in vivo. In: *Mol.Cell Biol.* 25 (2005), Nr. 2, S. 728–739
- [19] DALY, T. J. ; COOK, K. S. ; GRAY, G. S. ; MAIONE, T. E. ; RUSCHE, J. R.: Specific binding of HIV-1 recombinant Rev protein to the Rev-responsive element in vitro. In: *Nature* 342 (1989), Nr. 6251, S. 816–819
- [20] DASCAL, N.: The use of *Xenopus* oocytes for the study of ion channels. In: *CRC Crit Rev.Biochem.* 22 (1987), Nr. 4, S. 317–387
- [21] DAVIS, B. J.: DISC ELECTROPHORESIS. II. METHOD AND APPLICATION TO HUMAN SERUM PROTEINS. In: *Ann.N.Y.Acad.Sci* 121 (1964), S. 404–427
- [22] DEMIREL, Y. ; SANDLER, S. I.: Thermodynamics and bioenergetics. In: *Biophys.Chem.* 97 (2002), Nr. 2-3, S. 87–111
- [23] DENNING, D. P. ; PATEL, S. S. ; UVERSKY, V. ; FINK, A. L. ; REXACH, M.: Disorder in the nuclear pore complex: the FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded. In: *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 100 (2003), Nr. 5, S. 2450–2455
- [24] DEVOS, D. u. a.: Simple fold composition and modular architecture of the nuclear pore complex. In: *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* 103 (2006), Nr. 7, S. 2172–2177
- [25] DOMS, R. W. ; TRONO, D.: The plasma membrane as a combat zone in the HIV battlefield. In: *Genes Dev.* 14 (2000), Nr. 21, S. 2677–2688
- [26] ELLIS, R. J.: Macromolecular crowding: an important but neglected aspect of the intracellular environment. In: *Curr.Opin.Struct.Biol.* 11 (2001), Nr. 1, S. 114–119

-
- [27] ENGLMEIER, L. u. a.: RanBP3 influences interactions between CRM1 and its nuclear protein export substrates. In: *EMBO Rep.* 2 (2001), Nr. 10, S. 926–932
- [28] ENGLMEIER, L. ; OLIVO, J. C. ; MATTAJ, I. W.: Receptor-mediated substrate translocation through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis. In: *Curr.Biol.* 9 (1999), Nr. 1, S. 30–41
- [29] FABERGE, A. C.: Direct demonstration of eight-fold symmetry in nuclear pores. In: *Z.Zellforsch.Mikrosk.Anat.* 136 (1973), Nr. 2, S. 183–190
- [30] FASSATI, A.: HIV infection of non-dividing cells: a divisive problem. In: *Retrovirology.* 3 (2006), S. 74
- [31] FASSATI, A. ; GORLICH, D. ; HARRISON, I. ; ZAYTSEVA, L. ; MINGOT, J. M.: Nuclear import of HIV-1 intracellular reverse transcription complexes is mediated by importin 7. In: *EMBO J* 22 (2003), Nr. 14, S. 3675–3685
- [32] FATICA, A. ; TOLLERVEY, D.: Making ribosomes. In: *Curr.Opin.Cell Biol.* 14 (2002), Nr. 3, S. 313–318
- [33] FLEMING, K. G.: Riding the wave: structural and energetic principles of helical membrane proteins. In: *Curr.Opin.Biotechnol.* 11 (2000), Nr. 1, S. 67–71
- [34] FORNEROD, M. ; OHNO, M. ; YOSHIDA, M. ; MATTAJ, I. W.: CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. In: *Cell* 90 (1997), Nr. 6, S. 1051–1060
- [35] FREED, E. O.: HIV-1 replication. In: *Somat.Cell Mol.Genet.* 26 (2001), Nr. 1-6, S. 13–33
- [36] FREY, S. ; GORLICH, D.: A saturated FG-repeat hydrogel can reproduce the permeability properties of nuclear pore complexes. In: *Cell* 130 (2007), Nr. 3, S. 512–523
- [37] GADAL, O. u. a.: Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. In: *Mol.Cell Biol.* 21 (2001), Nr. 10, S. 3405–3415
- [38] GAIBELET, G. u. a.: CD4 and CCR5 constitutively interact at the plasma membrane of living cells: a confocal fluorescence resonance energy transfer-based approach. In: *J Biol.Chem.* 281 (2006), Nr. 49, S. 37921–37929
- [39] GALLO, R. C. u. a.: Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). In: *Science* 220 (1983), Nr. 4599, S. 865–867
- [40] H, Zwarenstein ; HA, Shapiro: Metabolic changes associated with endocrine activity and the reproductive cycle in *Xenopus Laevis*. In: *J.Exp.Biol.* 10 (1933), S. 372–378

- [41] HEMMLER, R. ; BOSE, G. ; WAGNER, R. ; PETERS, R.: Nanopore unitary permeability measured by electrochemical and optical single transporter recording. In: *Biophys.J.* (2005)
- [42] HENDERSON, B. R. ; PERCIPALLE, P.: Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: the Rev nuclear localisation signal mediates specific binding to human importin-beta. In: *J Mol.Biol.* 274 (1997), Nr. 5, S. 693–707
- [43] HINK, M. A. u. a.: Structural dynamics of green fluorescent protein alone and fused with a single chain Fv protein. In: *J Biol.Chem.* 275 (2000), Nr. 23, S. 17556–17560
- [44] HO, J. H. ; KALLSTROM, G. ; JOHNSON, A. W.: Nascent 60S ribosomal subunits enter the free pool bound by Nmd3p. In: *RNA.* 6 (2000), Nr. 11, S. 1625–1634
- [45] HO, J. H. ; KALLSTROM, G. ; JOHNSON, A. W.: Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. In: *J Cell Biol.* 151 (2000), Nr. 5, S. 1057–1066
- [46] HOCHULI, E. ; DOBELI, H. ; SCHACHER, A.: New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. In: *J Chromatogr.* 411 (1987), S. 177–184
- [47] HOFMEISTER, F.: Zur Lehre von der Wirkung der Salze II. In: *Arch.Exp.Pathol.Pharmakol.* 24 (1888), S. 247–260
- [48] HUNG, N. J. ; JOHNSON, A. W.: Nuclear recycling of the pre-60S ribosomal subunit-associated factor Arx1 depends on Rei1 in *Saccharomyces cerevisiae*. In: *Mol.Cell Biol.* 26 (2006), Nr. 10, S. 3718–3727
- [49] HUNG, N. J. ; LO, K. Y. ; PATEL, S. S. ; HELMKE, K. ; JOHNSON, A. W.: Arx1 Is a Nuclear Export Receptor for the 60S Ribosomal Subunit in Yeast. In: *Mol.Biol.Cell* 19 (2008), Nr. 2, S. 735–744
- [50] HUTTEN, S. ; KEHLENBACH, R. H.: Nup214 is required for CRM1-dependent nuclear protein export in vivo. In: *Mol.Cell Biol.* 26 (2006), Nr. 18, S. 6772–6785
- [51] HUTTEN, S. ; KEHLENBACH, R. H.: CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. In: *Trends Cell Biol.* 17 (2007), Nr. 4, S. 193–201
- [52] HUVE, J. ; WESSELMANN, R. ; KAHMS, M. ; PETERS, R.: 4Pi microscopy of the nuclear pore complex. In: *Biophys.J* 95 (2008), Nr. 2, S. 877–885
- [53] JAIN, C. ; BELASCO, J. G.: Structural model for the cooperative assembly of HIV-1 Rev multimers on the RRE as deduced from analysis of assembly-defective mutants. In: *Mol.Cell* 7 (2001), Nr. 3, S. 603–614
- [54] KEHLENBACH, R. H. ; DICKMANN, A. ; KEHLENBACH, A. ; GUAN, T. ; GERACE, L.: A role for RanBP1 in the release of CRM1 from the nuclear pore complex in a terminal step of nuclear export. In: *J Cell Biol.* 145 (1999), Nr. 4, S. 645–657

-
- [55] KEMINER, O. ; PETERS, R.: Permeability of single nuclear pores. In: *Biophys.J.* 77 (1999), Nr. 1, S. 217–228
- [56] KEMINER, O. ; SIEBRASSE, J. P. ; ZERF, K. ; PETERS, R.: Optical recording of signal-mediated protein transport through single nuclear pore complexes. In: *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 96 (1999), Nr. 21, S. 11842–11847
- [57] KISELEVA, E. ; GOLDBERG, M. W. ; ALLEN, T. D. ; AKEY, C. W.: Active nuclear pore complexes in *Chironomus*: visualization of transporter configurations related to mRNP export. In: *J Cell Sci* 111 (Pt 2) (1998), S. 223–236
- [58] KISKIN, N. I. ; SIEBRASSE, J. P. ; PETERS, R.: Optical microwell assay of membrane transport kinetics. In: *Biophys.J.* 85 (2003), Nr. 4, S. 2311–2322
- [59] KLEBE, R. J. ; HARRISS, J. V. ; SHARP, Z. D. ; DOUGLAS, M. G.: A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast. In: *Gene* 25 (1983), Nr. 2-3, S. 333–341
- [60] KRULL, S. ; THYBERG, J. ; BJORKROTH, B. ; RACKWITZ, H. R. ; CORDES, V. C.: Nucleoporins as components of the nuclear pore complex core structure and Tpr as the architectural element of the nuclear basket. In: *Mol.Biol.Cell* 15 (2004), Nr. 9, S. 4261–4277
- [61] KUBITSCHECK, U. u. a.: Nuclear transport of single molecules: dwell times at the nuclear pore complex. In: *J.Cell Biol.* 168 (2005), Nr. 2, S. 233–243
- [62] LA, Torre J. G. ; HUERTAS, M. L. ; CARRASCO, B.: Calculation of hydrodynamic properties of globular proteins from their atomic-level structure. In: *Biophys.J* 78 (2000), Nr. 2, S. 719–730
- [63] LAEMMLI, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. In: *Nature* 227 (1970), Nr. 5259, S. 680–685
- [64] LANDRY, Y. ; GIES, J. P.: Drugs and their molecular targets: an updated overview. In: *Fundam.Clin.Pharmacol.* 22 (2008), Nr. 1, S. 1–18
- [65] LEBRETON, A. u. a.: A functional network involved in the recycling of nucleocytoplasmic pre-60S factors. In: *J.Cell Biol.* 173 (2006), Nr. 3, S. 349–360
- [66] LENART, P. ; ELLENBERG, J.: Monitoring the permeability of the nuclear envelope during the cell cycle. In: *Methods* 38 (2006), Nr. 1, S. 17–24
- [67] LIM, R. Y. u. a.: Flexible phenylalanine-glycine nucleoporins as entropic barriers to nucleocytoplasmic transport. In: *Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A* (2006)
- [68] LUEDTKE, N. W. ; TOR, Y.: Fluorescence-based methods for evaluating the RNA affinity and specificity of HIV-1 Rev-RRE inhibitors. In: *Biopolymers* 70 (2003), Nr. 1, S. 103–119
- [69] MADRID, A. S. ; WEIS, K.: Nuclear transport is becoming crystal clear. In: *Chromosoma* 115 (2006), Nr. 2, S. 98–109

- [70] MAHAJAN, R. ; GERACE, L. ; MELCHIOR, F.: Molecular characterization of the SUMO-1 modification of RanGAP1 and its role in nuclear envelope association. In: *J Cell Biol.* 140 (1998), Nr. 2, S. 259–270
- [71] MATUNIS, M. J. ; COUTAVAS, E. ; BLOBEL, G.: A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. In: *J Cell Biol.* 135 (1996), Nr. 6 Pt 1, S. 1457–1470
- [72] MELCAK, I. ; HOELZ, A. ; BLOBEL, G.: Structure of Nup58/45 suggests flexible nuclear pore diameter by intermolecular sliding. In: *Science* 315 (2007), Nr. 5819, S. 1729–1732
- [73] MOY, T. I. ; SILVER, P. A.: Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. In: *Genes Dev.* 13 (1999), Nr. 16, S. 2118–2133
- [74] NEVILLE, M. ; STUTZ, F. ; LEE, L. ; DAVIS, L. I. ; ROSBASH, M.: The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. In: *Curr.Biol.* 7 (1997), Nr. 10, S. 767–775
- [75] NISSAN, T. A. ; BASSLER, J. ; PETFALSKI, E. ; TOLLERVEY, D. ; HURT, E.: 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. In: *EMBO J* 21 (2002), Nr. 20, S. 5539–5547
- [76] PAINE, P. L. ; MOORE, L. C. ; HOROWITZ, S. B.: Nuclear envelope permeability. In: *Nature* 254 (1975), Nr. 5496, S. 109–114
- [77] PANTE, N. ; KANN, M.: Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. In: *Mol.Biol.Cell* 13 (2002), Nr. 2, S. 425–434
- [78] PETERS, R.: Optical single transporter recording: transport kinetics in microarrays of membrane patches. In: *Annu.Rev.Biophys.Biomol.Struct.* 32 (2003), S. 47–67
- [79] PETERS, R.: Translocation through the nuclear pore complex: selectivity and speed by reduction-of-dimensionality. In: *Traffic.* 6 (2005), Nr. 5, S. 421–427
- [80] PETERS, R.: Use of *Xenopus laevis* oocyte nuclei and nuclear envelopes in nucleocytoplasmic transport studies. In: *Methods Mol.Biol.* 322 (2006), S. 259–272
- [81] PETERS, R. ; COUTAVAS, E. ; SIEBRASSE, J. P.: Nuclear transport kinetics in microarrays of nuclear envelope patches. In: *J Struct.Biol.* 140 (2002), Nr. 1-3, S. 268–278
- [82] PETOSA, C. u. a.: Architecture of CRM1/Exportin1 suggests how cooperativity is achieved during formation of a nuclear export complex. In: *Mol.Cell* 16 (2004), Nr. 5, S. 761–775
- [83] POLLARD, V. W. ; MALIM, M. H.: The HIV-1 Rev protein. In: *Annu.Rev.Microbiol.* 52 (1998), S. 491–532

- [84] POWERS, M. A. ; DASSO, M.: Nuclear transport erupts on the slopes of Mount Etna. In: *Nat.Cell Biol.* 6 (2004), Nr. 2, S. 82–86
- [85] PYHTILA, B. ; REXACH, M.: A gradient of affinity for the karyopherin Kap95p along the yeast nuclear pore complex. In: *J Biol.Chem.* 278 (2003), Nr. 43, S. 42699–42709
- [86] REICHEL, R. u. a.: Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. In: *J Cell Biol.* 110 (1990), Nr. 4, S. 883–894
- [87] RIBBECK, K. ; GORLICH, D.: Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. In: *EMBO J.* 20 (2001), Nr. 6, S. 1320–1330
- [88] RIBBECK, K. ; GORLICH, D.: The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. In: *EMBO J.* 21 (2002), Nr. 11, S. 2664–2671
- [89] RIDDICK, G. ; MACARA, I. G.: A systems analysis of importin-alpha-beta mediated nuclear protein import. In: *J Cell Biol.* 168 (2005), Nr. 7, S. 1027–1038
- [90] RIESS, K.: Plasmamodifizierung von Polyethylen. (2008)
- [91] ROCAK, S. ; LINDER, P.: DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. In: *Nat.Rev.Mol.Cell Biol.* 5 (2004), Nr. 3, S. 232–241
- [92] ROUT, M. P. ; AITCHISON, J. D. ; MAGNASCO, M. O. ; CHAIT, B. T.: Virtual gating and nuclear transport: the hole picture. In: *Trends Cell Biol.* 13 (2003), Nr. 12, S. 622–628
- [93] ROUT, M. P. ; BLOBEL, G.: Isolation of the yeast nuclear pore complex. In: *J Cell Biol.* 123 (1993), Nr. 4, S. 771–783
- [94] RYK, D. I. V. ; VENKATESAN, S.: Real-time kinetics of HIV-1 Rev-Rev response element interactions. Definition of minimal binding sites on RNA and protein and stoichiometric analysis. In: *J Biol.Chem.* 274 (1999), Nr. 25, S. 17452–17463
- [95] SANCHEZ, V. ; MAHR, J. A. ; ORAZIO, N. I. ; SPECTOR, D. H.: Nuclear export of the human cytomegalovirus tegument protein pp65 requires cyclin-dependent kinase activity and the Crm1 exporter. In: *J Virol.* 81 (2007), Nr. 21, S. 11730–11736
- [96] SCHMITT, C. u. a.: Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p. In: *EMBO J* 18 (1999), Nr. 15, S. 4332–4347
- [97] SCHWARTZ, T. U.: Modularity within the architecture of the nuclear pore complex. In: *Curr.Opin.Struct.Biol.* 15 (2005), Nr. 2, S. 221–226
- [98] SHAPIRO, D. J.: Quantitative ethanol precipitation of nanogram quantities of DNA and RNA. In: *Anal.Biochem.* 110 (1981), Nr. 1, S. 229–231

- [99] SIEBRASSE, J. P. ; COUTAVAS, E. ; PETERS, R.: Reconstitution of nuclear protein export in isolated nuclear envelopes. In: *J. Cell Biol.* 158 (2002), Nr. 5, S. 849–854
- [100] SIEBRASSE, J. P. ; PETERS, R.: Rapid translocation of NTF2 through the nuclear pore of isolated nuclei and nuclear envelopes. In: *EMBO Rep.* 3 (2002), Nr. 9, S. 887–892
- [101] SIGEL, E.: Use of *Xenopus* oocytes for the functional expression of plasma membrane proteins. In: *J Membr. Biol.* 117 (1990), Nr. 3, S. 201–221
- [102] SMITH, A. E. ; SLEPCHENKO, B. M. ; SCHAFF, J. C. ; LOEW, L. M. ; MACARA, I. G.: Systems analysis of Ran transport. In: *Science* 295 (2002), Nr. 5554, S. 488–491
- [103] SNAY-HODGE, C. A. ; COLOT, H. V. ; GOLDSTEIN, A. L. ; COLE, C. N.: Dbp5p/Rat8p is a yeast nuclear pore-associated DEAD-box protein essential for RNA export. In: *EMBO J* 17 (1998), Nr. 9, S. 2663–2676
- [104] STAGE-ZIMMERMANN, T. ; SCHMIDT, U. ; SILVER, P. A.: Factors affecting nuclear export of the 60S ribosomal subunit in vivo. In: *Mol. Biol. Cell* 11 (2000), Nr. 11, S. 3777–3789
- [105] STEWART, C. L. ; ROUX, K. J. ; BURKE, B.: Blurring the boundary: the nuclear envelope extends its reach. In: *Science* 318 (2007), Nr. 5855, S. 1408–1412
- [106] STOFFLER, D. u. a.: Cryo-electron tomography provides novel insights into nuclear pore architecture: implications for nucleocytoplasmic transport. In: *J Mol. Biol.* 328 (2003), Nr. 1, S. 119–130
- [107] STRAWN, L. A. ; SHEN, T. ; SHULGA, N. ; GOLDFARB, D. S. ; WENTE, S. R.: Minimal nuclear pore complexes define FG repeat domains essential for transport. In: *Nat. Cell Biol.* 6 (2004), Nr. 3, S. 197–206
- [108] SULTANA, R. ; BUTTERFIELD, D. A.: Alterations of some membrane transport proteins in Alzheimer's disease: role of amyloid beta-peptide. In: *Mol. Biosyst.* 4 (2008), Nr. 1, S. 36–41
- [109] SUN, C. ; YANG, W. ; TU, L. C. ; MUSSER, S. M.: Single-molecule measurements of importin alpha/cargo complex dissociation at the nuclear pore. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 105 (2008), Nr. 25, S. 8613–8618
- [110] SUNTHARALINGAM, M. ; WENTE, S. R.: Peering through the pore: nuclear pore complex structure, assembly, and function. In: *Dev. Cell* 4 (2003), Nr. 6, S. 775–789
- [111] SYDORSKYY, Y. u. a.: Intersection of the Kap123p-mediated nuclear import and ribosome export pathways. In: *Mol. Cell Biol.* 23 (2003), Nr. 6, S. 2042–2054
- [112] TSCHOCHNER, H. ; HURT, E.: Pre-ribosomes on the road from the nucleolus to the cytoplasm. In: *Trends Cell Biol.* 13 (2003), Nr. 5, S. 255–263

-
- [113] TSCHODRICH-ROTTER, M. ; PETERS, R.: An optical method for recording the activity of single transporters in membrane patches. In: *J Microsc.* 192 (1998), Nr. Pt 2, S. 114–125
- [114] TSENG, S. S. u. a.: Dbp5p, a cytosolic RNA helicase, is required for poly(A)+ RNA export. In: *EMBO J* 17 (1998), Nr. 9, S. 2651–2662
- [115] WOLFF, H. ; BRACK-WERNER, R. ; NEUMANN, M. ; WERNER, T. ; SCHNEIDER, R.: Integrated functional and bioinformatics approach for the identification and experimental verification of RNA signals: application to HIV-1 INS. In: *Nucleic Acids Res.* 31 (2003), Nr. 11, S. 2839–2851
- [116] XIAO, AJ ; BRUNNER, S ; WIELAND, M: Reactions of Surface Amines with Heterobifunctional Cross-Linkers Bearing Both Succinimidyl Ester and Maleimide for Grafting Biomolecules. In: *J.Phys.Chem.B* 108 (2004), S. 16508–16517
- [117] YANG, W. ; MUSSER, S. M.: Nuclear import time and transport efficiency depend on importin beta concentration. In: *J Cell Biol.* 174 (2006), Nr. 7, S. 951–961
- [118] YAO, W. u. a.: Nuclear export of ribosomal 60S subunits by the general mRNA export receptor Mex67-Mtr2. In: *Mol.Cell* 26 (2007), Nr. 1, S. 51–62
- [119] YEDAVALLI, V. S. ; NEUVEUT, C. ; CHI, Y. H. ; KLEIMAN, L. ; JEANG, K. T.: Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. In: *Cell* 119 (2004), Nr. 3, S. 381–392
- [120] ZEMP, I. ; KUTAY, U.: Nuclear export and cytoplasmic maturation of ribosomal subunits. In: *FEBS Lett.* 581 (2007), Nr. 15, S. 2783–2793
- [121] ZHANG, X. ; YAMADA, M. ; MABUCHI, N. ; SHIDA, H.: Cellular requirements for CRM1 import and export. In: *J Biochem.(Tokyo)* 134 (2003), Nr. 5, S. 759–764
- [122] ZILMAN, A. ; DI, Talia S. ; CHAIT, B. T. ; ROUT, M. P. ; MAGNASCO, M. O.: Efficiency, Selectivity, and Robustness of Nucleocytoplasmic Transport. In: *PLoS.Comput.Biol.* 3 (2007), Nr. 7, S. e125

Abbildungsverzeichnis

2.1. Schematischer Aufbau eines NPCs und Lokalisation der Nukleoporene . . .	6
2.2. Energetische Betrachtung der NPC Translokation	10
3.1. Reaktionsschema des nukleocytoplasmatischen Transports	16
4.1. Beispiele einer leucinreichen NES	24
4.2. Crm1 vermittelter Exportmechanismus	25
4.3. Funktionsbereiche in der Crm1 Aminosäuresequenz	26
4.4. Exportmechanismus der ribosomalen Vorstufen und deren Cofaktoren . . .	27
4.5. Strukturvergleich zwischen Arx1 und Methionin-Aminopeptidasen	29
4.6. Sekundärstruktur der RRE, 3D-Modell der Rev-RRE/HH-Bindung . . .	33
4.7. RRE-RNA Exportmechanismus bei HIV-1	34
8.1. Reduktion der Disulfidbrücken mit TCEP	56
8.2. Reaktion eines Farbstoff-Maleimids mit der Thiolgruppe eines Cysteins .	56
9.1. Ni^{2+} -Metallzentrum komplexiert mit NTA und Histidin	64
10.1. Reaktion eines primären Amines mit einer Succinimidylgruppe	70
10.2. Strukturformel von SMCC	70
10.3. Isolation gereinter <i>Xenopus laevis</i> Nuclei	71
11.1. Schematische Darstellung der TeflonAF TM Beschichtung	78
11.2. Punktverwaschungsfunktion	80
12.1. passive Diffusion von GFP ins Cytoplasma	87
12.2. passive Rückdiffusion von GFP in den Nukleus	89
12.3. Messgenauigkeit der Transporteranalyse	91
12.4. Vergleich unterschiedlicher Oberflächenbeschichtungen	94
12.5. Jahreszeitliche Variation der Membrandichtigkeit	95
12.6. Darstellung der Vertiefungen in TeflonAF TM und TeflonFEP	97
12.7. TeflonFEP und Polykarbonat TCs im Querschnitt (Fluoreszenzaufnahme)	97
13.1. Arx1-Export aus dem Nukleus	103
13.2. Arx1-Import in den Nukleus	107
14.1. Kontrolle der RRE-Sequenz mittels Sequenzalignment	112
14.2. Versuch der in vitro-Transkription von RRE-RNA	113
14.3. Synthetisch hergestelltes Cy3-RRE/HH-Fragment	114
14.4. Reinheitsprüfung von RevGFP-StrepTag und GFP-StrepTag	115
14.5. Nachweis der RevGFP-RRE Bindung mittels Gelshift-Assay	116

14.6. Nachweis der RevGFP Aggregatbildung	117
14.7. SDS-Acrylamidgel des aufgereinigten humanen Exportins Crm1	119
14.8. Wirkung der RanGTPase auf den Crm1 Export	122
14.9. Wirkung der RanGTPase auf den Crm1 Import	124
14.10.Wirkung der RanGTPase auf den Cy3-RRE Export	129
14.11.Wirkung der RanGTPase auf den Cy3-RRE Import	132
14.12Kontrolle der Spezifität des RRE-Exports	136

Tabellenverzeichnis

3.1. Typische Werte in der Transporteranalyse	21
7.1. Primer für die Sequenzierung von Plasmidinserts	50
7.2. Verwendete Bakterienstämme	51
7.3. Verwendete Plasmide	51
7.4. Plasmide für die <i>in vitro</i> -Transkription	53
8.1. Bradfordreaktion: Coomassie Brilliant Blue Reaktionsgleichgewicht . . .	55
8.2. Liste der hergestellten Fluoreszenzmarkierungen	57
8.3. Herstellung der Polyacrylamidlösungen für SDS-PAGE	59
8.4. Herstellung der Polyacrylamidlösungen für native PAGE	60
9.1. In dieser Arbeit verwendete Proteine und deren Molekulargewichte	63
10.1. Inerte Fluoreszenz-markierte Substrate als Dichtigkeitskontrolle	73
11.1. Liste der Materialien zur Herstellung neuer OSTR-Messarrays	77
12.1. Materialabhängiges Auflösungsvermögen eines CLSMs	99
13.1. Vergleich des Arx1-Exports mit Sequenz-und Funktionshomologen	105
13.2. Vergleich der Ergebnisse für Import und Export von Arx1	108
14.1. Ergebnisse des Crm1 Transports	126
14.2. Ergebnisse des Cy3-RRE und RevGFP-Exports	134

Curriculum Vitae

Viola Maria Baumgärtel
Bentelerstraße 37
49149 Münster

geboren am 15.07.1977 in Schwabach (Bayern)

Schulbildung

09/1988–06/1997 Wolfram-von-Eschenbach-Gymnasium, Schwabach
06/1997 Allgemeine Hochschulreife

Studium

10/1997–10/2002 Studium der Biochemie (Diplom) an der Universität Bielefeld
11/1999 Diplom-Vorprüfung
11/2002–07/2003 Diplomarbeit in Biochemie im Institut für Biophysik und Angewandte Nanowissenschaften der Universität Bielefeld
Prof. Dr. Dario Anselmetti
Thema: Charakterisierung der Bindung von ATP an ExoP aus *Sinorhizobium meliloti* mittels FCS

Berufstätigkeit

05/2004–07/2004 Anstellung am NMI, Reutlingen

Promotionsstudium

seit 01/2005 Dissertation am Institut für Medizinische Physik der Westfälischen-Wilhelms Universität Münster (WWU)
Prof. Dr. Reiner Peters, Prof'in. Dr. Monika Schönhoff
03/2007–08/2008 Promotionsstipendium der WWU