

**Der Kerntransport-Rezeptor Xpo1
ist beteiligt an der Spindelbildung
in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae***

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

ANJA NEUBER
aus Berlin

Juni 2008

1. Gutachter: Thomas Blankenstein
2. Gutachter: Udo Heinemann

Disputation am 22.10.2008

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	6
Abstract	7
1. Einleitung	8
1.1 Kerntransport	8
1.1.1 Bedeutung des Kerntransports	8
1.1.2 Die lösliche Phase: Transport-Rezeptoren	8
1.1.3 Die stationäre Phase: Nukleoporine	13
1.1.4 Ran-Gradient und Energiebedarf	14
1.1.5 Import- und Exportsignale	16
1.2 Weitere Funktionen der Kerntransport-Maschinerie	17
1.2.1 Einfluss von Ran-GTP auf die Mikrotubuli	17
1.2.2 Einfluss von Crm1 auf die Centrosomen	18
1.3 Der Spindelpolkörper	19
1.3.1 Generelle Struktur des Spindelpolkörpers	19
1.3.2 γ -Tubulin-Komplex-bindende Proteine: Spc110 und Spc72	21
1.4 Ziele der Arbeit	23
2. Ergebnisse	24
2.1 Charakterisierung von Xpo1-Mutanten	24
2.1.1 Übersicht über die Mutanten	24
2.1.2 Wachstum und Zellzyklus	25
2.1.3 Protein- und mRNA-Export	27
2.2 Suche nach neuen Interaktionspartnern von Xpo1	29
2.2.1 Ungerichtete 2-Hybrid-Analyse	29
2.2.2 Lokalisation der putativen Interaktionspartner	30
2.2.3 Gerichtete 2-Hybrid-Analyse	31
2.3 Lokalisation von Xpo1	32
2.3.1 Lokalisation von Xpo1-GFP und anderen Transport-Komponenten	32
2.3.2 Immuno-Elektronenmikroskopie und Immuno-Fluoreszenz von Xpo1	33
2.3.3 Co-Lokalisation von Xpo1-YFP und Spc29-CFP	35
2.3.4 Co-Fraktionierung von Xpo1 und Spc110 im Sucrose-Gradienten	37
2.3.5 Lokalisation von Xpo1-GFP im <i>SPC72</i> -Deletionsstamm	38
2.3.6 Einfluss von Ran auf die Lokalisation von Xpo1	39

2.4 Spc72 in der <i>in-vitro</i>-Bindungsanalyse	40
2.4.1 Reinigungsbeispiel und Test der Bindungsanalyse.....	40
2.4.2 Analyse von Spc72 ⁴³³	41
2.4.3 Analyse N-terminaler Fragmente von Spc72 ⁴³³	42
2.4.4 Vergleich von Spc72 ⁴³³ und Gesamtlänge-Spc72	44
2.5 Untersuchung von Spc72 als Xpo1-Substrat <i>in vivo</i>	45
2.5.1 2-Hybrid-Analyse von Spc72 und spc72-NES*	45
2.5.2 Überexpression von Spc72-GFP	46
2.5.3 Reporter-Plasmid-Analyse der NES von Spc72	47
2.5.4 Reporter-Plasmid-Analyse eines C-terminalen Fragments von Spc72.....	48
2.5.5 Überexpression eines N-terminalen Fragments von Spc72-GFP	48
2.5.6 Lokalisation von spc72-NES*-GFP.....	50
2.5.7 Zytoplasmatische Mikrotubuli in spc72-NES*	52
2.5.8 Zytoplasmatische Mikrotubuli in Xpo1-Mutanten	53
3. Diskussion	55
3.1 Die Gesamtstruktur von Xpo1 trägt zur Exportfunktion bei	55
3.2 Die 2-Hybrid-Analyse findet neue Interaktionspartner von Xpo1	56
3.3 Xpo1 lokalisiert am Spindelpolkörper	58
3.4 Xpo1 wechselwirkt mit Spc72	60
3.4.1 Identifikation der NES von Spc72	60
3.4.2 Bedeutung der Spc72-NES <i>in vivo</i>	62
3.5 Funktion von Xpo1 in der Spindel-Bildung	62
3.6 Offene Fragen	64
4. Material und Methoden	65
4.1 Verwendete Hefestämme und ihre Erzeugung	65
4.2 Verwendete Plasmide und ihre Herstellung	68
4.3 Grundlegende Methoden	71
4.3.1 Anzucht von Hefen	71
4.3.2 Sporulation und Tetradenanalyse.....	71
4.3.3 Tüpfeltest zur Analyse des Zellwachstums.....	72
4.3.4 Immunoblotten	72
4.3.5 Mikroskopie	72

4.4 Methoden zur Charakterisierung der Xpo1-Mutanten	73
4.4.1 Degradations-Analyse.....	73
4.4.2 Zellzyklus-Analyse	73
4.4.3 Untersuchung des Protein-Exports	73
4.4.4 Untersuchung des mRNA-Exports	73
4.5 Untersuchung der 2-Hybrid-Interaktionen	75
4.5.1 Ungerichtete und gerichtete 2-Hybrid-Analyse.....	75
4.5.2 Leptomycin B-Test zur Lokalisation der putativen NES-Substrate	75
4.6 Methoden zur Untersuchung der Lokalisation von Xpo1	76
4.6.1 Immuno-Fluoreszenz von Xpo1 und xpo1-1	76
4.6.2 Einfluss von Nocodazol	77
4.6.3 Co-Fraktionierung von Xpo1 und Spc110 im Sucrose-Gradienten.....	77
4.6.4 Überexpression von Ran.....	78
4.7 Methoden zur <i>in vitro</i>-Bindungsanalyse	78
4.7.1 Anzucht von Bakterien	78
4.7.2 Rekombinante Expression und Reinigung His-markierter Proteine.....	78
4.7.3 Rekombinante Expression und Reinigung GST-markierter Proteine.....	80
4.7.4 <i>In vitro</i> -Bindungsanalyse.....	81
4.8 Methoden zur Charakterisierung der Spc72-Xpo1-Interaktion	82
4.8.1 Überexpression von Spc72 durch MET3.....	82
4.8.2 Analysen mit NES-NLS-Reporter-Plasmid	82
4.8.4 Vergleich der Expression von Spc72-GFP und spc72-NES*-GFP	82
4.8.5 Quantifizierung der SPB-Signale.....	83
4.8.6 Vergleich der zytoplasmatischen Mikrotubuli.....	83
5. Literaturverzeichnis	84
6. Anhang	97
6.1 Abkürzungen	97
6.2 Übersicht der orthologen Proteine	98
6.3 Veröffentlichungen	99
6.4 Danksagung	99

Zusammenfassung

Xpo1 ist das Ortholog des Kerntransport-Rezeptors Crm1 in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. In höheren Eukaryoten exportiert Crm1 Proteine wie den Transkriptions-Faktor AP-1 und den Tumor-Suppressor p53 aus dem Zellkern ins Zytoplasma. Eine Rolle von Crm1 im Export von messenger-RNA wird gegenwärtig kontrovers diskutiert. Dagegen ist Xpo1 in der Bäckerhefe sowohl am Protein- wie auch am mRNA-Export beteiligt. Trotz der essentiellen Funktion von Xpo1 konnten erst wenige Transport-Substrate identifiziert werden. Xpo1 bindet im Kern kooperativ an Frachtmoleküle, die eine Kernexportsequenz (nuclear export sequences, NES) besitzen, und an die GTPase Ran/Gsp1, die im Kern in GTP-beladener Form vorliegt. Nach der Passage durch die Kernpore lösen im Zytoplasma lokalisierte Faktoren die Hydrolyse von Ran-GTP zu Ran-GDP aus. Dies bewirkt eine Konformationsänderung in Xpo1 und führt zur Freisetzung des Frachtmoleküls. Unbeladenes Xpo1 kehrt in den Kern zurück.

Kerntransport-Rezeptoren und Ran spielen auch eine Rolle in der Bildung einer bipolaren Spindel: in höheren Eukaryoten ist Crm1 an der Kontrolle der Centrosomen-Verdopplung beteiligt, und die Lokalisation von Ran-GTP an den Chromosomen fördert die Bildung der Kernspindel.

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst versucht, die Bedeutung der verschiedenen Domänen von Xpo1 im Protein- und mRNA-Export zu klären. Dazu wurden mehrere Mutationen in *XPO1* eingefügt. Die entstandenen *xpo1*-Allele verursachten unterschiedlich starke Defekte im Protein- und mRNA-Export. Ein eindeutiger Zusammenhang zwischen den beobachteten Defekten und den Änderungen in der Proteinsequenz war jedoch nicht festzustellen.

Zur Identifikation neuer Interaktionspartner von Xpo1 wurde eine ungerichtete 2-Hybrid-Analyse durchgeführt, in der u.a. das Spindelpolkörper-Protein Spc72 gefunden wurde. Der Spindelpolkörper ist das funktionelle Äquivalent der Centrosomen höherer Eukaryoten. Spc72 verankert an der zytoplasmatischen Seite den γ -Tubulin-Komplex, von dem die Mikrotubuli polymerisieren. In Analogie zur Bindung von Crm1 an die Centrosomen wurde auch in der Bäckerhefe eine Lokalisation von Xpo1 an den Spindelpolkörpern nachgewiesen. Sie kann durch Änderung des Ran-Staus der Zelle beeinflusst werden. Sie ist jedoch nicht nur von Spc72 abhängig, da sich auch in einem *SPC72*-Deletionsstamm Xpo1 an den Spindelpolkörpern befindet.

Durch *in vitro*-Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass Xpo1, Spc72 und Ran-GTP einen trimeren Komplex bilden, der die Kriterien eines Export-Komplexes erfüllt. Eine NES in Spc72 wurde identifiziert und ihre Funktion in einer 2-Hybrid-Analyse und in Reporter-Plasmid-Analysen bestätigt.

Die Mutation der NES von Spc72 führt in der Zelle zu einer Verringerung der Spc72-Menge an den Spindelpolkörpern. Dies verursacht eine Reduktion der zytoplasmatischen Mikrotubuli. Dieser Phänotyp wurde auch in *xpo1*-Allelen gefunden. Damit konnten erste Hinweise auf eine funktionelle Wechselwirkung zwischen Xpo1 und Spc72, die von der NES in Spc72 abhängt, geliefert werden. Darüber hinaus zeigt diese Arbeit zum ersten Mal eine Lokalisation von Xpo1 am Spindelpolkörper in der Bäckerhefe. Xpo1 könnte an Prozessen wie der Spindelpolkörper-Verdopplung, der Regulation der Mikrotubuli-Polymerisation oder der Verteilung des γ -Tubulin-Komplexes beteiligt sein.

Abstract

Xpo1 is the orthologue of the nuclear transport receptor Crm1 in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. In higher eukaryotes, Crm1 exports proteins such as the transcription factor AP-1 or the tumor suppressor p53 from the nucleus to the cytoplasm. A role of Crm1 in messenger RNA export is discussed controversially. In contrast, Xpo1 is involved in protein and mRNA export in the budding yeast. Despite Xpo1's essential function, only few transport substrates have been identified so far.

Xpo1 binds in the nucleus cooperatively to cargo molecules containing a nuclear export sequence (NES) and to the GTPase Ran/Gsp1, which exists in the nucleus in its GTP-bound form. After passage through the nuclear pore, factors localized in the cytoplasm trigger the hydrolysis of Ran-GTP to Ran-GDP. This causes a conformational change in Xpo1 which leads to cargo release. Unloaded Xpo1 travels back into the nucleus.

Nuclear transport receptors and Ran also play a role in the formation of a bipolar spindle: in higher eukaryotes, Crm1 is involved in the control of centrosome duplication, and the localization of Ran-GTP at the chromosomes promotes the formation of the nuclear spindle.

In the present work, at first the importance of the different Xpo1 domains in protein and mRNA export was analyzed by introducing several mutations in the *XPO1* coding region. The resulting *xpo1* alleles showed various defects in protein and mRNA export, but a clear correlation between the observed defects and the alterations in the protein sequence was not obvious.

To identify new proteins interacting with Xpo1, an undirected 2-hybrid assay was performed. Among other proteins Spc72 was found, a component of the spindle pole body, the functional equivalent of the centrosomes in the budding yeast. Spc72 anchors the γ -tubulin complex from which microtubules polymerize at the cytosolic face of the spindle pole body. By analogy of Crm1 binding to centrosomes in mammalian cells, the localization of Xpo1 was determined. Also in the budding yeast, Xpo1 can be found at the spindle pole bodies, and this localization can be affected by changing the Ran status of the cell. However, Xpo1's localization is not solely dependent on Spc72 as it still binds to the spindle pole bodies in a *SPC72* deletion strain.

The interaction of Xpo1 with Spc72 was analyzed further by *in vitro* binding assays.

Xpo1, Spc72, and Ran-GTP form a trimeric complex that fulfills the criteria of a nuclear export complex. A NES could be identified in Spc72 and its function was confirmed by a 2-hybrid assay and reporter plasmid assays.

Mutations in this NES decrease the amount of Spc72 at the spindle pole bodies in the cell and cause a reduction of cytoplasmic microtubules. This phenotype was also observed in Xpo1 alleles.

This work shows first hints to a functional interaction between Xpo1 and Spc72 in the cell that is dependent on the NES of Spc72. Moreover, a localization of Xpo1 at the spindle pole bodies in the budding yeast was proved for the first time. Xpo1 could participate in processes such as spindle pole body duplication, regulation of microtubule polymerisation or distribution of the γ -tubulin complex.

1. Einleitung

1.1 Kerntransport

1.1.1 Bedeutung des Kerntransports

In eukaryotischen Zellen schirmt die Kernmembran das genetische Material vom Zytoplasma ab. Die räumliche Trennung von Nukleoplasma und Zytoplasma trägt zur genetischen Stabilität bei und ermöglicht es, größere Mengen genetischer Information als Prokaryoten zu handhaben. Außerdem ergeben sich zusätzliche Regulationsmöglichkeiten durch die Kontrolle des Zugangs von Transkriptionsfaktoren zum Chromatin, und die Separation des Spleißens von der Translation schützt vor der Entstehung fehlerhafter Proteine (Weis 2003, Görlich & Kutay 1999).

Eine Vielzahl von Molekülen muss zwischen Zellkern und Zytoplasma ausgetauscht werden. Transkriptionsfaktoren pendeln zwischen Kern und Zytoplasma, nukleäre Proteine wie Histone, DNA- und RNA-Polymerasen und ribosomale Proteine werden in den Kern importiert, während transfer- und messenger-RNA mit ihren assoziierten Proteinen sowie ribosomale Untereinheiten ins Zytoplasma exportiert werden (Görlich & Kutay 1999). Es wurde geschätzt, dass (bezogen auf ein 100 kDa-Protein) durch eine Kernpore etwa 800 Transport-Ereignisse pro Sekunde stattfinden (Ribbeck & Görlich 2001).

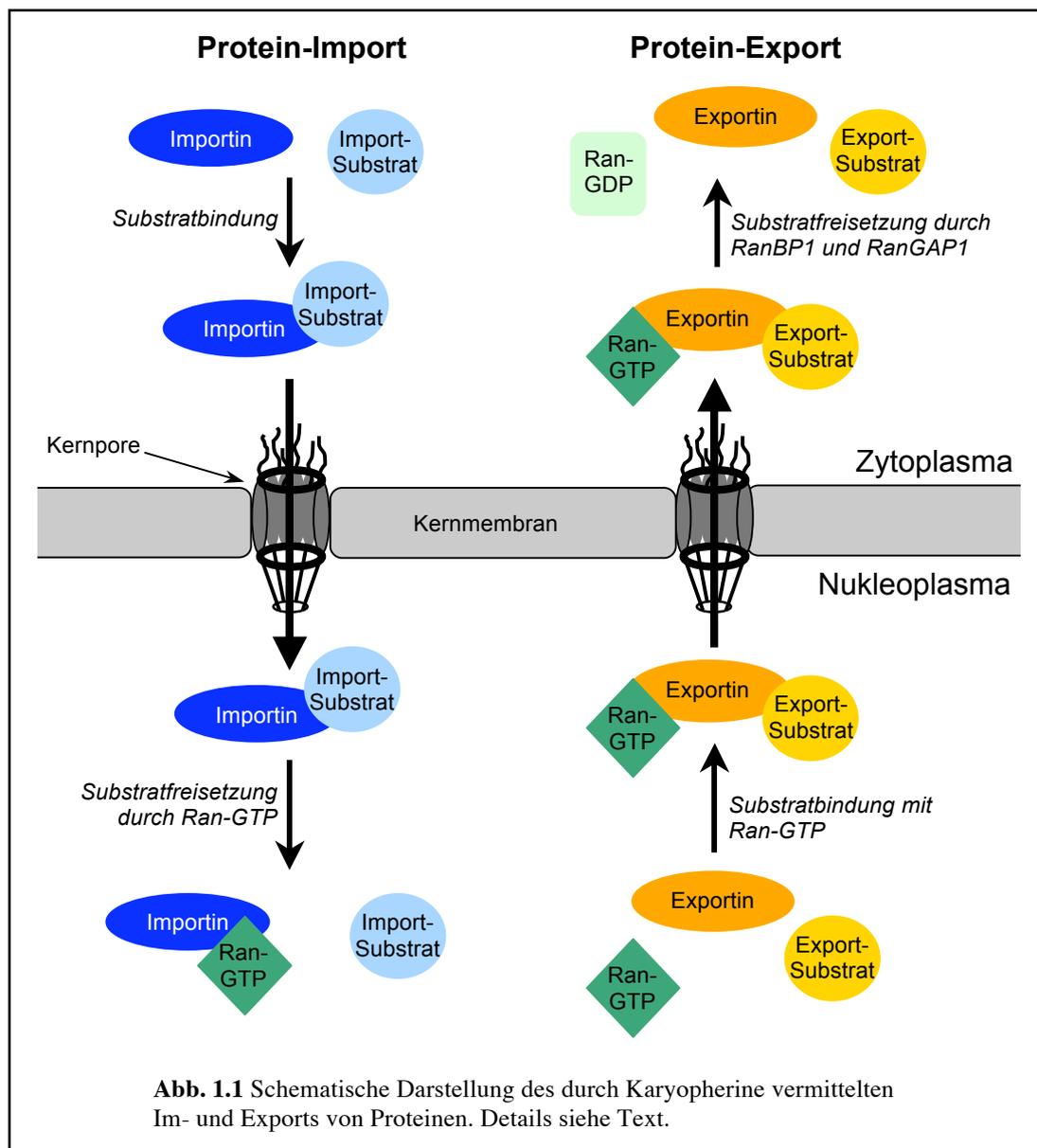
Die Lipid-Doppelmembran des Kerns wird von Kernporen-Komplexen durchbrochen. Durch sie findet jeglicher Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma statt (Dwo-retzky & Feldherr 1988, Feldherr 1962, Richardson et al. 1988). Dabei können Ionen, kleine Moleküle und Proteine bis zu etwa 50 kDa frei equilibrieren (Newmeyer 1993, Kaffman & O'Shea 1999), während größere Proteine, RNAs und Ribonukleoproteine zur Überwindung der Kernmembran eine umfangreiche Maschinerie benötigen (Mattaj & Englmeier 1998, Görlich & Kutay 1999, Rout & Aitchinson 2001, Vasu & Forbes 2001, Paine et al. 1975). Sie setzt sich zusammen aus einer löslichen Phase, den Transport-Rezeptoren, und einer stationären Phase, den Kernporen-Komplexen. Transportsignale und der so genannte Ran-Gradient regulieren den Proteintransport.

1.1.2 Die lösliche Phase: Transport-Rezeptoren

Alle Transportereignisse werden durch lösliche Transport-Rezeptoren vermittelt, die spezifisch ihre Fracht erkennen und die Passage durch die Kernpore erleichtern. Dabei bedingt die Vielzahl von Transport-Substraten eine Vielfalt von Transport-Rezeptoren. Die größte und am besten untersuchte Klasse von Transport-Rezeptoren ist die der Karyopherine, die auch als Importine und Exportine bezeichnet werden, und die den Transport der meisten Proteine, ribosomalen Untereinheiten und einiger RNAs vermitteln. Sie sind gekennzeichnet durch eine N-terminale Ran-GTP-Bindungsdomäne, ein Molekulargewicht von 90–150 kDa und einen sauren isoelektrischen Punkt. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden bisher 14 Karyopherine gefunden, in Menschen über 20. Ausgangs- und Zielkompartimente der Karyopherine werden durch

die unterschiedlichen Nukleotid-Beladungszustände der kleinen GTPase Ran (Gsp1, Gsp2 in Hefe; Belhumeur et al. 1993) definiert. Sie liegt im Kern hauptsächlich gebunden an Guanosin-Triphosphat (GTP), im Zytoplasma hauptsächlich gebunden an Guanosin-Diphosphat (GDP) vor (Weis 2003, Görlich & Kutay 1999).

Importine binden ihre Fracht – direkt oder über Adapter-Proteine – im Zytoplasma, docken an die Kernpore und durchqueren sie (Abb. 1.1). Im Zellkern stoßen sie auf Ran-GTP, und dessen Bindung verdrängt das Frachtmolekül, das im Kern frei wird. Der Importin-Ran-GTP-Komplex gelangt zurück ins Zytoplasma, wo Ran-GTP zu Ran-GDP hydrolysiert wird. Durch die damit verbundene Konformationsänderung lösen sich Importin und Ran voneinander, und ein weiterer Import-Zyklus kann beginnen.



Exportine hingegen binden ihre Fracht im Kern kooperativ mit Ran-GTP. Der trimere Komplex aus Exportin, Fracht und Ran-GTP wechselwirkt mit der Kernpore und durchquert sie. Die Hydrolyse von Ran-GTP im Zytoplasma, die durch RanBP1 und Ran-

GAP1 aktiviert wird, löst eine Konformationsänderung aus, die die Freisetzung der Fracht vom Export-Komplex bewirkt. Unbeladene Exportine gelangen zurück in den Zellkern und stehen für weitere Export-Zyklen zur Verfügung.

Jedes Transportereignis befördert so ein Molekül Ran-GTP vom Zellkern ins Zytoplasma, wo es zu Ran-GDP hydrolysiert wird. Der Transport-Rezeptor NTF2 (nuclear transport factor 2), der nicht zu den Karyopherinen gehört, importiert ausschließlich Ran-GDP in den Zellkern (Corbett & Silver 1996, Ribbeck et al. 1998), wo es durch dort gebundene Faktoren in Ran-GTP umgewandelt wird.

1.1.2.1 Import durch den Importin α/β -Dimer

Eines der am besten charakterisierten Importine ist der Importin α/β -Dimer (Adam & Adam 1994, Görlich et al. 1995, Görlich et al. 1994). Importin α besitzt zwei funktionelle Domänen: eine Bindestelle für Frachtmoleküle im C-terminalen Bereich (Conti et al. 1998) und eine Importin β -bindende Domäne im N-terminalen Bereich (Görlich et al. 1996a, Weis et al. 1996), so dass es als Adapter-Protein das Frachtmolekül mit Importin β verbindet. Srp1 ist das einzige Importin α in *S. cerevisiae* (Enekel et al. 1995), in Vertebraten gibt es mehrere Importin α -Proteine, die sich in Substratspezifität und Expressionsmuster unterscheiden (Köhler et al. 1999, Friedrich et al. 2006).

Importin β als eigentlicher Transport-Rezeptor vermittelt die Wechselwirkung mit der Kernpore und ermöglicht die Translokation in den Kern (Görlich & Kutay 1999). Importin β besitzt eine Ran-GTP-bindende Domäne im N-terminalen und eine Importin α -bindende Domäne im C-terminalen Bereich (Vetter et al. 1999, Cingolani et al. 1999). Im Kern stößt der trimere Komplex aus Frachtmolekül, Importin α und Importin β auf Ran-GTP. Die Bindung von Ran-GTP an Importin β ist mit einer Konformationsänderung in Importin β verbunden, so dass Ran-GTP den Importin α -Substrat-Komplex verdrängt (Chi et al. 1996, Görlich et al. 1996b, Rexach & Blobel 1995). Ran-GTP-gebundenes Importin β verlässt den Kern wieder (Hieda et al. 1999, Izaurralde et al. 1997); im Zytoplasma wird Ran-GTP zu Ran-GDP hydrolysiert und löst sich von Importin β . Importin α wird durch das Exportin CAS zurück ins Zytoplasma transportiert (Gilchrist et al. 2002, Kutay et al. 1997). In *S. cerevisiae* wurde Cse1 (chromosome segregation 1) als CAS-Orthologes identifiziert (Solsbacher et al. 1998, Künzler & Hurt 1998, Hood & Silver 1998).

Importin β kann Frachtmoleküle auch ohne Importin α als Adapter binden und in den Kern importieren. Beispiele dafür sind das Rev- und das Tat-Protein des HI-Virus (Truant & Cullen 1999) und die ribosomalen Proteine L23a, S7 und L5 (Jäckel & Görlich 1998). In höheren Eukaryoten interagiert Importin β zusätzlich mit weiteren Importfaktoren außer Importin α und erweitert so sein Substratspektrum (Görlich & Kutay 1999).

1.1.2.2 Export durch Crm1 / Xpo1

CRM1 (chromosome region maintenance 1) ist ein essentielles Gen, das zuerst in der Spaltheefe *Schizosaccharomyces pombe* gefunden wurde. Mutationen in *CRM1* führen hier zu deformierten Chromosomen-Domänen und verringerter DNA-, RNA- und Protein-Synthese bei restriktiver Temperatur (Adachi & Yanagida 1989).

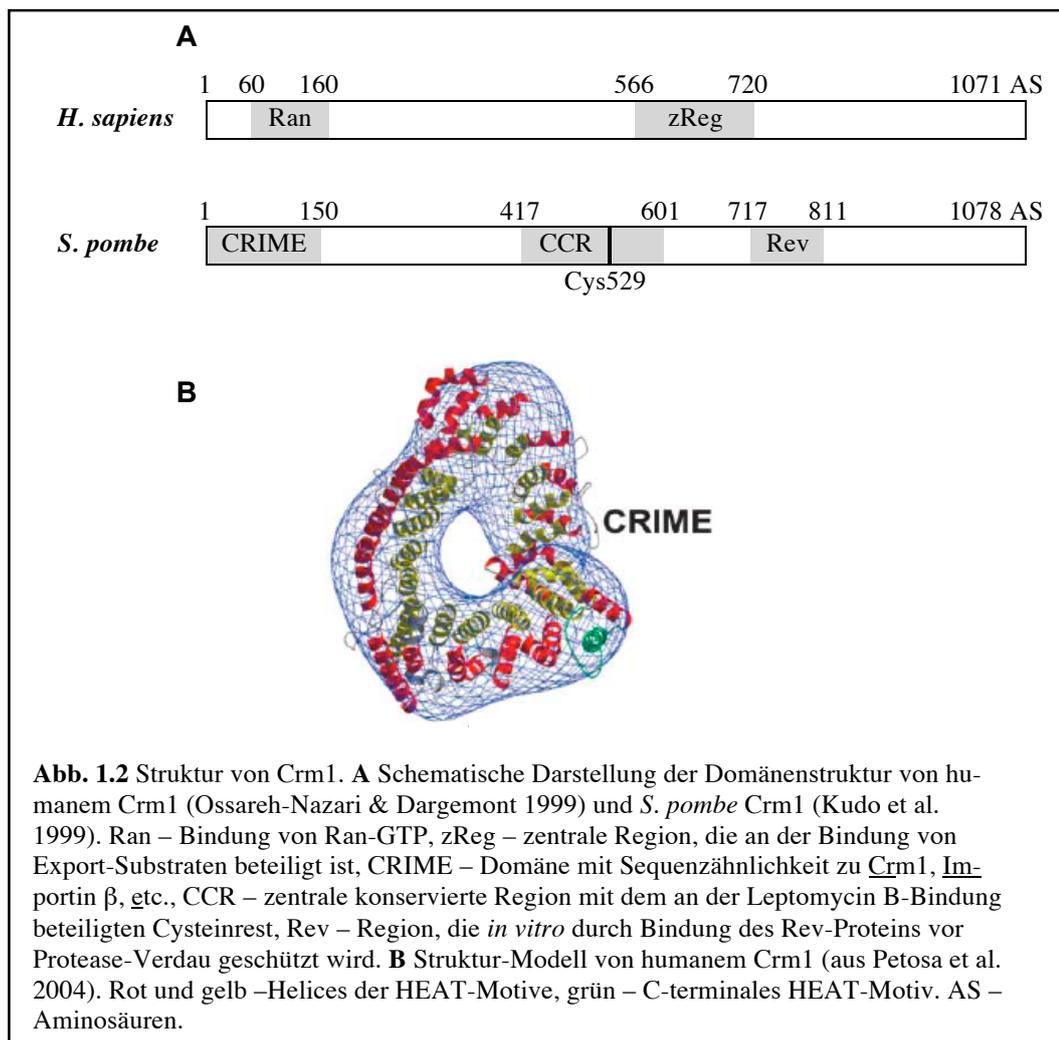
Das Zytotoxin Leptomycin B bindet kovalent und spezifisch an einen Cysteinrest von Crm1 in *S. pombe* und humanen Zellen und blockiert seine Funktion (Nishi et al. 1994, Kudo et al. 1998, Neville & Rosbash 1999). Im Crm1-Ortholog von *S. cerevisiae*, Xpo1 (Exportin 1), findet sich an dieser Stelle ein Threoninrest, so dass Leptomycin B hier keine Wirkung zeigt (Hamamoto et al. 1985, Fornerod et al. 1997).

Leptomycin B verursacht eine Akkumulation des HI-Virus-Proteins Rev im Kern (Wolff et al. 1997). Weitere Experimente in Hefe und *Xenopus*-Oozyten konnten zeigen, dass Crm1/Xpo1 ein Exportin ist (Fornerod et al. 1997, Fukuda et al. 1997, Stade et al. 1997, Ossareh-Nazari et al. 1997). Beispiele für Crm1-Frachtmoleküle sind der Transkriptionsfaktor AP-1 (Kuge et al. 1998, Yan et al. 1998), der Tumor-Suppressor p53 (Freedman & Levine 1998), RanGAP1 und RanBP1 (Feng et al. 1999, Richards et al. 1996). Außerdem ist Crm1/Xpo1 beteiligt am Export von kleinen nukleären RNAs (snRNAs) und ribosomaler RNA (rRNA). Adapter-Proteine vermitteln hier die Bindung des Exportins an die RNA (Rodriguez et al. 2004, Köhler & Hurt 2007).

Die Rolle von Crm1 im mRNA-Export wird in der Literatur kontrovers diskutiert (Lei & Silver 2002). Ungespleißte virale RNA wird über Adapter-Proteine durch Crm1 exportiert, und Leptomycin B führt zu einer Anreicherung dieser RNAs im Kern (Wolff et al. 1997). Der Export zellulärer mRNA wird jedoch nicht durch Leptomycin B blockiert (Fornerod et al. 1997) und ist hauptsächlich von Transport-Rezeptoren abhängig, die nicht zur Klasse der Karyopherine gehören (Lei & Silver 2002, Köhler & Hurt 2007). Neuere Daten weisen jedoch auf eine Beteiligung von Crm1 am Export spezifischer zellulärer mRNA hin (Gallouzi & Steitz 2001, Kimura et al. 2004). In der Hefe *S. cerevisiae* muss Xpo1 dagegen generell am Export von mRNA beteiligt sein, da diese in der temperatursensitiven *xpo1-1*-Mutante im Kern akkumuliert (Stade et al. 1997). Obwohl Xpo1 eines der vier essentiellen Karyopherine der Hefe ist (Görlich & Kutay 1999), konnten in diesem Organismus erst wenige Transport-Substrate identifiziert werden.

Im N-terminalen Bereich zeigt Crm1 Sequenzähnlichkeit mit Importin β und anderen Karyopherinen (Abb. 1.2). Diese als CRIME-Domäne (Crm1, Importin β , etc.) bezeichnete Region ist an der Bindung von Ran-GTP beteiligt (Kudo et al. 1999, Ossareh-Nazari & Dargemont 1999). Eine zentrale Region (CCR, central conserved region) ist zwischen Crm1-Orthologen verschiedener Spezies einschließlich *S. cerevisiae* konserviert (Kudo et al. 1999). Hier befindet sich auch der zur Leptomycin B-Bindung erforderliche Cysteinrest. An der Bindung von Transport-Substraten ist in humanem Crm1 eine zentrale Region (zReg) beteiligt (Ossareh-Nazari & Dargemont 1999). In *in vitro*-Versuchen konnte gezeigt werden, dass eine C-terminale Sequenz (Rev) von *S. pombe* Crm1 an der Bindung des Export-Substrats Rev beteiligt ist (Kudo et al. 1999).

Im Kern bindet Xpo1 an Substrate und Ran-GTP. Beide Liganden stabilisieren dieselbe Xpo1-Konformation, wobei die Bindung des Substrats die Affinität von Xpo1 für Ran-GTP um bis zu drei Größenordnungen erhöht und andersherum (Görlich & Kutay 1999). Bei der Passage durch die Kernpore wechselwirkt Xpo1 u.a. mit den Kernporeproteinen Nup42 und Nup49 (Neville et al. 1997, Floer & Blobel 1999, Fornerod et al. 1997). Im Zytoplasma erfolgt die Hydrolyse von Ran-GTP zu Ran-GDP durch RanBP1 / RanGAP1 und der trimere Komplex zerfällt. Ran-GDP wird aktiv in den Kern transportiert und dort GTP-beladen, freies Xpo1 gelangt zurück in den Kern und steht für einen weiteren Export zur Verfügung.



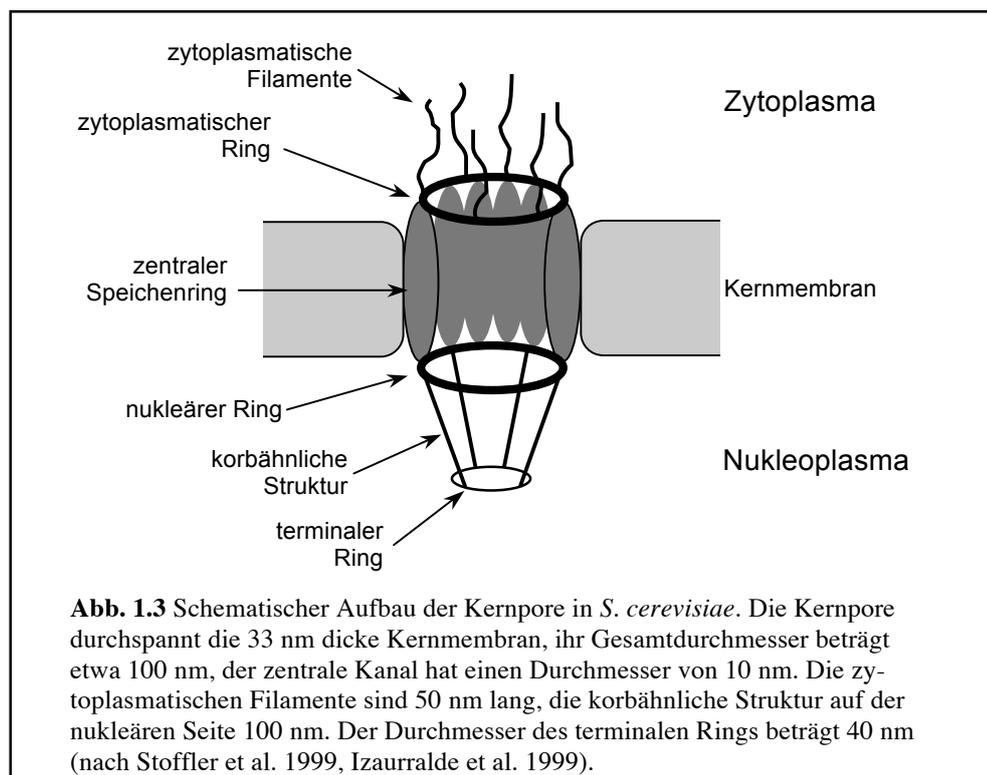
Ein neueres Struktur-Modell von humanem Crm1 wurde basierend auf einer Kristallstruktur des C-terminalen Drittels, Homologie-Modellen des N-terminalen und mittleren Drittels und einer EM-Rekonstruktion des gesamten Proteins erstellt (Petosa et al. 2004). Crm1 ist demnach wie Importin β aus hintereinander geschalteten HEAT-Wiederholungen aufgebaut. Das HEAT-Motiv besteht aus Tandem-Wiederholungen einer etwa 50 Aminosäuren umfassenden Sequenz, die zwei antiparallele Helices formt. In diesem Modell bilden Aminosäuren 385–450 eine flexible, hydrophobe Schleife, die an der kooperativen Bindung von Ran und Fracht beteiligt ist. Diese Schleife maskiert die Fracht-Bindestelle und verhindert eine stabile Ran-GTP-Bindung. Wird Ran-GTP gebunden, ändert die Schleife ihre Konformation und exponiert die Fracht-Bindestelle; wird ein Fracht-Molekül gebunden, erlaubt die Konformationsänderung der Schleife eine stabile Ran-GTP-Bindung. Im Zytoplasma führt die GTP-Hydrolyse zur Freisetzung von Ran, so dass die Schleife erneut ihre Konformation ändert und die Fracht freigesetzt wird (Petosa et al. 2004).

Am Xpo1-abhängigen Proteinexport ist auch das Ran-bindende Protein Yrb2 beteiligt (Noguchi et al. 1999, Taura et al. 1998). Es besitzt eine zu RanBP1/Yrb1 ähnliche Do-

mäne, befindet sich aber im Gegensatz zu diesem im Kern und bindet Ran-GTP nur sehr schwach. *YRB2* ist nicht essentiell, aber Deletionsmutanten sind kältesensitiv und zeigen Export-Defekte (Taura et al. 1998). Als humanes Ortholog von Yrb2 wurde RanBP3 identifiziert (Mueller et al. 1998). RanBP3 bindet direkt an Crm1, erhöht dessen Affinität für Ran-GTP und Substrat und stimuliert den Crm1-abhängigen Export in permeabilisierten Zellen (Englmeier et al. 2001, Lindsay et al. 2001).

1.1.3 Die stationäre Phase: Nukleoporine

Jeglicher Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma findet durch die Kernporen statt. Sie erlauben den Transport in beide Richtungen, ohne dass es zu einer Entfaltung der durchquerenden Proteine kommt, wie sie beim Transport in die Mitochondrien und dem Endoplasmatischen Retikulum auftritt (Weis 2003, Görlich & Kutay 1999). Die Kernpore durchspannt die Lipid-Doppelmembran des Kerns und ist mit etwa 66 MDa in Hefe und etwa 125 MDa in Vertebraten eine der größten makromolekularen Strukturen in der eukaryotischen Zelle (Weis 2003, Görlich & Kutay 1999). Trotz des Größenunterschieds ist die Gesamt-Architektur gut konserviert (Abb. 1.3): ein zentraler Speichenring mit achtfacher Symmetrie bildet den Kanal. Von jeder Speiche ragen flexible Filamente ins Zytoplasma, auf der nukleären Seite fasst der terminale Ring acht Filamente zu einer korbähnlichen Struktur zusammen (Izaurralde et al. 1999, Stoffler et al. 1999).



Die biochemische und genetische Analyse der Bestandteile der Kernpore (Rout & Aitchison 2000, Vasu & Forbes 2001) und die proteomische Analyse von Kernporen aus Hefe (Rout et al. 2000) und Säugetier-Zellen (Cronshaw et al. 2002) ergab, dass diese

aus nur etwa 30 verschiedene Proteinen, den Nukleoporinen, in hoher Kopienzahl bestehen.

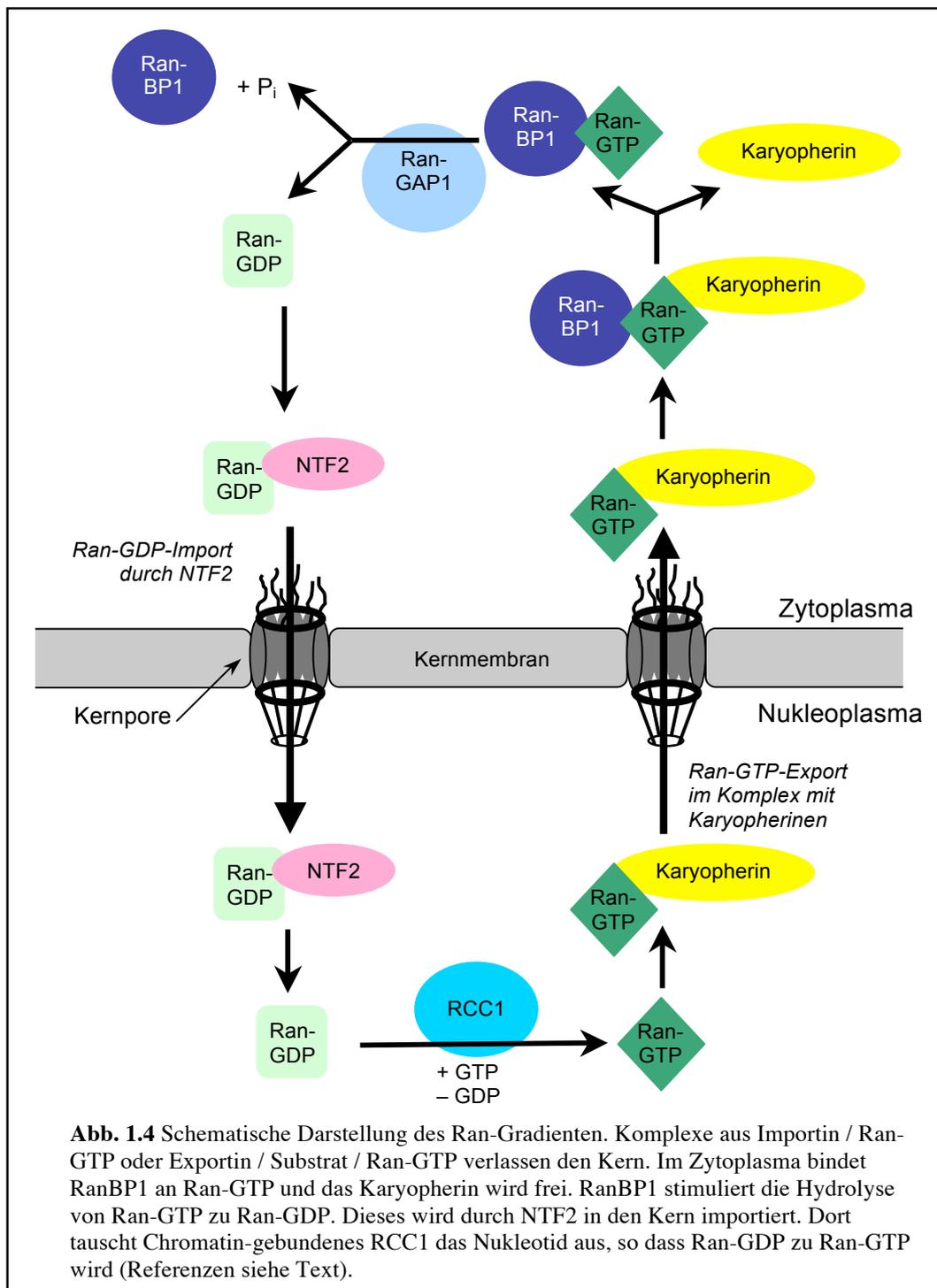
Etwa 1/3 aller Nukleoporine weist kurze, sich wiederholende Sequenzmotive auf, die reich an Phenylalanin (F)- und Glycin (G)-Resten sind (Rout et al. 2000, Cronshaw et al. 2002, Weis 2003). Diese FG-Nukleoporine füllen den aktiven Transportkanal aus. Sie dienen als Bindestellen der transienten Interaktion mit den Transport-Rezeptoren, indem ihre Phenylalanin-Reste mit hydrophoben Stellen auf der Oberfläche der Transport-Rezeptoren wechselwirken (Frey et al. 2006, Stoffler et al. 1999). Nukleoporine ohne FG-Wiederholungsdomänen sind die hauptsächlich strukturellen Komponenten der Kernporen. Sie verankern als integrale Membranproteine die Kernpore in der Kernmembran (Weis 2003, Görlich & Kutay 1999). Die meisten Nukleoporine sind symmetrisch über die Kernpore verteilt. Nicht-symmetrisch verteilte Nukleoporine spielen vermutlich eine Rolle in gerichteten Transportprozessen (wie der initialen Rezeptor-Erkennung und der Termination des Transports) oder haben Kompartiment-spezifische Aufgaben (wie die Interaktion mit Chromatin oder der Transkriptions-Maschinerie) (Köhler & Hurt 2007). Der genaue Mechanismus, der für die hohe Selektivität und große Anzahl der Transport-Ereignisse im langen Zentralkanal sorgt, ist noch nicht hinreichend geklärt worden, ebenso wie Details des Energiebedarfs (Weis 2003).

1.1.4 Ran-Gradient und Energiebedarf

Der Karyopherin-abhängige Transport wird reguliert durch die asymmetrische Verteilung von Ran-GTP und Ran-GDP, dem so genannten Ran-Gradienten (Görlich et al. 1996b, Izaurre et al. 1997). In *S. cerevisiae* existieren zwei Ran-Orthologe, Gsp2 und das essentielle Gsp1 (Belhumeur et al. 1993). Wie andere kleine GTPasen zyklisiert Ran zwischen einem GTP- und einem GDP-gebundenem Zustand (Bischoff & Ponstingl 1991, Melchior et al. 1993, Moore & Blobel 1993). Dieser Wechsel erfolgt eigentlich sehr langsam, wird aber von akzessorischen Faktoren stark beschleunigt. Die unterschiedliche Lokalisierung dieser Faktoren führt zu einer hohen Konzentration von Ran-GTP im Zellkern und Ran-GDP im Zytoplasma.

Durch Nukleotid-Austausch wandelt sich Ran-GDP in Ran-GTP um (Abb. 1.4). Die sehr geringe intrinsische Geschwindigkeit wird bis zu 100 000-fach erhöht durch den Ran-Guanin Austauschfaktor (Ran guanine exchange factor, RanGEF), der das nukleotid-freie Ran-Intermediat stabilisiert. RCC1 (regulator of chromosome condensation 1) ist der RanGEF in höheren Eukaryoten, Prp20 das Hefe-Ortholog (Bischoff & Ponstingl 1991, Aebi et al. 1990). RCC1 findet sich nur im Zellkern an Histone gebunden (Ohtsubo et al. 1989, Nemergut et al. 2001) und liegt geschätzt in bis zu einer Kopie pro Nukleosom vor (Dasso et al. 1992). Es hat keine Präferenz für GTP oder GDP, aber da im Kern etwa 200mal mehr freies GTP vorliegt als im Zytoplasma (Kalab et al. 2002), wird jedes in den Kern gelangende Ran sofort GTP-beladen.

Die Hydrolyse von Ran-GTP zu Ran-GDP wird um etwa fünf Größenordnungen beschleunigt durch das Ran-GTPase-aktivierende Protein RanGAP1/Rna1 (Bischoff et al. 1994, Klebe et al. 1995). Das Ran-bindende Protein 1 (RanBP1/Yrb1) stimuliert diese Aktivierung zusätzlich um etwa das Zehnfache (Bischoff et al. 1995, Richards et al.



1995, Schlenstedt et al. 1995b). RanBP1 bindet an dabei an den C-Terminus von Ran und ermöglicht so RanGAP1 einen besseren Zugang (Vetter et al. 1999). RanGAP1 und RanBP1 befinden sich nur im Zytoplasma (Feng et al. 1999, Künzler et al. 2000, Maurer et al. 2001); in Vertebraten hat RanGAP1 seine höchste Konzentration an der Außenseite der Kernporen, wo es mit dem Nukleoporin RanBP2 assoziiert ist (Görlich & Kutay 1999). RanBP2 findet sich nur in höheren Eukaryoten, in denen sich im Gegensatz zu Hefe die Kernmembran in der Prophase auflöst ("offene Mitose"), es existiert kein RanBP2-Ortholog in *S. cerevisiae* (Görlich & Kutay 1999).

Da der Karyopherin-vermittelte Transport gegen einen Gradienten chemischer Aktivität stattfindet, muss der Transportzyklus an den Verbrauch von Energie gekoppelt sein. Die Ran-abhängige GTP-Hydrolyse wird jedoch nicht für die eigentliche Translokation durch die Pore benötigt, da sie auch mit einer Ran-Mutante, die GTP nicht stabil binden kann, funktioniert (Izaurrealde et al. 1997, Richards et al. 1997). Exportine können vielmehr als Symporter für ihre Substrate und Ran-GTP aufgefasst werden, während Importine als Antiporter fungieren, die den Import gegen einen Gradienten chemischer Aktivität mit dem Export von Ran-GTP entlang eines Gradienten "bezahlen". Die restlichen Komponenten des Ran-Systems dienen dazu, den Ran-Gradienten aufrecht zu erhalten und benutzen dabei die Energie aus der Ran-GTP-Hydrolyse (Görlich & Kutay 1999, Weis 2003).

1.1.5 Import- und Exportsignale

Die spezifische Interaktion zwischen einem Transport-Rezeptor und seinem Substrat wird von meist kleinen, transferierbaren Signalsequenzen vermittelt (Weis 2003). Im Gegensatz zu vielen Import-Signalen für das Endoplasmatische Retikulum und den Mitochondrien werden die Kerntransport-Signalsequenzen nach erfolgter Translokation nicht entfernt, weil sie oft Teil einer funktionellen Domäne sind (z.B. die Bindung an DNA oder RNA vermitteln) oder für ein konstantes Pendeln zwischen Zellkern und Zytoplasma benötigt werden. In höheren Eukaryoten mit offener Mitose muss zusätzlich nach dem Wiederaufbau der Kernmembran die korrekte Lokalisierung sichergestellt werden (Görlich & Kutay 1999).

Nur eine kleine Zahl dieser Signalsequenzen wurde bisher eindeutig identifiziert (Weis et al. 2003). Die am besten untersuchten Beispiele sind die Lysin-reiche "klassische" Kernimport-Sequenz NLS (nuclear localization sequence), die vom Importin α/β -Dimer erkannt wird, und die Leucin-reiche Kernexport-Sequenz NES (nuclear export sequence), die den Kernexport durch Crm1/Xpo1 vermittelt.

Die "klassische" NLS besteht entweder aus einer Anhäufung basischer Aminosäuren, oft Lysin (*monopartite* NLS), oder aus zwei basischen Sequenzabschnitten, die durch 10–12 Aminosäurereste voneinander getrennt sind (*bipartite* NLS) (Dingwall & Laskey 1991). Der Prototyp einer *monopartite* NLS findet sich im großen T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40, Kalderon et al. 1984), der Prototyp einer *bipartite* NLS im Chaperon Nucleoplasmin (Robbins et al. 1991). Mittlerweile existieren Kristallstrukturen mehrerer NLS-Peptide im Komplex mit Importin α (Conti & Kuriyan 2000, Conti et al. 1998, Fontes et al. 2003).

Die Leucin-reiche NES wurde zunächst im Rev-Protein des HI-Virus identifiziert. Rev dient als Adapter-Protein: es bindet im Kern an ungespleißte HI-Virus-RNA und an den Export-Rezeptor Crm1. Außer der RNA-bindenden Domäne benötigt Rev dazu eine neun Aminosäuren umfassende aktivierende Domäne (Malim et al. 1989, 1991), die auch als autonomes Export-Signal funktioniert (Fischer et al. 1995). Ein weiterer Prototyp einer NES wurde in PKI, dem Inhibitor der cAMP-abhängigen Proteinkinase A, gefunden (Wen et al. 1995). Die klassische NES enthält vier charakteristisch voneinander getrennte Leucine oder andere basische Aminosäuren (**LX_{2,3}LX_{2,3}LXL**) (Bogerd et al. 1996, 1999). Dieses Motiv ist jedoch oft degeneriert oder fehlt sogar ganz wie in Snur-

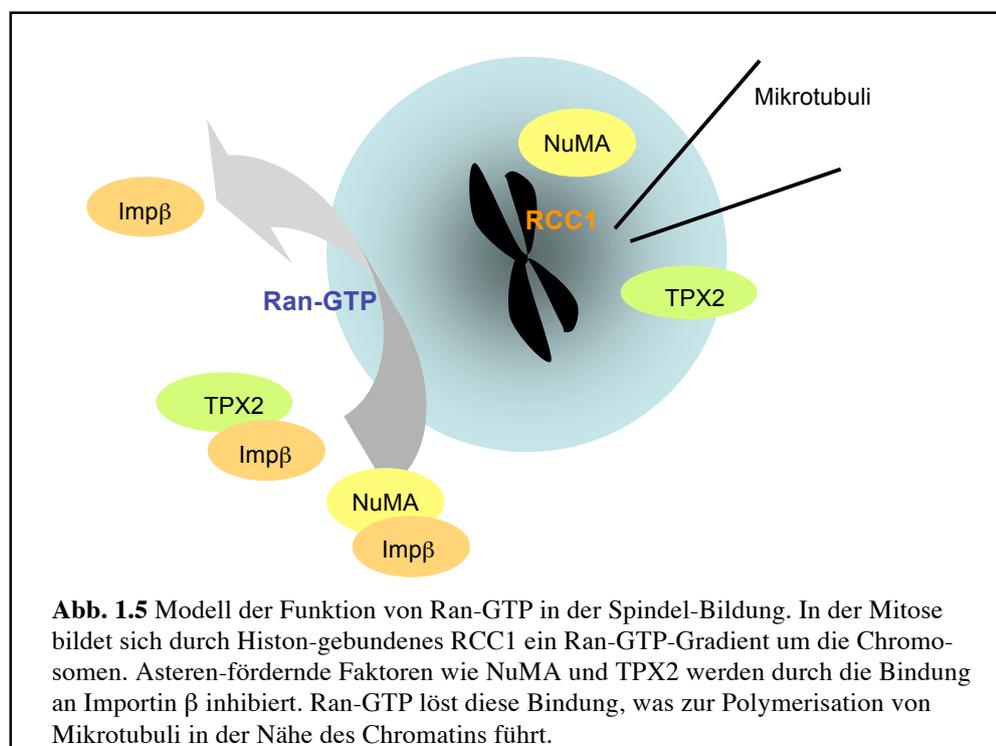
portin 1, dem Import-Rezeptor für U snRNPs (Paraskeva et al. 1999). Aufgrund der statistischen Häufigkeit von Leucin sind potentielle Kernexport-Signale in vielen Proteinen zu finden (Görlich & Kutay 1999).

Aus der Aminosäure-Sequenz allein lässt sich aus diesen Gründen nicht auf eine funktionelle NLS oder NES schließen. Ebenso ist die Vorhersage schwierig, welcher Transport-Rezeptor ein gegebenes Protein transportiert (Weis et al. 2003, Görlich & Kutay 1999).

1.2 Weitere Funktionen der Kerntransport-Maschinerie

1.2.1 Einfluss von Ran-GTP auf die Mikrotubuli

Mutationen im Ran-System führen zu pleiotropen Phänotypen, oft mit Defekten in der Zellteilung (Sazer & Dasso 2000, Moore 2001). Dies ist nicht nur auf indirekte Effekte durch Störung des Proteintransports zurückzuführen, sondern Ran spielt auch eine direkte Rolle bei der Ausbildung der bipolaren Kernspindel. In höheren Eukaryoten löst sich die Kernmembran in der Prophase der Mitose auf, Zytoplasma und Nukleoplasma vermischen sich, so dass die hohe nukleäre Ran-GTP-Konzentration verdünnt wird (Gruss & Vernos 2004). Das gegenwärtige Modell der Rolle von Ran-GTP in der Spindelbildung (Abb. 1.5) geht davon aus, dass durch Histon-gebundenes RCC1 die Konzentration von Ran-GTP in der Nähe der Chromosomen erhöht bleibt (Nachury et al. 2001, Wiese et al. 2001, Gruss et al. 2001). Ein lokaler Ran-Gradient bildet sich, der mit Nukleotid-spezifischen Biosensoren nachgewiesen wurde (Kalab et al. 2002).



Viele Erkenntnisse zur Rolle von Ran-GTP in der Spindelbildung wurden an Extrakten aus meiotisch arretierten *Xenopus laevis*-Eizellen gewonnen. Hier induziert die Zugabe

von Ran-GTP spontane Mikrotubuli-Polymerisation sowie die Bildung von Asteren (strahlenförmige Mikrotubuli-"Büschel" um die Centriolen) und Spindel-ähnlichen Strukturen (Kalab et al. 1999, Carazo-Salas et al. 1999, Ohba et al. 1999, Wilde & Zheng 1999, Zhang et al. 1999). Dieser Effekt wird durch Zugabe von Importin β inhibiert (Nachury et al. 2001, Wiese et al. 2001). Dies führte zur Annahme, dass Importin β Asteren-fördernde Faktoren (aster promoting activities, APA) bindet, die die Mikrotubuli-Polymerisation beeinflussen, und die durch Ran-GTP in der Nähe des Chromatins freigesetzt werden.

Als ein APA wurde NuMA (nuclear mitotic apparatus protein) identifiziert (Nachury et al. 2001), ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein, das die Minus-Enden von Mikrotubuli an den Spindelpolen organisiert (Merdes et al. 1996, Gaglio et al. 1995). Zugabe eines NuMA-Fragments löst Asteren-Bildung in *Xenopus*-Ei-Extrakten aus (Merdes et al. 1996, Nachury et al. 2001), und Ran-GTP löst die Bindung von NuMA an Importin β (Wiese et al. 2001).

Ebenso fördert TPX2 (targeting protein for Xklp2) die Bildung von Asteren in Ei-Extrakten, und seine Bindung an Importin β wird durch Ran-GTP gelöst (Wittmann et al. 2000, Gruss et al. 2001). TPX2 spielt vermutlich eine Rolle in den frühen Phasen der Mikrotubuli-Nukleation (Gruss et al. 2002) und aktiviert die mitotische Kinase Aurora A (Eyers et al. 2003, Tsai et al. 2003).

Obwohl TPX2 und NuMA in Vertebraten stark konserviert sind, konnten keine Orthologe in anderen Eukaryoten wie Hefen oder Nematoden gefunden werden (Wittmann et al. 2000). Genetische Studien an *S. pombe* (Fleig et al. 2000) und RNA-Interferenz-Experimente in *Caenorhabditis elegans* (Bamba et al. 2002) zeigen, dass Ran auch hier an der Spindel-Bildung beteiligt ist. In *S. cerevisiae* unterdrückt eine Überexpression von RCC1 die Effekte einer Mutation in α -Tubulin, die zu überzähligen Mikrotubuli und einem Arrest im Zellzyklus führt (Kirkpatrick & Solomon 1994), und eine Überexpression von Ran oder Yrb1 führt zu einer erhöhten Rate von Chromosomen-Nondisjunktion und einer gesteigerten Empfindlichkeit gegen die Mikrotubuli-depolymerisierende Droge Benomyl (Ouspenski et al. 1995).

In Organismen mit geschlossener Mitose wie *S. cerevisiae* bleibt die Kernmembran und damit der Ran-Gradient während des gesamten Zellzyklus intakt. Die Polymerisation von Mikrotubuli findet sowohl im Ran-GTP-armen Zytoplasma, als auch im Ran-GTP-reichen Kern statt. Die Spindel-Bildung muss also durch andere Effekte ausgelöst werden, z.B. durch Änderungen in der Tubulin-Konzentration im Kern oder der Nukleations-Kapazität der Spindelpolkörper (Sazer & Dasso 2000).

1.2.2 Einfluss von Crm1 auf die Centrosomen

Zellkultur-Studien weisen darauf hin, dass Crm1 eine Rolle in der Centrosomen-Verdopplung spielt (Forgues et al. 2001, 2003). Das Centrosom ist das Mikrotubuli-organisierende Zentrum (MTOC) in höheren eukaryotischen Zellen. Die beiden Centriolen, aus denen ein Centrosom besteht, trennen sich nur einmal pro Zellzyklus voneinander (während des G₁-S-Übergangs) und verdoppeln sich anschließend, so dass zwei Centrosomen vorliegen, zwischen denen sich die Spindel bildet (Bornens 2002). Abnormale Centrosomen-Verdopplung ist eng mit Aneuploidie verbunden und liegt in fast jedem humanen Krebs-Typ vor (Lingle & Salisbury 2000).

Das Hepatitis Virus B (HBV) ist ein DNA-Tumor-Virus, das zur Entstehung von Leberkrebs führen kann (Forgues et al. 2001). Eine transiente Transfektion von Zellen der Hepatom-Zelllinie HepG2 mit HBV-DNA führt zu einer signifikanten Erhöhung von mitotischen Zellen mit abnormal vielen Centrosomen. Eine Überexpression von Crm1 verhindert diesen Effekt. Dagegen führt eine Behandlung der Zellen mit Leptomycin B, das die Crm1-Funktion blockiert, ebenfalls zu abnormal vielen Centrosomen (Forgues et al. 2003). Eine Lokalisierung von Crm1 an den Centrosomen konnte in hTERT-immortalisierten normalen humanen Fibroblasten gezeigt werden, und diese Lokalisation wird durch Leptomycin B teilweise aufgehoben (Forgues et al. 2003). In diesen Zellen führt die Expression des HBV-Proteins HBx, das eine NES besitzt, zu einer verstärkten Lokalisierung von Crm1 im Zytoplasma (Forgues et al. 2001).

Crm1 scheint die vorzeitige Centrosomen-Verdopplung zu verhindern, und eine Misslokalisierung von Crm1 – durch Leptomycin B oder Expression von HBx – stört diese inhibitorische Funktion.

Die Wirkung von Crm1 auf die Centrosomen-Verdopplung kann durch Nucleophosmin vermittelt sein (Wang et al. 2005, Shinmura et al. 2005). Nucleophosmin verlässt den Nukleolus nach Auflösung der Kernmembran, bindet an die Centrosomen und verhindert ihre Verdopplung. Eine Phosphorylierung durch Cyclin-Cdk2-Komplexe während des G₁-S-Übergangs führt zu einer Ablösung von Nucleophosmin von den Centriolen und ermöglicht ihre Verdopplung (Okuda 2002). Nucleophosmin bindet an die Centrosomen über dort lokalisiertes Crm1, und diese Bindung ist abhängig von einer NES in Nucleophosmin (Wang et al. 2005). Eine Störung der Crm1-Funktion durch Leptomycin B, Expression von HBx oder Überexpression von RanBP1 führt zu einer Ablösung von Nucleophosmin von den Centrosomen und zu überzähligen Centrosomen (Wang et al. 2005).

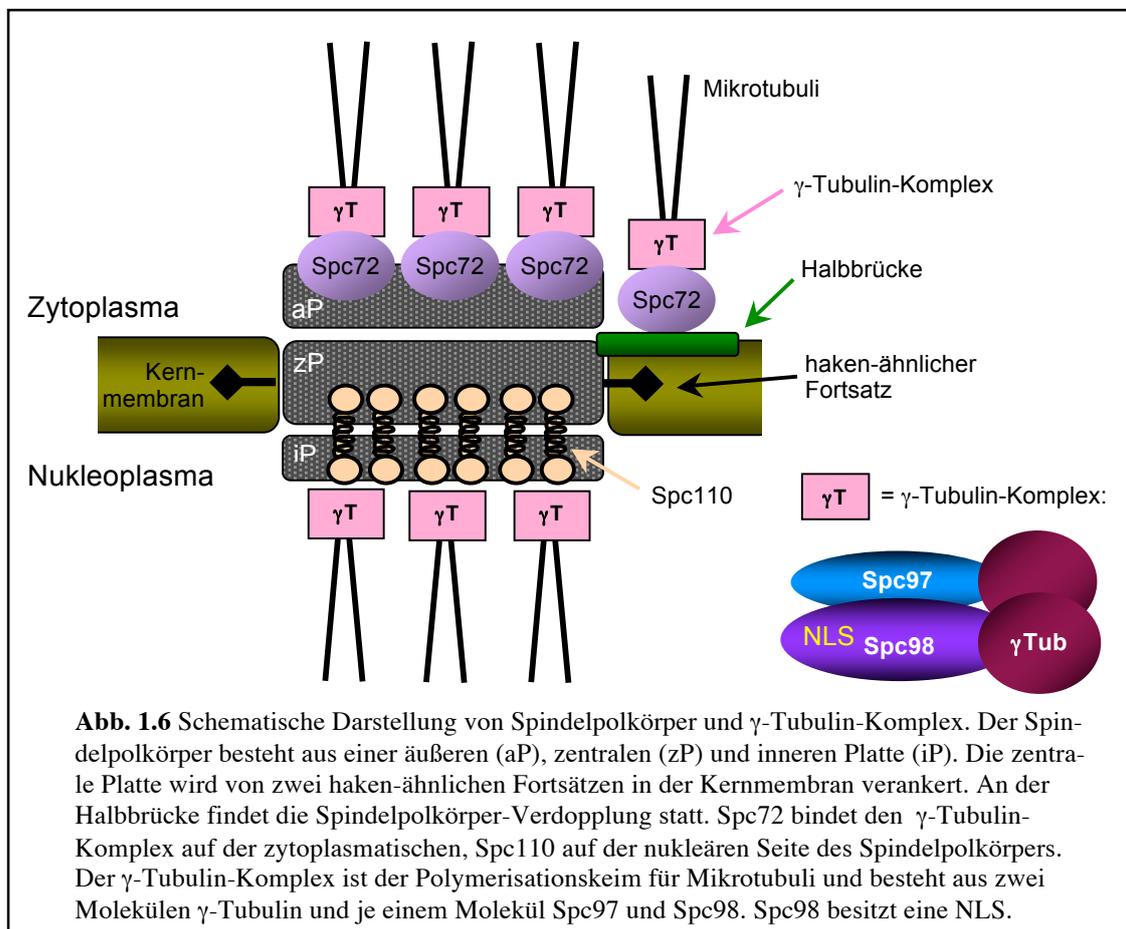
Neben Crm1 lokalisieren auch Ran-GTP (Keryer et al. 2003) und RanBP1 (Di Fiore et al. 2003) an den Centrosomen. Der Ran-Crm1-Komplex könnte Proteine wie Nucleophosmin, die die Centrosomen-Verdopplung regulieren, über ihre NES an die Centrosomen binden (Budhu & Wang 2005). Ob ein ähnlicher Mechanismus in der Hefe *S. cerevisiae* vorliegt, ist nicht bekannt, und ein Nucleophosmin-Ortholog wurde nicht gefunden (Jaspersen & Winey 2004). Diese Arbeit zeigt zum ersten Mal eine Lokalisation des Crm1-Orthologs Xpo1 am Spindelpolkkörper, dem Mikrotubuli-organisierenden Zentrum der Hefe.

1.3 Der Spindelpolkkörper

1.3.1 Generelle Struktur des Spindelpolkkörpers

Der Spindelpolkkörper ist das Mikrotubuli-organisierende Zentrum (MTOC) in *S. cerevisiae* (Jaspersen & Winey 2004). Das zylindrische Organell ist während des gesamten Zellzyklus in die Kernmembran eingebettet. In der Elektronenmikroskopie erkennt man im Wesentlichen drei Platten (*plaques*), die als äußere, zentrale und innere Platte bezeichnet werden (Abb. 1.6). Die äußere Platte weist zum Zytoplasma, von ihr gehen zytoplasmatische Mikrotubuli aus, die den astralen Mikrotubuli in höheren Eukaryoten entsprechen. Die zentrale Platte durchspannt die Kernmembran und besitzt zwei haken-

ähnliche Fortsätze, die den Spindelpolkkörper in der Membran verankern. Eine Seite der zentralen Platte ist verbunden mit einer elektronen-dichten Region der Kernmembran, die Halbbrücke genannt wird. Hier erfolgt die Neusynthese eines Spindelpolkkörpers während der G₁-Phase. Die innere Platte zeigt zum Nukleoplasma, von ihr gehen nukleäre Mikrotubuli aus, die die Spindel bilden (Jaspersen & Winey 2004).



Der Spindelpolkörper ist eine dynamische Struktur. Sein Durchmesser wächst von etwa 80 nm in der G₁-Phase auf 110 nm während der Mitose. Der Abstand von 150 nm zwischen der inneren und äußeren Platte bleibt dabei konstant (Byers & Goetsch 1975b). Die zentralen Bestandteile eines Spindelpolkörpers (ohne Mikrotubuli und ihre assoziierten Proteine) bilden eine Masse von 300–500 MDa, also etwa das Zwanzigfache einer Kernpore (Adams & Kilmartin 1999, Bullitt et al. 1997). Dennoch sind bis jetzt nur 17 zentrale Spindelpolkörper-Komponenten bekannt (Jaspersen & Winey 2004), von denen viele phosphoryliert sind und coiled-coil-Domänen enthalten, die Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln (Wigge et al. 1998).

Das innere Gerüst des Spindelpolkörpers bildet Spc42, ein essentielles coiled-coil-Protein. Trimere von Spc42-Dimeren bilden das hexagonale Kristallgitter der zentralen Platte, dabei weisen die N-Termini zum Nukleoplasma (Donaldson & Kilmartin 1996). Hier binden zwei weitere essentielle coiled-coil-Proteine, Spc29 und Spc110. Der C-Terminus von Spc110 befindet sich in der zentralen Platte und bindet Spc29 und Calmodulin (Cmd1), der N-Terminus befindet sich in der inneren Platte (Adams & Kil-

martin 1999, Elliott et al. 1999). Die lange coiled-coil-Region von Spc110 bestimmt den Abstand der zentralen von der inneren Platte (Kilmartin et al. 1993).

An der zytoplasmatischen Seite der zentralen Platte wird der C-Terminus von Spc42 über Cnm67 mit zwei Bestandteilen der äußeren Platte, Nud1 und Spc72, verbunden (Adams & Kilmartin 1999). *CNM67* und *SPC72* sind nicht in allen *S. cerevisiae*-Stammhintergründen essentiell, ihre Deletion verursacht aber Defekte in Mikrotubuli-abhängigen Prozessen (Jaspersen & Winey 2004).

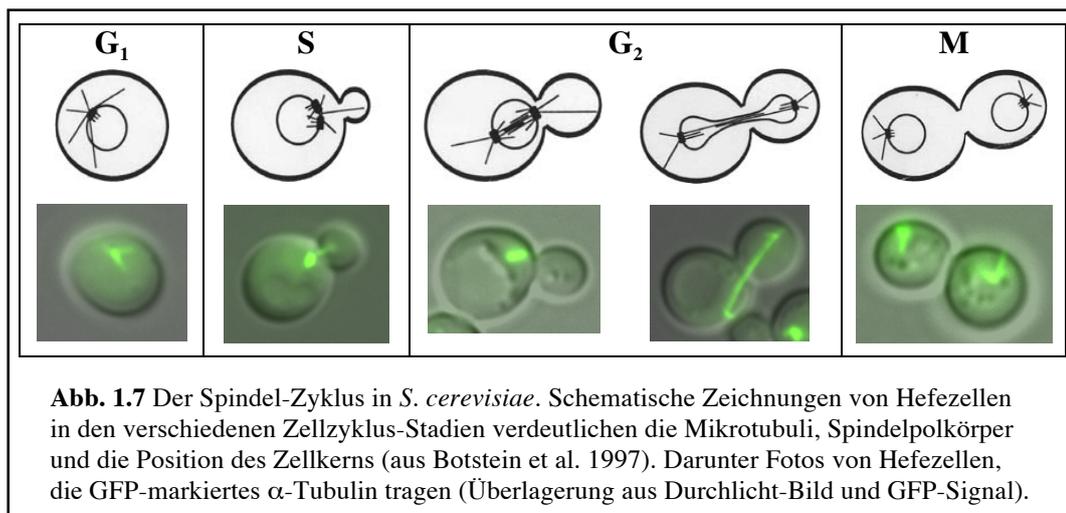
Elektronenmikroskopische Untersuchungen ermöglichten eine genaue Beschreibung des Ablaufs der Spindelpolkörper-Verdopplung. Weitgehend ungeklärt ist die Kontrolle der Verdopplung und der Größe des Spindelpolkörpers, ob einzelne Moleküle oder vorgeformte Subkomplexe in den Spindelpolkörper integriert werden, und welche Modifikationen dabei eine Rolle spielen (Jaspersen & Winey 2004).

1.3.2 γ -Tubulin-Komplex-bindende Proteine: Spc110 und Spc72

Die Hauptfunktion des Spindelpolkörpers besteht in der Verankerung der Mikrotubuli, die aus α/β -Tubulin-Dimeren bestehen. Die mit einer Kappe versehenen Minus-Enden der Mikrotubuli weisen dabei zum Spindelpolkörper, die offenen Plus-Enden zum Zytobzw. Nukleoplasma (Jaspersen & Winey 2004). Diese Polarität ist wichtig für den gerichteten Transport diverser Frachtmoleküle entlang der Mikrotubuli durch Motorproteine. Der Polymerisationskeim der Mikrotubuli ist γ -Tubulin, ein konservierter Bestandteil von Spindelpolkörpern und Centrosomen. *TUB4* kodiert für das Hefe- γ -Tubulin (Marschall et al. 1996, Sobel & Snyder 1995, Spang et al. 1996). Zwei Moleküle γ -Tubulin bilden mit je einem Molekül Spc97 und Spc98 den γ -Tubulin-Komplex, der im Zytoplasma assembliert wird (Pereira et al. 1998, Vinh et al. 2002). An der inneren Platte des Spindelpolkörpers gebundenes Spc98 ist phosphoryliert (Pereira et al. 1998), und γ -Tubulin wird während der G_1 -Phase phosphoryliert (Vogel et al. 2001). Wie diese Phosphorylierungen die Bindung an den Spindelpolkörper und / oder die Mikrotubuli-Polymerisation beeinflussen, ist noch unklar (Jaspersen & Winey 2004).

Nukleäre Mikrotubuli bilden die mitotische und meiotische Spindel. Die Spindelbildung beginnt in der S-Phase (Abb. 1.7), sobald sich die duplizierten Spindelpolkörper voneinander trennen (Byers & Goetsch 1974, 1975a). Spc110 verankert den γ -Tubulin-Komplex auf der nukleären Seite des Spindelpolkörpers durch die Bindung an Spc98 (Kilmartin & Goh 1996, Knop & Schiebel 1997, Nguyen et al. 1998). Die Phosphorylierung von Spc110 nimmt mit Beginn der S-Phase zu, wodurch die Bindung an den γ -Tubulin-Komplex verstärkt wird (Friedman et al. 1996, 2001). In der G_1 - und S-Phase wird etwa 50 % des Spc110 in einem Spindelpolkörper durch neu synthetisiertes Spc110 ausgetauscht. Im weiteren Zellzyklus-Verlauf findet dagegen kaum Austausch statt (Yoder et al. 2003).

Zytoplasmatische Mikrotubuli positionieren den Zellkern zwischen Mutter- und Tochterzelle, orientieren die Spindel entlang der Zellachse und spielen eine Rolle während der Karyogamie (Jaspersen & Winey 2004). Auf der zytoplasmatischen Seite des Spindelpolkörpers bindet das coiled-coil Protein Spc72 den γ -Tubulin-Komplex über seinen



N-Terminus (Knop & Schiebel 1998). In der G_1 -Phase liegt Spc72 hauptsächlich unphosphoryliert vor und bindet an das Halbbrücken-Protein Kar1. Mit Beginn der S-Phase wird Spc72 phosphoryliert und relokalisiert an die äußere Platte, da Nud1, ein Bestandteil der äußeren Platte, bevorzugt phosphoryliertes Spc72 bindet (Gruneberg et al. 2000, Pereira et al. 1999). Außerdem wechselwirkt Spc72 über eine zentrale Region mit Stu2, das zur Stabilität der Mikrotubuli beiträgt (Usui et al. 2003, Chen et al. 1998). In Stammhintergründen, die eine *SPC72*-Deletion überleben, besitzen die Spindelpolkörper noch einige zytoplasmatische Mikrotubuli (Soues & Adams 1998). Stu2 könnte hier die Mikrotubuli-Bindung mit geringer Effizienz vermitteln (Francis & Davis 2000).

Wie Spc110 und Spc72 die Mikrotubuli-Nukleation beeinflussen ist noch nicht bekannt (Jaspersen & Winey 2004). Ihre Bindungsdomänen für den γ -Tubulin-Komplex unterscheiden sich funktionell. Eine *SPC72*-Deletion kann funktionell ersetzt werden durch ein Spc72-Protein, dessen γ -Tubulin-Bindungsdomäne durch die von Spc110 ausgetauscht wurde. Eine *SPC110*-Deletion wird jedoch nicht funktionell ersetzt durch ein Spc110-Protein, dessen γ -Tubulin-Bindungsdomäne durch die von Spc72 ausgetauscht wurde, und die Überexpression dieses Konstrukts ist letal (Knop & Schiebel 1998). Der γ -Tubulin-Komplex wird auf beiden Seiten des Spindelpolkörpers benötigt. Wie eine gleichmäßige Verteilung erreicht wird ist noch ungeklärt. Der γ -Tubulin-Komplex assembliert im Zytoplasma (Pereira et al. 1998), und Spc98 enthält als einzige Komponente eine NLS (Geissler et al. 1996), die den gesamten Komplex in den Kern dirigieren kann (Pereira et al. 1998). Die Phosphorylierung von Spc98 spielt dabei keine Rolle (Pereira et al. 1998). Es wurde postuliert (Knop & Schiebel 1998), dass die Bindung des γ -Tubulin-Komplexes an frei im Zytoplasma vorliegendes Spc72 diese NLS maskiert. An Spc72 gebundene γ -Tubulin-Komplexe würden dann auf der zytoplasmatischen Seite des Spindelpolkörpers eingebaut, während freie Komplexe in den Kern importiert und an die nukleäre Seite des Spindelpolkörpers eingebaut würden. Alternativ ist ein Pendeln des γ -Tubulin-Komplexes zwischen Kern und Zytoplasma denkbar, das eine gleichmäßige Verteilung des Komplexes auf beiden Seiten des Spindelpolkörpers sicherstellen würde.

1.4 Ziele der Arbeit

Ein zentraler Punkt dieser Arbeit war die Charakterisierung der Fähigkeit von *S. cerevisiae* Xpo1, sowohl Proteine als auch mRNA zu exportieren. Lassen sich diese beiden Funktionen voneinander trennen, sind verschiedene Bereiche von Xpo1 dafür notwendig? Zur Beantwortung dieser Fragen wurden in den verschiedenen Domänen von Xpo1 Punktmutationen eingefügt. Die mutierten Proteine wurden u.a. auf ihre Fähigkeit zum Export von Proteinen und mRNA untersucht.

Obwohl Xpo1 eines der wenigen essentiellen Karyopherine der Hefe ist, waren zu Beginn dieser Arbeit nur sehr wenige Substrate bekannt. Um neue Interaktionspartner von Xpo1 zu finden, wurde eine 2-Hybrid-Analyse durchgeführt.

In der 2-Hybrid-Analyse wurden die beiden γ -Tubulin-Komplex-bindenden Proteine der Hefe, Spc110 und Spc72, gefunden. Dieses Ergebnis zusammen mit dem Befund, dass sich das Xpo1-Ortholog in höheren Eukaryoten am Centrosom befindet, führte zur Frage der Lokalisation von Xpo1. Bindet Xpo1 auch in der Hefe an den Spindelpolkörper? Ist diese Bindung abhängig von Spc72 und / oder einem intakten Ran-Gradienten?

Desweiteren wurde die Wechselwirkung von Xpo1 mit dem in der 2-Hybrid-Analyse gefundenen Spc72 näher charakterisiert. Um zu testen, ob es sich bei diesem Spindelpolkörper-Protein um ein neues Export-Substrat von Xpo1 handelt, wurden *in vitro*-Bindungsexperimente durchgeführt. Sie zeigten eine NES- und Ran-GTP-abhängige Bindung von Spc72 an Xpo1 und wurden in *in vivo*-Experimenten verifiziert. Schließlich wurde untersucht, ob eine Störung der Spc72-Xpo1-Interaktion durch Mutationen in *SPC72* und *XPO1* phänotypisch Auswirkungen auf die zytoplasmatischen Mikrotubuli hat.

2. Ergebnisse

2.1 Charakterisierung von Xpo1-Mutanten

2.1.1 Übersicht über die Mutanten

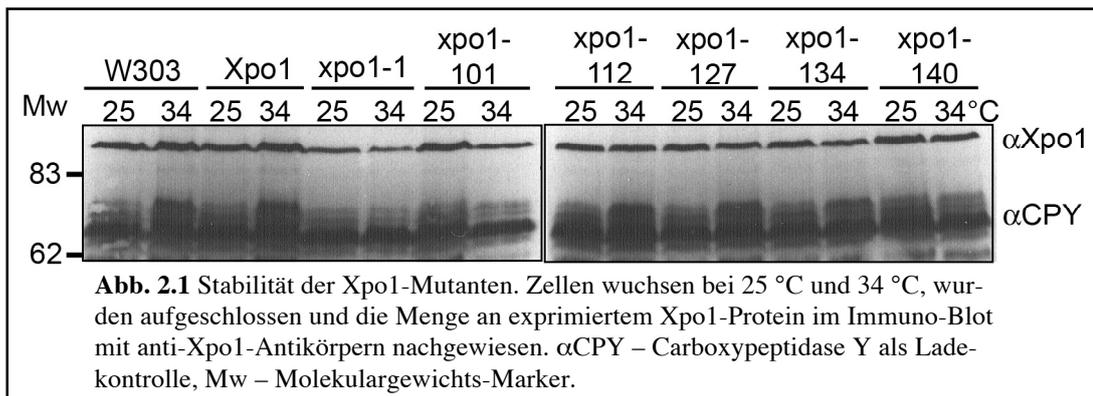
S. cerevisiae Xpo1 exportiert sowohl Proteine als auch mRNA aus dem Kern. Um diese beiden Funktionen näher zu untersuchen und mit den verschiedenen Domänen von Xpo1 in Zusammenhang zu bringen, wurden ungerichtete Punktmutationen in *XPO1* eingefügt. Durch *low-fidelity* PCR-Mutagenese mit genomischer Hefe-DNA als Ausgangsmaterial entstanden sechs mutierte *xpo1*-Allele, die sich in Anzahl und Lage der Punktmutationen unterscheiden. Die mutierten Gene wurden über einen Zwischenschritt in den Vektor pRS313 kloniert und sequenziert. Tabelle 2.1 gibt eine Übersicht über die Verteilung der Aminosäure-Austausche in den mutierten Xpo1-Proteinen.

In Crm1, dem Ortholog von Xpo1 in höheren Eukaryonten, zeigt der N-terminale Bereich Sequenzhomologie zu anderen Karyopherinen (Abb. 1.2) und ist für die Bindung von Ran-GTP verantwortlich (Ossareh-Nazari & Dargemont 1999). Eine weitere Region in der Mitte ist zwischen Crm1-Orthologen hochkonserviert (Kudo et al. 1999) und hat zusammen mit weiter C-terminal gelegenen Sequenzen eine Funktion in der Bindung von NES-Substraten (Askjaer et al. 1998, Ossareh-Nazari & Dargemont 1999). Die Anzahl der Mutationen in diesen beiden Bereichen ist angegeben (Tab. 2.1).

Tabelle 2.1 Übersicht über die erzeugten Xpo1-Proteine.

Mutante	Mutationen insgesamt	Aminosäure-Austausche	im Bereich der Ran-Bindung	im Bereich der NES-Bindung
xpo1-1	2	G649D, F1051L	–	1
xpo1-101	4	M101R, Y230N, I234T, T320A	1	–
xpo1-112	3	E236G, V259D, E408V	–	–
xpo1-127	3	T252K, S501P, D798G	–	2
xpo1-134	1	L232P	–	–
xpo1-140	7	E384G, M435I, S489G, S516T, Y645D, A745T, T753A	–	6

Die *xpo1*-Allele wurden in einen haploiden Stamm transformiert, in dem das *XPO1*-Gen durch den LEU2-Marker zerstört und durch ein Wildtyp-*XPO1* auf einem URA3-Plasmid kompetiert wird. Dieses Plasmid wurde durch Plasmid-Shuffling über 5'-FOA ersetzt durch die Plasmide mit den *xpo1*-Allelen. Die Menge der mutierten Xpo1-Proteine wurde bei 25 °C und 34 °C im Immuno-Blot überprüft (Abb.2.1).

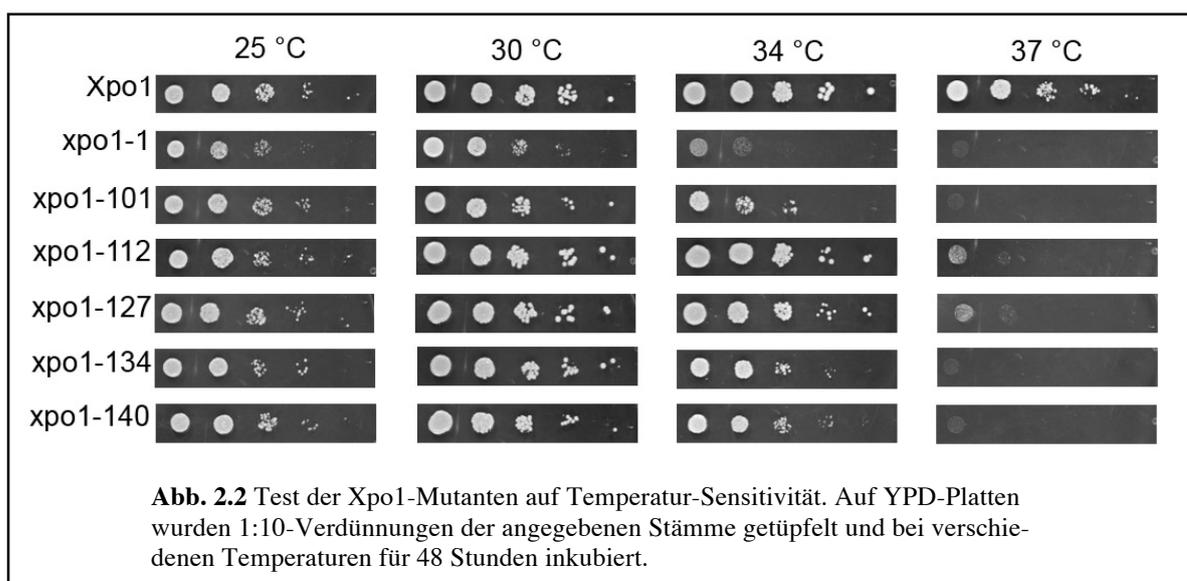


Die Signalstärken dreier unabhängiger Experimente wurden mit dem *Image Gauge* Programm (Fujifilm) quantifiziert und gemittelt. Alle Mutanten werden in vergleichbarem Maße wie der Wildtyp exprimiert und zeigen keinen erhöhten Abbau.

2.1.2 Wachstum und Zellzyklus

Zur Charakterisierung der Mutanten wurde zunächst untersucht, ob sie Einfluss auf das Zellwachstum haben. Dazu wurden die mit den Mutanten transformierten Hefestämme auf YPD-Platten in fünf 1:10-Verdünnungen getüpfelt und bei verschiedenen Temperaturen inkubiert (Abb. 2.2).

Bereits bei Raumtemperatur wuchs der xpo1-1-Stamm schlechter als der Wildtyp, während alle anderen Mutanten praktisch wie Xpo1 wuchsen; bei 30 °C ist der Unterschied noch deutlicher. Bei 34 °C zeigten auch xpo1-101, -134 und -140 ein geringeres Wachstum. Bei 37 °C schließlich, der restriktiven Temperatur, war keine der Mutanten mehr in der Lage, den Zellen zum Wachstum zu verhelfen, während der Wildtyp auch hier wie bei allen anderen Temperaturen Kolonien bildete.



Zur Bestimmung, ob und in welchem Maße die Wachstumsdefekte durch Störungen im Zellzyklus verursacht sind, wurden Zellen im Lichtmikroskop beobachtet und nach der

Größe ihrer Tochterzellen eingeteilt (G_1 : keine Tochterzelle, S: Tochterzelle bis $\frac{1}{4}$ der Größe der Mutterzelle, G_2 : Tochterzelle bis $\frac{1}{2}$ der Größe der Mutterzelle, M: Mutter- und Tochterzelle gleich groß). Tabelle 2.2 zeigt die Ergebnisse dieser Zählung in Prozent und als Balkendiagramm (blau – G_1 , rot – S, gelb – G_2 , grün – M).

Tabelle 2.2 Zellzyklus-Analyse der Xpo1-Mutanten nach Auszählung von jeweils 200 Zellen

Mutante	G_1 -Phase 	S-Phase 	G_2 -Phase 	M-Phase 	Balkendiagramm
Xpo1	7 %	26 %	21 %	47 %	
xpo1-1	17 %	23 %	35 %	25 %	
xpo1-101	13 %	31 %	27 %	29 %	
xpo1-112	15 %	21 %	31 %	33 %	
xpo1-127	26 %	29 %	18 %	28 %	
xpo1-134	21 %	22 %	19 %	39 %	
xpo1-140	20 %	30 %	31 %	20 %	

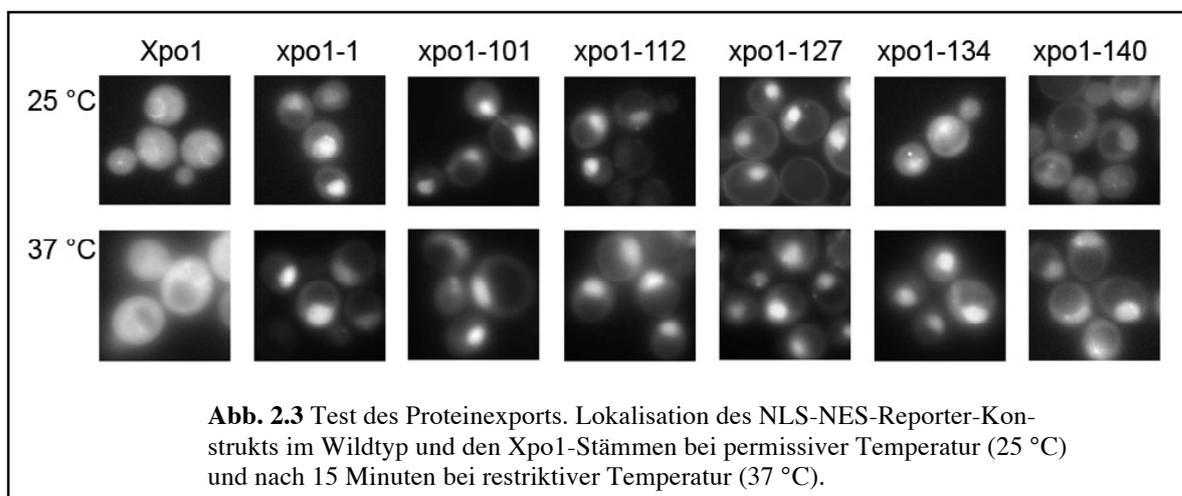
Die beobachteten Phänotypen waren sehr unterschiedlich. Bei allen Mutanten war die G_1 -Phase deutlich verlängert, besonders stark bei xpo1-127 (26 % im Vergleich zu 7 % im Wildtyp). Die Länge der S-Phase war kaum beeinflusst, die stärkste Abweichung zeigte hier xpo1-101 mit 31 % zu 26 % im Wildtyp. In xpo1-127 und xpo1-134 befanden sich vergleichbar viele Zellen in der G_2 -Phase wie im Wildtyp, der Anteil war vergrößert in xpo1-101, xpo1-112, xpo1-140 und am deutlichsten in xpo1-1 mit 35 % statt 21 % wie im Wildtyp. Im Gegensatz dazu war die M-Phase bei allen Mutanten verkürzt, bei xpo1-140 befanden sich sogar nur 20 % der Zellen statt 47 % wie im Wildtyp in der M-Phase.

Alle Xpo1-Mutanten sind funktional, da sie das Zellwachstum bei 25 °C ermöglichen. Etwas eingeschränkt ist dabei die Funktion von xpo1-1, das bereits bei permissiver Temperatur zu einem leichten Wachstumsdefekt führt. Bei höheren Temperaturen wird die Funktion aller Mutanten zunehmend vermindert, besonders bei xpo1-101, xpo1-134 und xpo1-140. Ein Zusammenhang mit der Verteilung der Punktmutationen ergibt sich nicht: xpo1-1 und xpo1-140 tragen Mutationen in der NES-Bindungsdomäne, xpo1-101 eine Mutation in der Ran-Bindungsdomäne, und die Mutationen in xpo1-134 liegen außerhalb dieser Domänen.

In der Verteilung der Zellzyklus-Stadien ist die erhöhte Anteil von Zellen in der G_1 -Phase in xpo1-127 und die reduzierte Anteil von Zellen in der M-Phase in xpo1-140 auffällig. Beide Stämme besitzen in der NES-Bindungsdomäne mutierte Xpo-Proteine, das ebenfalls dort mutierte xpo1-1-Protein hat jedoch kaum Einfluss auf die Verteilung der Zellzyklus-Stadien, so dass auch hier kein eindeutiger Zusammenhang zur Lage der Punktmutationen festzustellen ist.

2.1.3 Protein- und mRNA-Export

Xpo1 transportiert NES-haltige Substrate aus dem Zellkern ins Zytoplasma (Stade et al. 1997, Fukuda et al. 1997, Fornerod et al. 1997, Askjaer et al. 1998). Um zu testen, ob die Mutanten von Xpo1 in dieser Fähigkeit eingeschränkt sind, wurde ein NLS-NES-Reporter-Versuch durchgeführt (Stade et al. 1997). Dazu wurden die Xpo1-Stämme mit einem Plasmid transfiziert, das die NLS-Sequenz von SV40 und die NES-Sequenz von PKI trägt, gefolgt von zwei GFP-Sequenzen. Das exprimierte Protein ist zu groß für eine Diffusion durch die Kernporen und muss durch Karyopherine aktiv transportiert werden. Seine Lokalisation wurde im Fluoreszenz-Mikroskop bei permissiver Temperatur (25 °C) und nach 15 Minuten bei der für die Xpo1-Mutanten restriktiven Temperatur (37 °C) beobachtet (Abb. 2.3). Wenn bei erhöhter Temperatur der Export von Proteinen aus dem Kern eingeschränkt ist, sollte das GFP-Signal im Kern akkumulieren.



Im Wildtyp befand sich das GFP-Signal im Kern und im Zytoplasma, die Vakuolen blieben frei. Auch der Kernrand war erkennbar. Bei höherer Temperatur zeigte sich keine Veränderung, das Signal-Verhältnis zwischen Kern und Zytoplasma blieb gleich. In den Zellen der Stämme xpo1-1, xpo1-101, xpo1-112 und xpo1-127 war das Signal des Reporter-Konstrukts bereits bei permissiver Temperatur im Kern stärker als im Zytoplasma. Bei restriktiver Temperatur wurde dieser Effekt verstärkt, besonders deutlich bei xpo1-1 und xpo1-127. Die Stämme xpo1-134 und xpo1-140 zeigten bei 25 °C ein mit dem Wildtyp vergleichbares Verhältnis zwischen Kern- und Zytoplasma-Signal. Eine Erhöhung der Temperatur auf 37 °C führte hier jedoch zu einer Anreicherung des Reporter-Konstrukts im Kern. Die xpo1-140-Zellen zeigten zudem deutliche morphologische Defekte.

Xpo1 exportiert nicht nur Proteine, sondern ist auch am Export bestimmter mRNA-Moleküle aus dem Zellkern beteiligt (Stade et al. 1997, Watanabe et al. 1999). Die Xpo1-Mutanten wurden auf ihre Fähigkeit zum mRNA-Export durch *in situ*-Hybridisierung getestet. Bei 25 °C und 37 °C gewachsene Hefezellen wurden spheroblastiert und mit dig-markiertem Oligo-dT inkubiert, das an den Poly-A-Schwanz von mRNA-Molekülen hybridisiert. Die Lokalisation der mRNA-Moleküle kann durch Anti-dig-Antikörper sichtbar gemacht werden. Abbildung 2.4 zeigt fluoreszenz-mikroskopische Bilder der so behandelten Mutanten bei 25 °C und 37 °C. Eine DAPI-Färbung der Kerne ist für die Zellen bei 37 °C gezeigt.

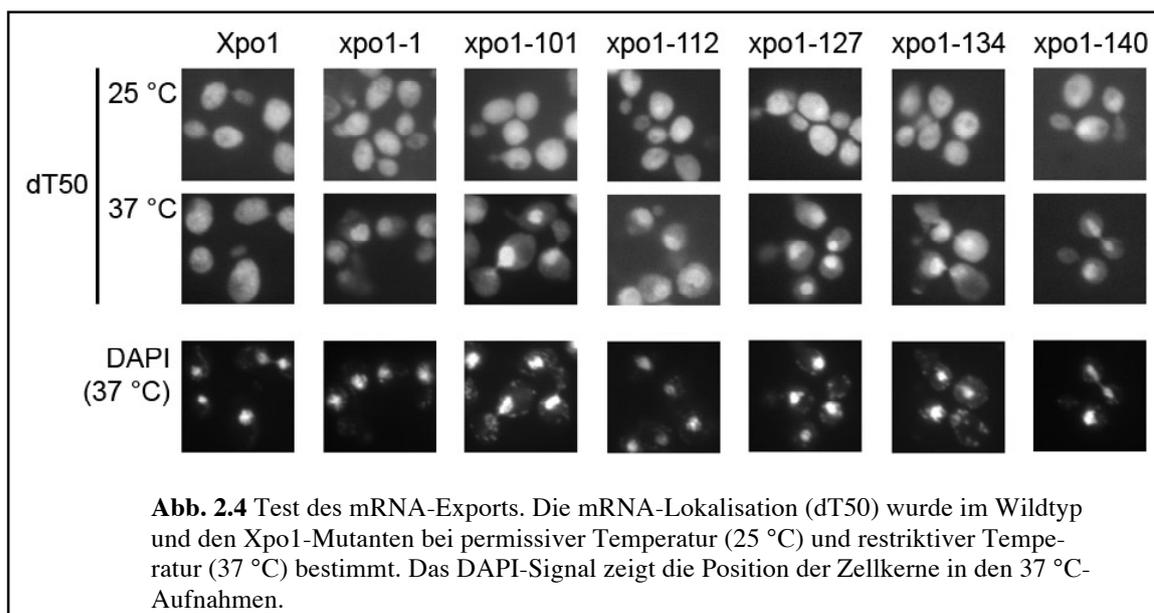


Abb. 2.4 Test des mRNA-Exports. Die mRNA-Lokalisation (dT50) wurde im Wildtyp und den Xpo1-Mutanten bei permissiver Temperatur (25 °C) und restriktiver Temperatur (37 °C) bestimmt. Das DAPI-Signal zeigt die Position der Zellkerne in den 37 °C-Aufnahmen.

Bei permissiver Temperatur zeigte sich in allen Zellen eine Färbung von Kern und Zytoplasma, die Vakuolen blieben frei. In xpo1-112- und xpo1-140-Zellen war das mRNA-Signal bereits im Kern etwas stärker als im Zytoplasma. Bei restriktiver Temperatur änderte sich die Signalverteilung im Wildtyp nicht. In allen Mutanten war dagegen eine deutliche Akkumulation der mRNA im Kern zu beobachten. Dieser Effekt war besonders stark in den Stämmen xpo1-101, xpo1-127 und xpo1-140.

Zellen der Stämme xpo1-1, xpo1-127 und xpo1-140 tragen Punktmutationen in der NES-Bindungsdomäne, die eine Beeinträchtigung des Protein-Exports erwarten lassen. Dies ist bei xpo1-1 und xpo1-127 bereits bei permissiver Temperatur und stärker bei restriktiver Temperatur der Fall. Die xpo1-140-Mutante bewirkt erst bei höherer Temperatur einen Defekt im Protein-Export. Aber auch die xpo1-112-Mutante, die keine Punktmutation in der NES-Bindungsdomäne hat, zeigt einen deutlichen Export-Defekt bereits bei permissiver Temperatur.

xpo1-127- und xpo1-140-Zellen weisen außer dem Defekt im Protein-Export auch einen eingeschränkten mRNA-Export auf. Die xpo1-1-Mutante, die ebenfalls eine Punktmutation in der NES-Bindungsdomäne trägt, zeigt zwar einen starken Defekt im Proteinexport, aber eine im Vergleich zu xpo1-127 und xpo1-140 schwächere Einschränkung des mRNA-Exports.

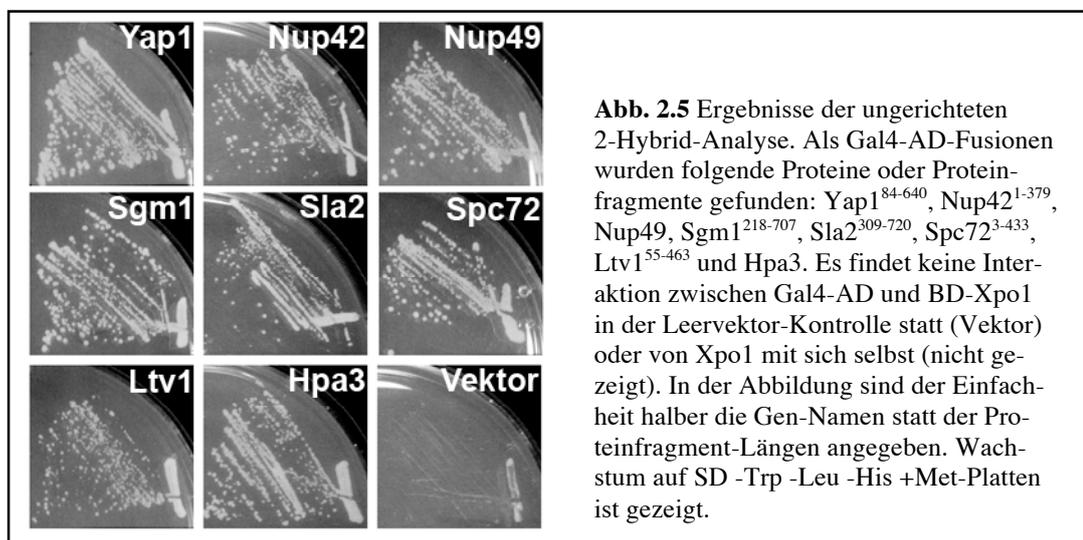
Die xpo1-101-Mutante besitzt eine Punktmutation in der Ran-Bindungsdomäne, was eine generelle Einschränkung der Export-Funktion erwarten lässt. Der Effekt auf den mRNA-Export ist deutlich, auf den Protein-Export jedoch geringer als in den Mutanten der NES-Bindungsdomäne xpo1-1, xpo1-127 und xpo1-140.

Eine eindeutige Korrelation zwischen der Lage der Punktmutationen und den beobachteten Phänotypen ist vordergründig nicht ersichtlich.

2.2 Suche nach neuen Interaktionspartnern von Xpo1

2.2.1 Ungerichtete 2-Hybrid-Analyse

Xpo1 spielt eine bedeutende Rolle im Kernexport, es ist eines der vier essentiellen Karyopherine in der Hefe *S. cerevisiae* (Görllich & Kutay 1999). Trotz dieser herausragenden Funktion waren zu Beginn dieser Arbeit nur wenige Export-Substrate von Xpo1 bekannt. Zur Identifikation neuer Interaktionspartner wurde eine ungerichtete 2-Hybrid-Analyse (James et al. 1996) durchgeführt (Abb. 2.5). Dabei wurde die kodierende Sequenz für die DNA-bindende Region des GAL4-Proteins an das gesamte offene Leseraster für *XPO1* fusioniert. Eine Bank kodierender Sequenzen für zu testende Proteine wurde an die Transkriptions-aktivierende Domäne von GAL4 fusioniert. Findet eine Interaktion eines Proteins mit Xpo1 statt, gelangen die beiden Domänen von GAL4 in direkte räumliche Nähe und können so die Expression eines Reporter-Gens auslösen. Sein Produkt erlaubt das Wachstum auf Reporter-Platten. Es fand keine Aktivierung von Xpo1 mit sich selbst oder mit leerem Vektor statt.



Insgesamt 32 Plasmide, die für acht verschiedene Proteine oder Proteinfragmente kodieren, erlaubten das Wachstum auf Reporter-Platten. Die Ergebnisse ihrer Sequenzierung sind in Tabelle 2.3 zusammengefaßt. Es wurden die Proteine Nup42, Yap1, Sgm1, Spc72, Hpa3, Ltv1, Sla2 und Nup49 gefunden.

Tabelle 2.3 Ergebnisse der ungerichteten 2-Hybrid-Analyse

offenes Leseraster	kodiertes Protein	Häufigkeit des Auftretens	Länge des Fragments (AS)	Länge des Proteins (AS)
YDR192C	Nup42	11x	1 – 379	430
YML007W	Yap1	8x	84 – 640	650
YJR134C	Sgm1	4x	218 – 707	707
YEL066W	Hpa3	3x	1 – 179	179
YKL143W	Ltv1	2x	55 – 463	463
YAL047C	Spc72	2x	3 – 433	622
YGL172W	Nup49	1x	1 – 472	472
YNL243W	Sla2	1x	309 – 720	968

Die Wechselwirkungen von Xpo1 mit Yap1, Nup42 und Nup49 sind bereits bekannt. Dies bestätigt die Aussagefähigkeit der verwendeten Analyse. Yap1 ist ein Xpo1-Exportsubstrat. Der bZIP-Transkriptionsfaktor wird bei oxidativem Stress in den Kern transportiert und enthält eine Leucin-reiche NES (Yan et al. 1998, Kuge et al. 1997). Nup42 und Nup49 sind Bestandteile der Kernporen (Stutz et al. 1995, Wentz et al. 1992), die Phenylalanin-Glycin-reiche Regionen enthalten (Fabre & Hurt 1997, Wimmer et al. 1992). Xpo1 wechselwirkt mit diesen strukturellen Komponenten auf seiner Passage durch die Kernpore (Fornerod et al. 1997, Neville et al. 1997).

Bisher unbekannte Interaktionspartner von Xpo1 sind Hpa3, Sgm1, Sla2 und Spc72. Für Ltv1 konnte kürzlich eine Rolle im Xpo1-abhängigen Export kleiner ribosomaler Untereinheiten gezeigt werden (Seiser et al. 2006). Hpa3 ist eine D-Aminosäure-N-acetyltransferase (Yow et al. 2004). Dem an COPI-coated Vesikeln und dem Golgi-Apparat lokalisierenden Sgm1 konnte noch keine Funktion zugeordnet werden (Entian et al. 1999, Huh et al. 2003). Sla2 ist als Actin-bindendes Protein am Zusammenbau des Membran-Zytoskeletts beteiligt (Yang et al. 1999). Spc72 bindet auf der zytosolischen Seite des Spindelpolkörpers den γ -Tubulin-Komplex, an dem zytoplasmatische Mikrotubuli polymerisieren (Knop & Schiebel 1998). Sgm1 und Spc72 wurden auch in anderen 2-Hybrid-Analysen als Xpo-Interaktionspartner gefunden (Uetz et al. 2000, Ito et al. 2001), aber diese Wechselwirkungen wurden dort nicht weiter untersucht.

2.2.2 Lokalisation der putativen Interaktionspartner

Die in der ungerichteten 2-Hybrid-Analyse gefundenen putativen Interaktionspartner von Xpo1 wurden als GFP-Fusionsproteine exprimiert (Longtine et al. 1998). In einem Hefestamm, der nur Leptomycin B-sensitives Xpo1 exprimiert (Xpo1-T539C, Neville & Rosbash 1999), wurde ihre Lokalisation in Abwesenheit und Gegenwart von Leptomycin B im Fluoreszenz-Mikroskop überprüft (Abb. 2.6). Leptomycin B blockiert spezifisch den Xpo1-abhängigen Export, in dem es kovalent an Xpo1 bindet (Kudo et al. 1999). Wenn die in der 2-Hybrid-Analyse gefundenen Proteine in einem Xpo1-abhängigen Prozess aus dem Zellkern transportiert werden, sollten sie nach Leptomycin B-Behandlung im Kern akkumulieren, da sie nicht mehr exportiert werden können. Die Wirkung von Leptomycin B wurde an GFP-markiertem Yap1 überprüft, das bereits nach 15 Minuten im Kern akkumuliert (nicht gezeigt).

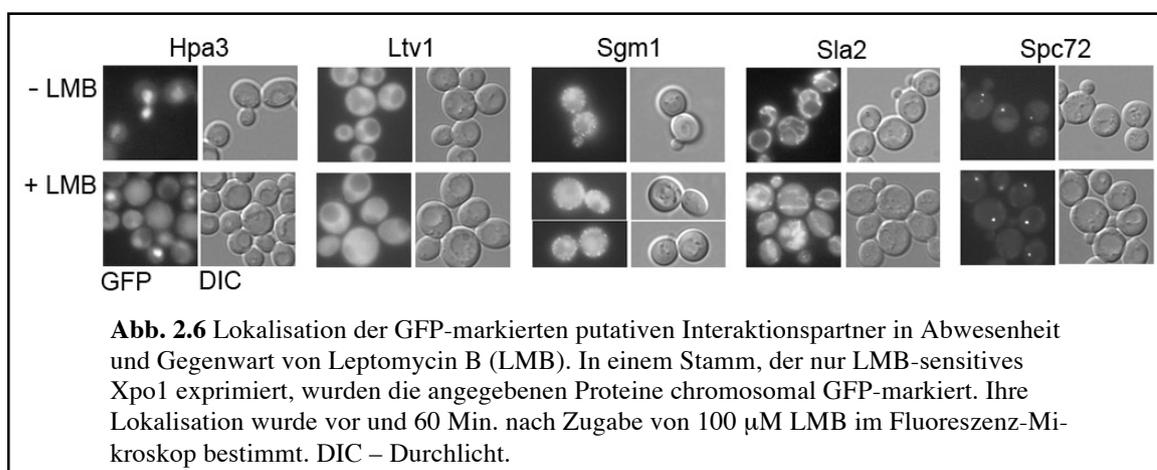


Abb. 2.6 Lokalisation der GFP-markierten putativen Interaktionspartner in Abwesenheit und Gegenwart von Leptomycin B (LMB). In einem Stamm, der nur LMB-sensitives Xpo1 exprimiert, wurden die angegebenen Proteine chromosomal GFP-markiert. Ihre Lokalisation wurde vor und 60 Min. nach Zugabe von 100 μ M LMB im Fluoreszenz-Mikroskop bestimmt. DIC – Durchlicht.

Die Lokalisationen der GFP-markierten Proteine stimmten mit Angaben in der Literatur überein, soweit sie beschrieben sind. Hpa3 war hauptsächlich im Zellkern lokalisiert, auch das Zytoplasma zeigt ein Signal. Ltv1 befand sich gleichmäßig im Zytoplasma verteilt, Kerne und Vakuolen waren frei. Die Markierung von Sgm1 mit GFP zeigte viele kleine punktförmige Signale entlang der Zellwand und im Zytoplasma, dabei könnte es sich um COPI-coated Vesikel und den Golgi-Apparat handeln. Das Sla2-Signal bildete lange faden-artige Strukturen, die sich durch das Zytoplasma ziehen und Actin-Kabeln ähneln. Spc72 war ausschließlich in ein oder zwei Punkten in der Kernmembran lokalisiert.

Bis zu 60 Minuten nach Zugabe von Leptomycin B konnte mit dieser Methode keine Veränderung in der Lokalisation der markierten Proteine festgestellt werden und es tritt keine Anreicherung des Signals im Zellkern auf. Die Proteine wurden nicht überexprimiert, deshalb ist bei geringer Expressionsrate eine Anreicherung verteilt über das große Volumen des Zellkerns möglicherweise nicht nachweisbar. Dies kann insbesondere für Spc72 zutreffen, das in nur etwa 600 Kopien pro Zelle vorliegt (Yeast GFP Fusion Localization Database, UCSF). Da mehrere Arbeiten einen Zusammenhang zwischen der Kernexport-Maschinerie und den Strukturkomponenten der Chromosomen-Verteilung nahelegen (Budhu & Wang 2005, Arnaoutov et al. 2005, Wang et al. 2005), und da Xpo1 am Spindelpolkörper lokalisiert (siehe 2.3), wurde die Spindelpolkörper-Komponente Spc72 trotz des negativen Ergebnisses der Leptomycin B-Analyse weiter untersucht.

2.2.3 Gerichtete 2-Hybrid-Analyse

Spc72 befindet sich an der zytosolischen Seite des Spindelpolkörpers und dient dort als Bindestelle für den γ -Tubulin-Komplex (Knop & Schiebel 1998), der aus Spc97, Spc98 und zwei Molekülen γ -Tubulin (Tub4) besteht (Pereira et al. 1998, Vinh et al. 2002). Auf der nukleären Seite des Spindelpolkörpers verankert Spc110 den γ -Tubulin-Komplex (Kilmartin & Goh 1996, Knop & Schiebel 1997, Nguyen et al. 1998). In der ungerichteten 2-Hybrid-Analyse wurde eine dieser Komponenten, Spc72, als Interaktionspartner von Xpo1 gefunden. Um zu testen, ob Xpo1 auch mit Spc110 und / oder den Komponenten des γ -Tubulin-Komplexes wechselwirkt, wurde eine gerichtete 2-Hybrid-Analyse durchgeführt (Abb. 2.7).

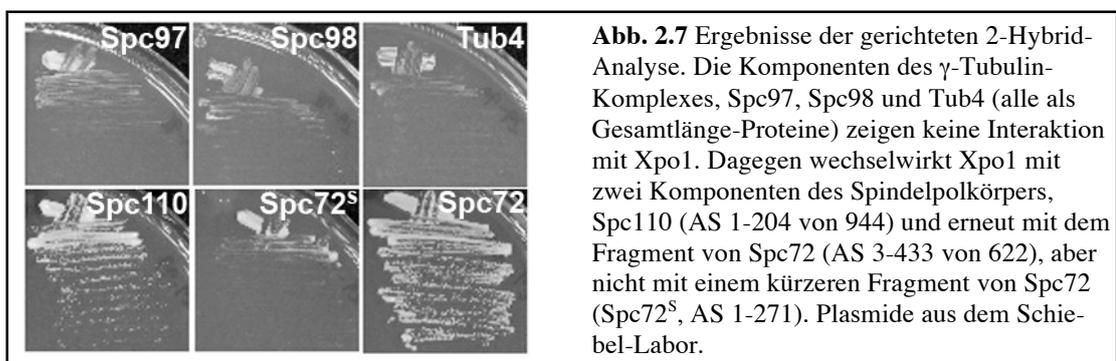


Abb. 2.7 Ergebnisse der gerichteten 2-Hybrid-Analyse. Die Komponenten des γ -Tubulin-Komplexes, Spc97, Spc98 und Tub4 (alle als Gesamtlänge-Proteine) zeigen keine Interaktion mit Xpo1. Dagegen wechselwirkt Xpo1 mit zwei Komponenten des Spindelpolkörpers, Spc110 (AS 1-204 von 944) und erneut mit dem Fragment von Spc72 (AS 3-433 von 622), aber nicht mit einem kürzeren Fragment von Spc72 (Spc72^S, AS 1-271). Plasmide aus dem Schiebel-Labor.

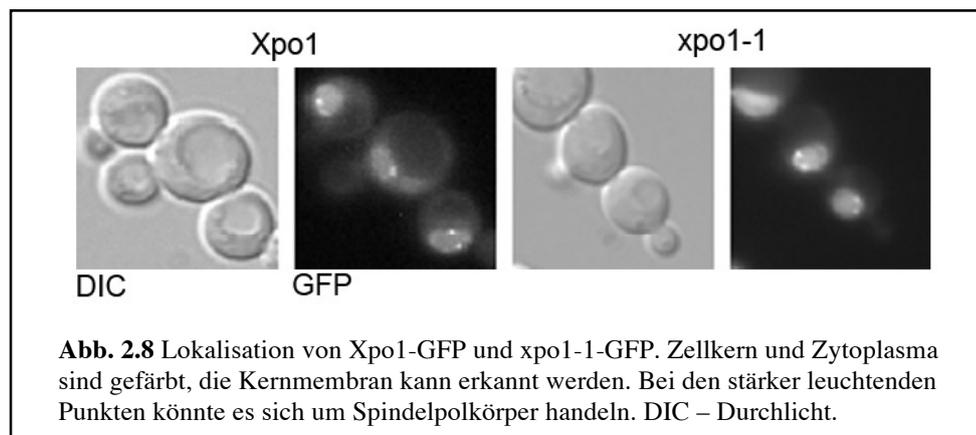
Xpo1 zeigte keine Wechselwirkung mit den Bestandteilen des γ -Tubulin-Komplexes, Spc97, Spc98 und γ -Tubulin (Tub4). Die Wechselwirkung mit dem Fragment von Spc72 konnte bestätigt werden. Ein kürzeres Fragment von Spc72 (Spc72^S, Amino-

säuren 1–271 von 622) war hingegen nicht in der Lage, Wachstum auf Reporterplatten zu vermitteln. Jedoch zeigte sich eine Wechselwirkung von Xpo1 mit dem N-Terminus von Spc110 (Aminosäuren 1–204 von 944), die schwächer zu sein schien als die mit Spc72.

2.3 Lokalisation von Xpo1

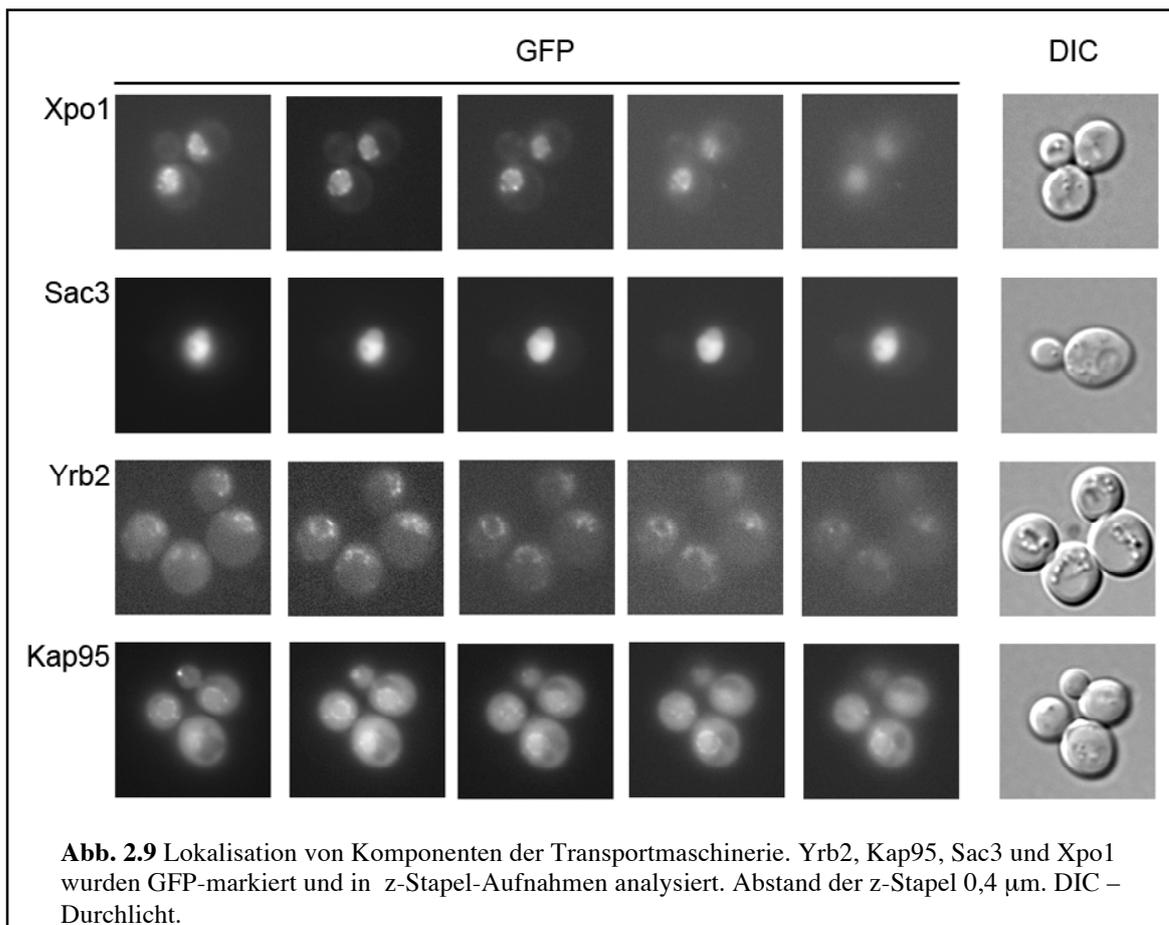
2.3.1 Lokalisation von Xpo1-GFP und anderen Transport-Komponenten

Da ein Bestandteil des Spindelpolkörpers in der ungerichteten 2-Hybrid-Analyse gefunden wurde und in der Literatur die Lokalisierung von Xpo1-Orthologen höherer Eukaryonten am entsprechenden Organell beschrieben ist, wurde die Lokalisierung von Xpo1 untersucht. Dazu wurden Zellen, die als einzige Xpo1-Kopie GFP-markiertes Xpo1 (KSY68) bzw. xpo1-1 (KSY69) von einem Plasmid exprimieren, im Fluoreszenz-Mikroskop analysiert (Abb. 2.8). Xpo1-GFP lokalisierte im Zytoplasma und etwas stärker im Zellkern. Die Vakuolen zeigten kein GFP-Signal. Viele kleine Punkte an der Grenze zwischen Zellkern und Zytoplasma wiesen auf die Lokalisation von Xpo1 an den Kernporen hin. Zusätzlich konnten hier ein bis zwei stärker leuchtende Punkte beobachtet werden, bei denen es sich um Spindelpolkörper handeln könnte. Gleiches gilt für die Lokalisation der xpo1-1-Mutante, auch hier waren deutlich ein bis zwei intensivere punktförmige Signale an der Kernmembran erkennbar.



Um zu zeigen, dass dieses Lokalisationsmuster, insbesondere die beiden stärkeren punktförmigen Signale, Xpo1-spezifisch sind, wurden weitere Komponenten der Transportmaschinerie GFP-markiert (Abb. 2.9). Kap95, das Importin β -Ortholog der Hefe (Iovine et al. 1995), wurde als ein weiteres Mitglied der Karyopherin-Familie ausgewählt. Sac3 ist ein Kernporen-assoziiertes Protein, das am mRNA-Export beteiligt ist (Lei et al. 2003). Als Beispiel eines nukleären Proteins diente Yrb2, das die Bildung von Export-Komplexen im Zellkern erleichtert (Yan et al. 1998, Kuge et al. 1997). Fluoreszenz-mikroskopische z-Stapel-Aufnahmen im Abstand von 0,4 μm wurden angefertigt.

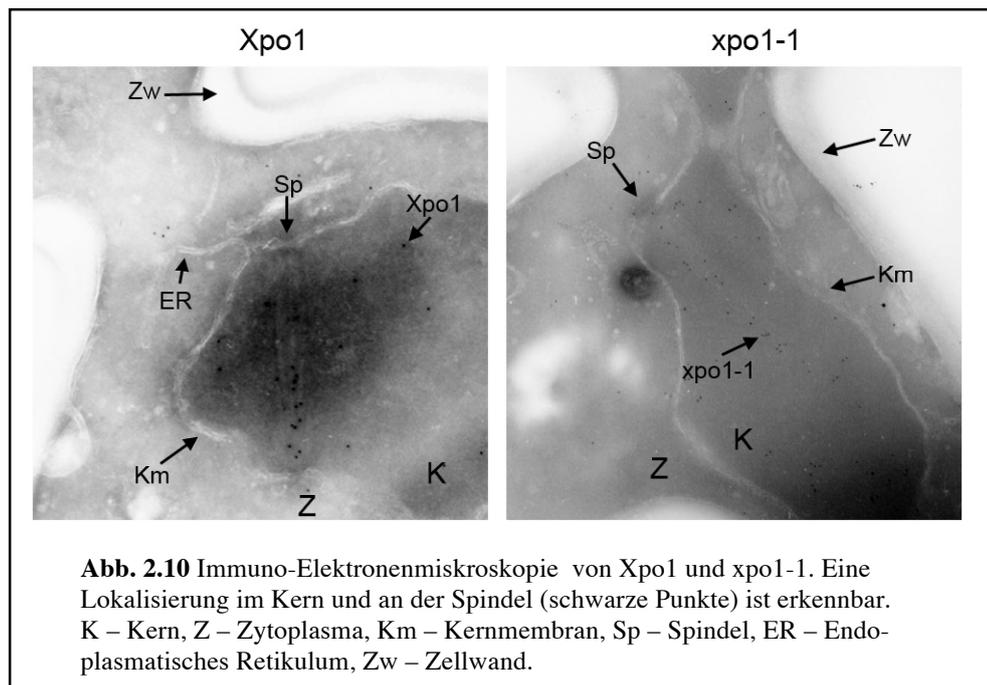
Kap95 zeigte wie erwartet eine sehr ähnliche Lokalisation wie Xpo1. Auch hier waren die Kerne etwas stärker gefärbt als das Zytoplasma, der Kernrand war erkennbar. Sac3 lokalisierte als Kernporen-assoziiertes Protein ausschließlich am Kernrand. Yrb2 befand



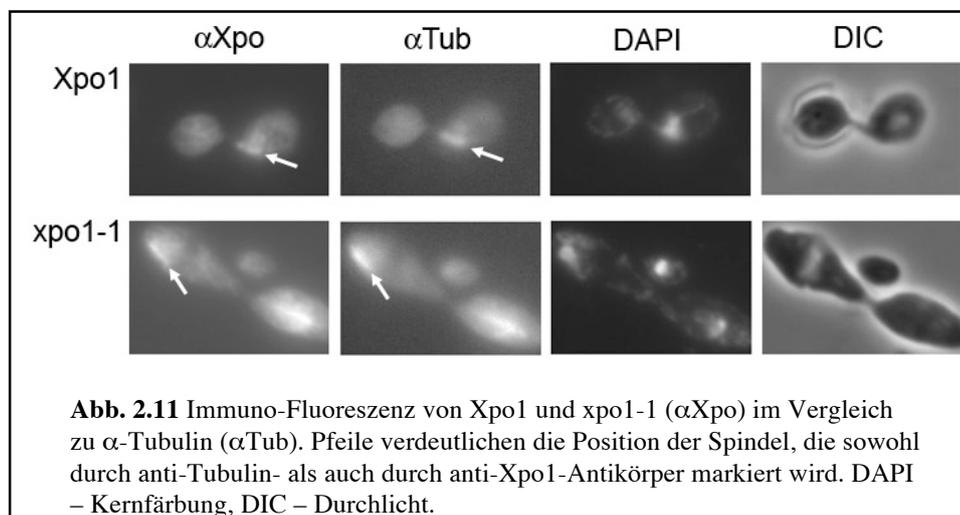
sich dagegen wie in der Literatur beschrieben vollständig im Kern. Die stärkeren punktförmigen Signale fanden sich nur in Xpo1-GFP. Damit sind sie kein generelles Merkmal der Lokalisation von Karyopherinen oder anderen Komponenten der Transportmaschinerie, sondern spezifisch für Xpo1.

2.3.2 Immuno-Elektronenmikroskopie und Immuno-Fluoreszenz von Xpo1

Bei den stärker leuchtenden punktförmigen Signalen von Xpo1-GFP könnte es sich um eine Lokalisation am Spindelpolkörper oder um unspezifische Aggregate handeln. Um letzteres auszuschließen, wurde die Lokalisation von Xpo1 (KSY57) und xpo1-1 (KSY56) mit der sensitiveren Methode der Immuno-Elektronenmikroskopie (Frank Vogel, Max-Delbrück-Centrum Berlin) bestimmt (Abb. 2.10). Abgebildet sind Ausschnitte aus einzelnen Hefezellen. Die starke Zellwand ist erkennbar, ebenso der im Verhältnis zum Zytoplasma dunkler gefärbte Kern mit seiner Kernmembran. Im Xpo1-Bild ist eine vollständige Spindel mit den in der Kernmembran eingebetteten Spindelpolkörpern zu erkennen, im xpo1-1-Bild ist die Spindel angeschnitten. Die mit Goldkörnchen markierten Xpo1-Antikörper erscheinen in der Abbildung als schwarze Punkte. Sie lokalisieren im Zellkern und entlang der Spindel, vereinzelt auch im Zytoplasma.



Die Lokalisation entlang der Spindel konnte mit GFP-markierten Proteinen nicht dargestellt werden. Deshalb wurde eine weitere Methode zur Protein-Lokalisation, die Immuno-Fluoreszenz, auf den Wildtyp- und den xpo1-1-Stamm angewendet (Abb. 2.11).



Spheroblastierte und fixierte Zellen wurden mit Anti-Xpo1- und Anti-Tub1-Antikörpern behandelt. Fluoreszenzmarkierte sekundäre Antikörper machen die Lokalisation von Xpo1, xpo1-1 und α -Tubulin sichtbar. Die DAPI-Färbung verdeutlicht die Kernposition. Xpo1 und xpo1-1 lokalisieren auch hier stärker im Zellkern als im Zytoplasma. Ihre Signale überlappen mit dem Tub1-Signal, was die in der Immuno-Elektronenmikroskopie gezeigte Lokalisation von Xpo1 und xpo1-1 an der Spindel bestätigt.

Mit beiden Methoden, die sensitiver sind als eine GFP-Lokalisierung, ergaben sich keine Hinweise auf eine Aggregatbildung von Xpo1 im Bereich der Kernmembran. Sie

zeigen dagegen zusätzlich ein Xpo1-Signal entlang der Spindel. Die Spindelpolkörper sind in beiden Methoden schwierig darzustellen, deshalb ist eine Lokalisierung von Xpo1 hier nicht erkennbar.

Die stärkeren punktförmigen GFP-Signale sind somit nicht auf unspezifische Aggregatbildung zurückzuführen, sondern weisen auf eine funktionelle Lokalisation von Xpo1 hin.

2.3.3 Co-Lokalisation von Xpo1-YFP und Spc29-CFP

Zur Identifizierung der stärkeren punktförmigen Signale von Xpo1-GFP wurde ein Stamm erzeugt, in dem Spc29, ein Protein der zentralen Platte des Spindelpolkörpers, und Xpo1 in fluorophor-markierter Form vorliegen. Befinden sich in einer Zelle zwei

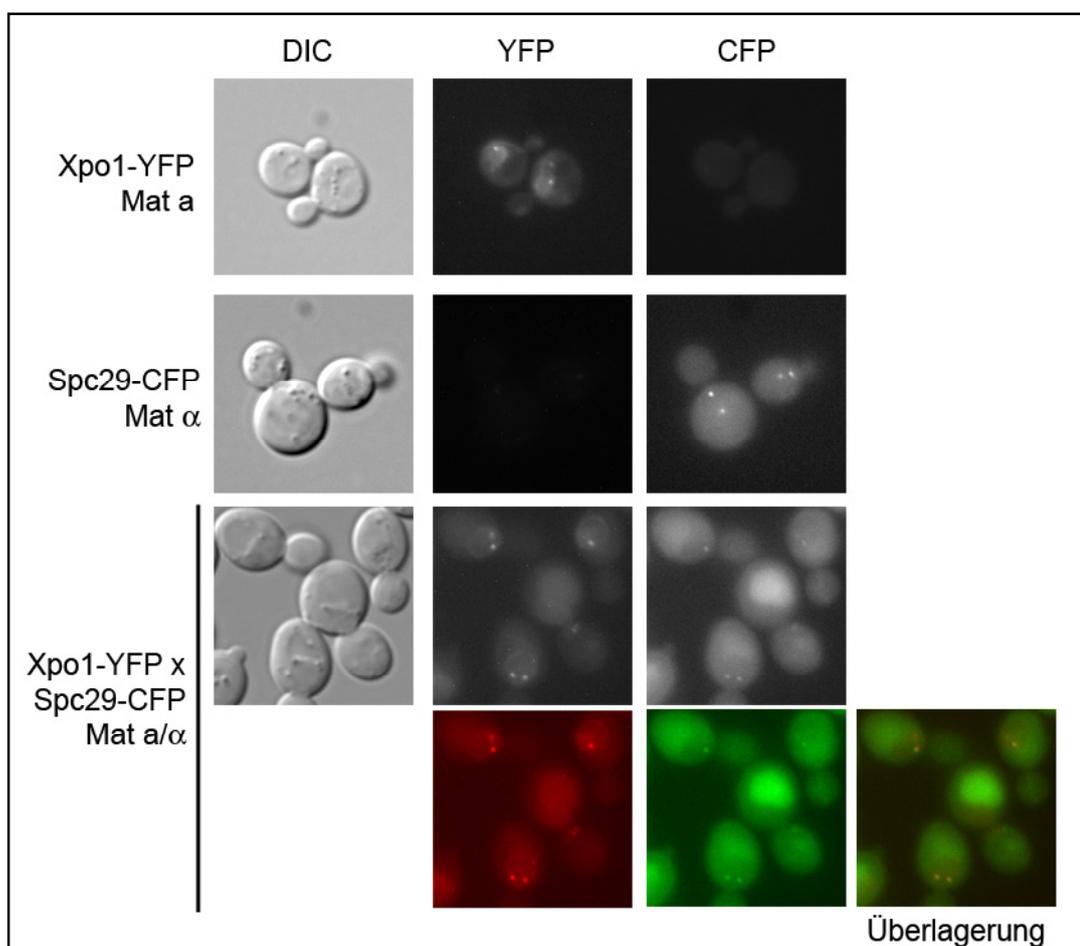
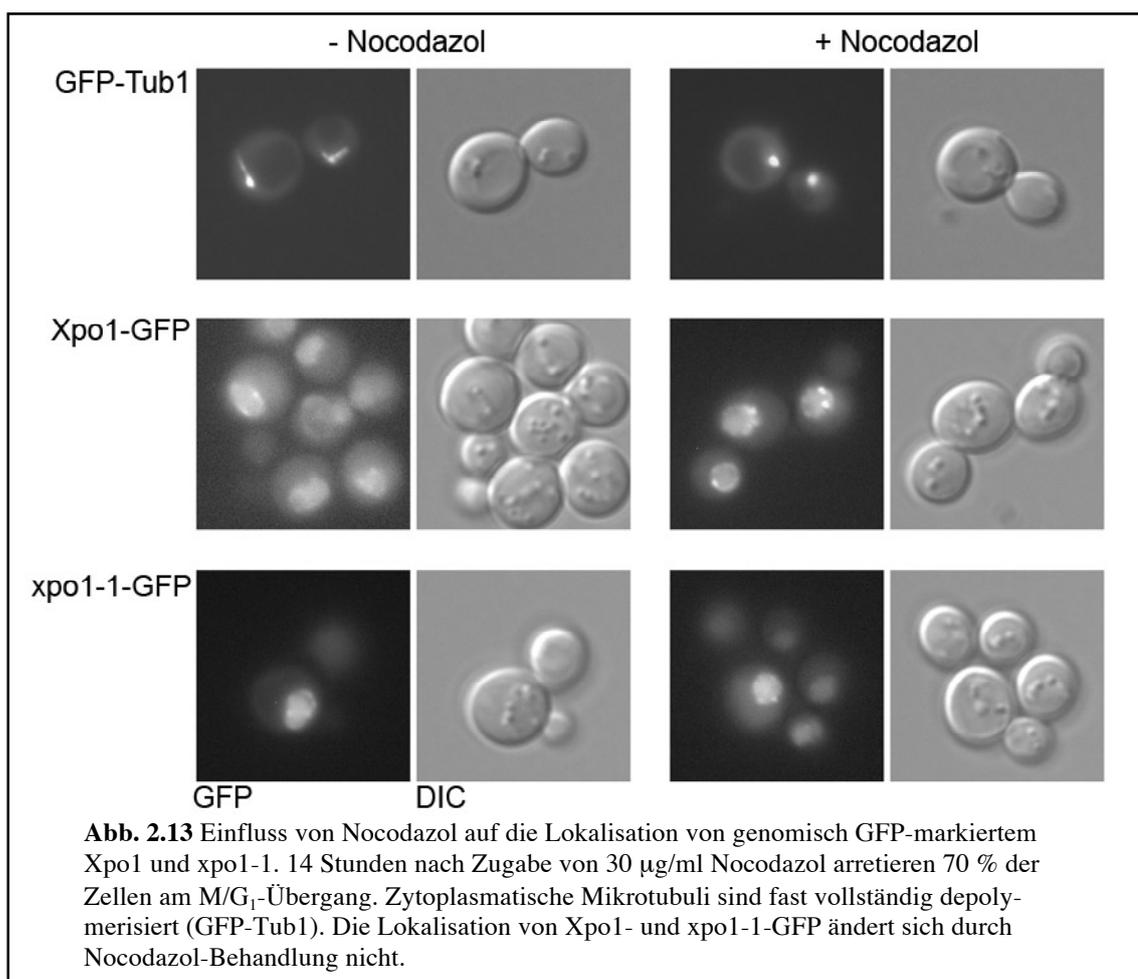


Abb. 2.12 Co-Lokalisation von Xpo1-YFP und Spc29-CFP, einem Bestandteil der zentralen Platte des Spindelpolkörpers. Xpo1 wurde in einem haploiden Stamm YFP-markiert (Xpo1-YFP Mat a). Das typische Xpo1-Signal ist im YFP-Kanal, aber nicht im CFP-Kanal sichtbar. In einem weiteren haploiden Stamm wurde Spc29 CFP-markiert (Spc29-CFP Mat α), das nur im CFP-Kanal sichtbar ist und ausschließlich an den Spindelpolkörpern lokalisiert. Der durch Kreuzung entstandene diploide Stamm zeigt Signale in beiden Kanälen. In der Überlagerung der Falschfarben-Darstellung überlappen die Signale von Xpo1 und Spc29, so dass sich ein gelbes Signal an den Spindelpolkörpern zeigt. DIC – Durchlicht.

mit verschiedenen Fluorophoren markierte Proteine dicht beieinander, überlappen sich ihre Signale. Dies kann in einer Falschfarben-Überlagerung dargestellt werden. Zunächst wurde Xpo1 in einem haploiden Stamm mit YFP markiert (Abb. 2.12, Xpo1-YFP Mat a). Im YFP-Kanal zeigte sich das bekannte Bild der Xpo1-Lokalisation im Kern und am Kernrand mit den punktförmigen Signalen. Im CFP-Kanal war Xpo1-YFP nicht sichtbar. In einem zweiten haploiden Stamm wurde Spc29 CFP-markiert. Es lokalisierte ausschließlich an den Spindelpolkörpern. Sein Signal war nur im CFP-Kanal, aber nicht im YFP-Kanal sichtbar. Diese beiden Stämmen wurden gekreuzt (Xpo1-YFP x Spc29-CFP Mata/ α). Abbildung 2.12 zeigt das YFP- und CFP-Signal des diploiden Stammes in schwarz-weiß und in einer Falschfarben-Darstellung mit dem YFP-Signal in rot und dem CFP-Signal in grün. In der Überlagerung dieser Bilder ist an den Spindelpolkörpern ein gelbes Signal sichtbar. Xpo1 und Spc29 befinden sich in der Zelle also so nah beieinander, dass sich ihre Lokalisation mit dieser Methode nicht auflösen lässt.

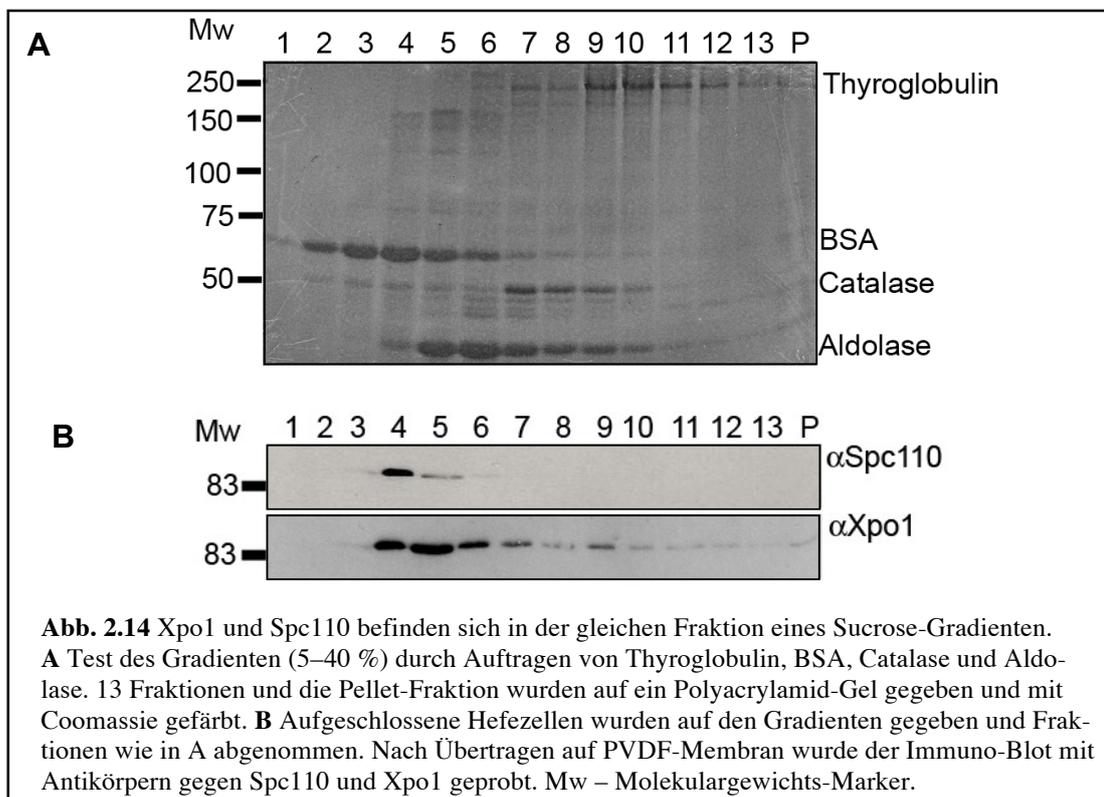
Um zu zeigen, dass Xpo1 tatsächlich am Spindelpolkörper und nicht an den Minus-Enden der Mikrotubuli lokalisiert, wurde Nocodazol zu Stämmen gegeben, die genomisch GFP-markiertes Xpo1 und xpo1-1 tragen (Abb. 2.13). Nocodazol ist eine Mikrotubuli-depolymerisierende Droge, die zu einem Zellzyklus-Arrest am M/G₁-Übergang führt (Amon 2002). Zur Überprüfung der Nocodazol-Wirkung wurden Wildtyp-Zellen unter



sucht, die genomisch GFP-markiertes α -Tubulin exprimieren. 14 Stunden nach Zugabe von 30 $\mu\text{g/ml}$ Nocodazol waren 70 % der Wildtyp-Zellen hantelförmig und wiesen keine zytoplasmatischen Mikrotubuli mehr auf. In der Kontrolle ohne Nocodazol-Behandlung waren dagegen nur 10 % der Zellen hantelförmig, und diese besaßen zytoplasmatische Mikrotubuli. Die Nocodazol-Behandlung hatte also den erwarteten Effekt. Zellen, die Xpo1-GFP und xpo1-1-GFP exprimieren, wurden entsprechend behandelt. Sie zeigten erneut ein deutliches Signal im Zellkern sowie eine Färbung des Zytoplasmas und des Kernrands. Die ein bis zwei stärkeren punktförmigen Signale am Kernrand traten in den mit Nocodazol behandelten Zellen ebenso wie in unbehandelten Zellen auf. Damit konnte gezeigt werden, dass Xpo1 an den Spindelpolkörpern in *S. cerevisiae* lokalisiert, und eine Depolymerisation der zytoplasmatischen Mikrotubuli keinen Einfluss auf diese Lokalisation hat.

2.3.4 Co-Fraktionierung von Xpo1 und Spc110 im Sucrose-Gradienten

Zur Verifizierung der Xpo1-Lokalisation am Spindelpolkörper unabhängig von GFP-Markierungen wurde einerseits eine Co-Immünpräzipitation von Xpo1 und Spc72 in Zellextrakten durchgeführt. Andererseits wurde versucht, rekombinant exprimiertes GST-Spc72 mit einem Zellextrakt zu inkubieren (GST-Pulldown-Versuch). Beides war aufgrund der geringen Expression von Spc72-GFP in der Zelle, des Fehlens spezifischer Antikörper gegen Spc72 und der Zerstörung des Ran-Gradienten während der Präparation nicht erfolgreich. Deshalb wurde geprüft, ob Xpo1 mit einer anderen Komponente des Spindelpolkörpers, Spc110, in einem Sucrose-Gradienten in derselben Fraktion sedimentiert. Zum Test des Gradienten wurden BSA, Aldolase, Catalase und Thyroglobulin (Stokes-Radien 3,5 / 4,6 / 5,2 und 8,6 nm) auf einen 5–40 %igen Sucrose-Gradienten gegeben (Abb. 2.14 A). Nach Zentrifugation wurden 13 Fraktionen abgenommen und

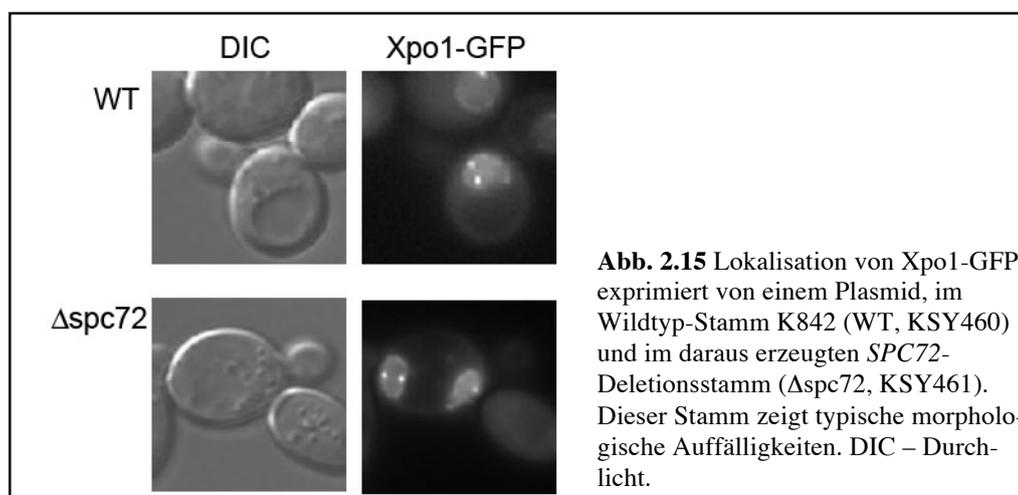


die Proteine wie in der Pellet-Fraktion durch Zugabe von TCA präzipitiert. Die Proteine wurden auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und dieses mit Coomassie gefärbt. Die Verteilung der Kontroll-Proteine entsprach den Literatur-Angaben (Song et al. 1996), die Methode ist also geeignet, Proteine nach ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit aufzutrennen.

Zur Analyse von Xpo1 und Spc110 wurden Hefezellen mit Glaskugeln aufgeschlossen und der Zellextrakt auf dem Gradienten getrennt (Abb. 2.14 B). Wie in A wurden nach Zentrifugation 13 Fraktionen abgenommen und wie die Pellet-Fraktion TCA-präzipitiert. Die Proben wurden auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und auf PVDF-Membran übertragen. Der Immuno-Blot wurde mit Anti-Xpo1- und Anti-Spc110-Antikörpern dekoriert. In dieser Fraktionierung befand sich Spc110 hauptsächlich in Fraktion 4, zu einem geringeren Teil auch in Fraktion 5. Xpo1 war über mehrere Fraktionen verteilt und trat hauptsächlich in den Fraktionen 4 bis 6 auf. Ein Teil des Xpo1-Pools der Zelle sedimentiert also in der gleichen Fraktion wie ein Bestandteil des Spindelpolkörpers.

2.3.5 Lokalisation von Xpo1-GFP im *SPC72*-Deletionsstamm

Da Xpo1 in der 2-Hybrid-Analyse mit Spc72 und Spc110 interagiert, könnte seine Lokalisation am Spindelpolkörper über diese Proteine vermittelt werden. Eine Deletion von *SPC110* ist nicht lebensfähig (Kilmartin & Goh 1996). Eine Deletion von *SPC72* ist im Stamm-Hintergrund DF5 letal, im K842-Hintergrund hingegen möglich. Abbildung 2.15 zeigt die Lokalisation von Xpo1-GFP exprimiert von einem Plasmid im Stamm-Hintergrund K842 und in der daraus erzeugten Deletion von *SPC72* (Δ spc72). Die Xpo1-Lokalisation war ununterscheidbar von der im DF5-Hintergrund (Abb. 2.8). Wird im K842-Hintergrund das *SPC72*-Gen durch Insertion eines auxotrophen Markers zerstört, kommt es zu morphologischen Defekten wie falsch positionierten Kernen und zweikernigen Zellen. Obwohl Spc72 und Xpo1 in der 2-Hybrid-Analyse als Interaktionspartner identifiziert wurden, beeinflusst die Deletion von *SPC72* die Lokalisation von Xpo1 am Spindelpolkörper nicht. Mindestens ein anderes Protein, bei dem es sich



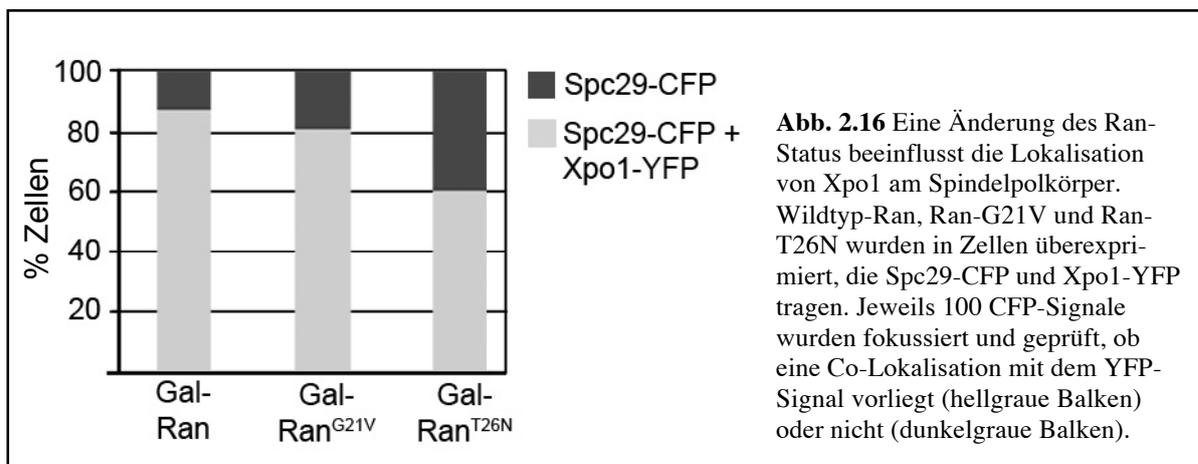
um Spc110 handeln könnte, muss also die Lokalisation von Xpo1 am Spindelpolkörper vermitteln. Eine Bindung an Spc72 ist nicht auszuschließen.

2.3.6 Einfluss von Ran auf die Lokalisation von Xpo1

Xpo1 interagiert zum einen über eine NES mit Substraten, zum anderen über Phenylalanin-Glycin-(FG)-Wiederholungen mit strukturellen Komponenten der Kernporen. In den Sequenzen der bekannten Spindelpolkörper-Proteine finden sich keine FG-Wiederholungen, die Lokalisation von Xpo1 könnte dort also über eine NES vermittelt werden. Da die NES-Sequenz nur schwach konserviert ist (Görlich & Kutay 1999), lassen sich NES-ähnliche Sequenzmotive in vielen Proteinen finden.

Die Komplexbildung von Xpo1 mit seinen Substraten erfolgt nur in Gegenwart von Ran-GTP (Maurer et al. 2001). Eine Änderung des Ran-Status sollte also die Lokalisation von Xpo1 am Spindelpolkörper beeinflussen, wenn diese NES-abhängig ist. Abbildung 2.16 zeigt ein Experiment zur Überprüfung dieser Hypothese.

Wildtyp-Ran, Ran-G21V und Ran-T26N wurden von Plasmiden (Schlenstedt 1995b) überexprimiert und der Einfluss auf die Co-Lokalisation von Xpo1 und Spc29 beobachtet. Beide Ran-Mutanten akkumulieren im Kern und beeinflussen den Ran-Status der Zelle. Ran-G21V kann GTP nicht hydrolysieren, so dass die Ran-GTP-Konzentration in der Zelle erhöht wird. Ran-T26N kann GTP nicht stabil binden und inhibiert den Ran-Guanin Austauschfaktor RCC1, was zu einer erhöhten Ran-GDP-Konzentration führt (Klebe et al. 1995). Eine Überexpression dieser Ran-Allele ist nicht letal, aber die Zellen zeigen eine zytoplasmatische Misslokalisierung von Kernproteinen und einen Export-Defekt von poly(A⁺) RNA. Zellen, in denen Wildtyp-Ran überexprimiert ist, zeigen dagegen keine Defekte in der Protein- oder poly(A⁺) mRNA-Verteilung (Schlenstedt et al. 1995a).



Die Überexpression der Ran-Versionen erfolgte in einem diploiden Hefestamm, der CFP-markiertes Spc29 und YFP-markiertes Xpo1 exprimiert (siehe Abb. 2.12). Jeweils 100 Spc29-CFP-Signale wurden fokussiert und auf eine Co-Lokalisation mit dem Xpo1-YFP-Signal geprüft. Bei Überexpression von Wildtyp-Ran zeigten 85 % der Zellen eine Co-Lokalisation beider Signale. Diese Situation änderte sich kaum bei Überexpression von Ran-GTP (80 %), sank aber deutlich auf 60 %, wenn der GTP-Status der Zelle durch Überexpression von Ran-GDP gestört wurde.

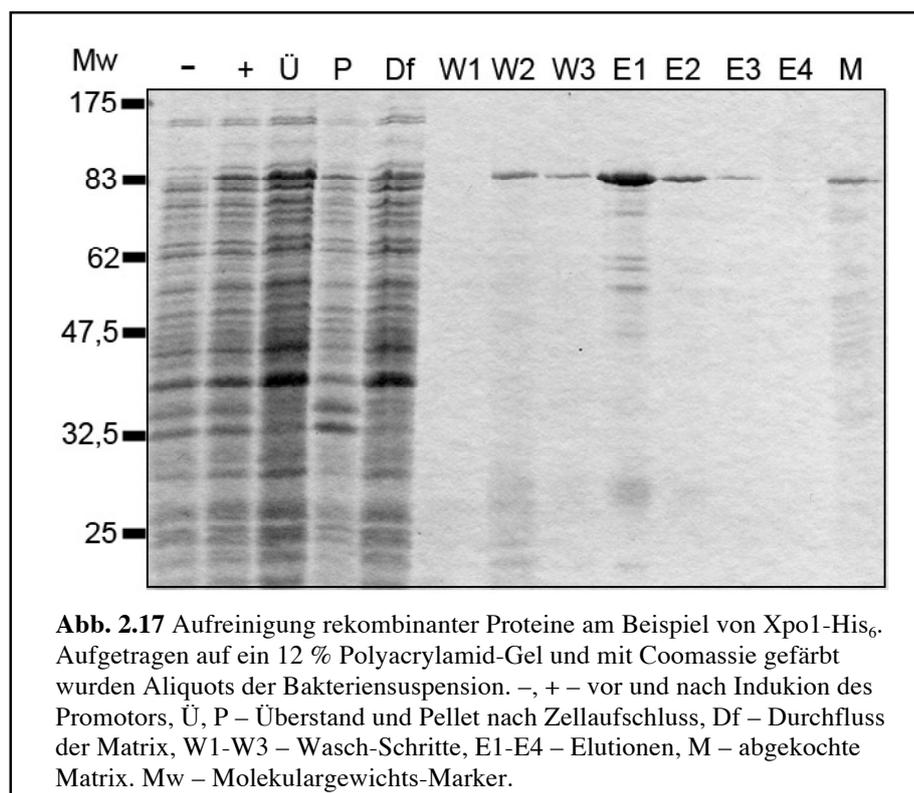
Eine Änderung des Ran-Status der Zelle hat also einen Einfluss auf die Lokalisation von Xpo1 am Spindelpolkörper, was auf eine NES-abhängige Lokalisation hindeutet.

2.4 Spc72 in der *in-vitro*-Bindungsanalyse

2.4.1 Reinigungsbeispiel und Test der Bindungsanalyse

Da Xpo1 mit Spc72 in der ungerichteten 2-Hybrid-Analyse interagiert und am Spindelpolkörper lokalisiert, ist eine direkte Wechselwirkung beider Proteine möglich. Dabei könnte es sich um eine NES- und Ran-GTP-abhängige Bildung eines Exportkomplexes handeln. In der Zelle ist die Bildung von Exportkomplexen ein kooperativer Prozess, den akzessorische Faktoren unterstützen (Englmeier et al. 2001, Lindsay et al. 2001, Noguchi et al. 1997, Taura et al. 1998). Die meisten NES vermitteln nur eine schwache Bindung an Crm1 / Xpo1, und die Isolation trimerer Komplexe aus Zellextrakten ist technisch schwierig (Kunzler et al. 2000, Kutay et al. 2005, Maurer et al. 2001). Um diese Schwierigkeiten zu umgehen, wurden die beteiligten Proteine in *E. coli* rekombinant exprimiert und in *in vitro*-Bindungsanalysen untersucht. In diesen Analysen bindet Xpo1 seine Substrate NES- und Ran-GTP-abhängig ohne die Zugabe akzessorischer Faktoren. Die Bindung kann durch ein NES-enhaltendes Peptid kompetiert werden, nicht jedoch durch eine mutierte Version (Maurer et al. 2001).

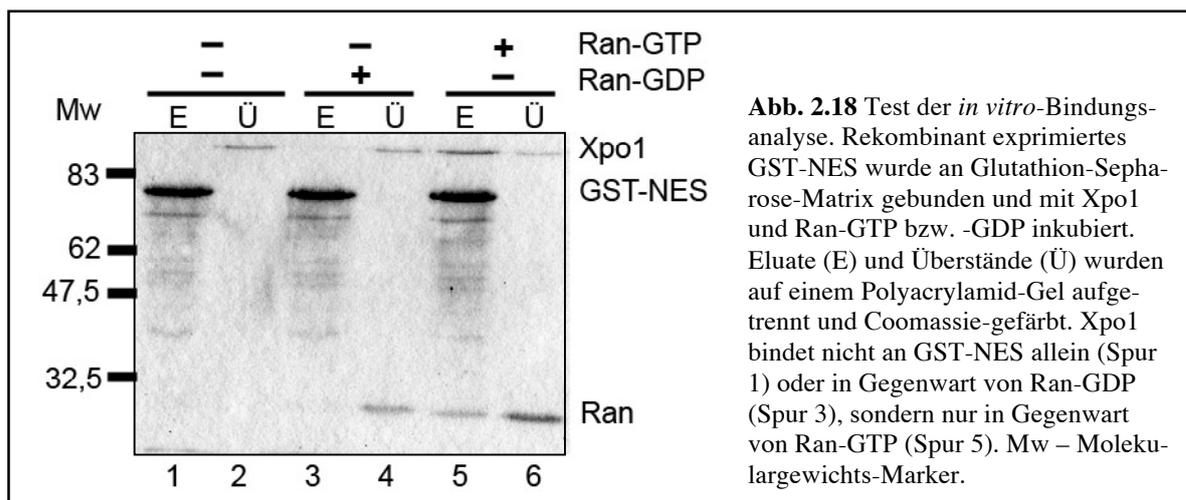
Abbildung 2.17 zeigt eine Reinigung der rekombinanten Proteine am Beispiel von Xpo1, das mit His₆ markiert wurde (Xpo1-His₆). Aufgetragen auf ein 12 % Polyacrylamid-Gel und mit Coomassie gefärbt wurden Aliquots der Bakteriensuspension vor (–)



und nach (+) Induktion mit IPTG, des Überstands (Ü) und des Pellets (P), und des Durchflusses (Df) der Ni-NTA-Agarose-Matrix. Wasch-Schritte (W1-W3) und Elutionen (E1-E4) sind gezeigt, gefolgt von mit Probenpuffer versetzter Affinitätsmatrix (M). Sichtbar ist die Induktion der Proteinexpression durch IPTG. Ein Teil des Proteins verbleibt in Einschlusskörpern (*inclusion bodies*, P), mit den Wasch-Schritten W2 und

W3 geht etwas Xpo1 verloren. Die stärkste Elution erfolgt mit dem ersten Elutions-Schritt (E1), die Elution ist nicht vollständig, da an der Matrix gebundenes Xpo1 nachweisbar ist (M).

Um die Bildung von Export-Komplexen *in vitro* zu testen, wurden His₆-markiertes Xpo1 sowie His₆-markiertes Ran-GTP und -GDP rekombinant exprimiert und gereinigt. Als Modellsubstrat diente eine Fusion der NES der PKI an GST, gefolgt von zwei Einheiten GFP (GST-NES), die das Modellsubstrat in der Größe unterscheidbar von Ran-GTP/-GDP machen (Abb. 2.18). Das Modellsubstrat GST-NES wurde an Glutathi-

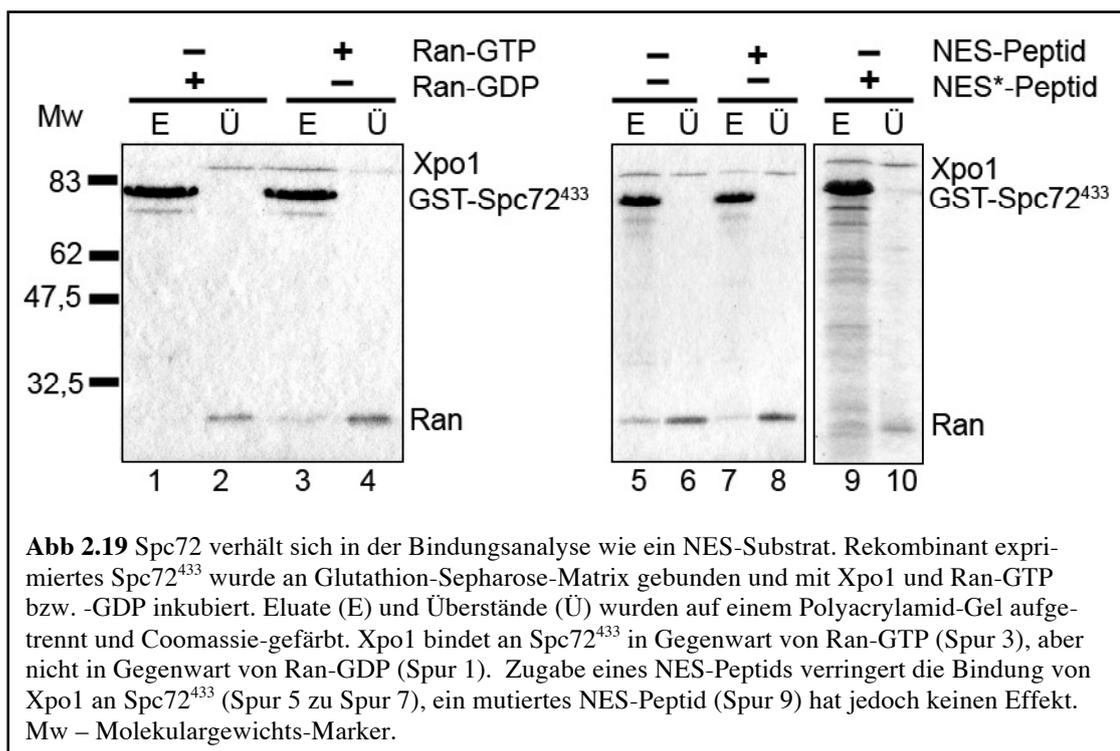


on-Sepharose-Matrix gebunden. Nach Inkubation mit Xpo1 allein und in Gegenwart von Ran-GDP bzw. Ran-GTP wurden die Überstände mit TCA präzipitiert und die gewaschene Matrix in Probenpuffer gekocht. 1/60 der Eluate (E) und 1/50 der Überstände (Ü) wurden auf einem 12 % Polyacrylamid-Gel getrennt und Coomassie-gefärbt. Xpo1 allein band nicht an GST-NES (Spur 1), es blieb vollständig im Überstand (Spur 2). Zugabe von Ran-GDP änderte daran nichts, Xpo1 und Ran-GDP fanden sich nur im Überstand (Spur 4), aber nicht im Eluat (Spur 3). In Gegenwart von Ran-GTP bildete sich jedoch ein trimerer Komplex aus Xpo1, GST-NES und Ran-GTP (Spur 5). Mit dem Modellsubstrat GST-NES kann *in vitro* die NES-abhängige Bildung von trimeren Export-Komplexen nachgeahmt werden. Der Versuchsaufbau ist damit geeignet, andere Proteine anstelle von GST-NES auf ihre Fähigkeit zur Bindung an Xpo1 zu testen.

2.4.2 Analyse von Spc72⁴³³

Das Fragment von Spc72, das in der ungerichteten 2-Hybrid-Analyse gefunden wurde, wurde als GST-Fusion rekombinant exprimiert (GST-Spc72⁴⁴³) und anstelle von GST-NES in der *in vitro* Bindungsanalyse eingesetzt (Abb. 2.19). Die Bildung trimere Komplexe erfolgte nur in Gegenwart von Ran-GTP (Spur 3), aber nicht in Gegenwart von Ran-GDP (Spur 1) oder ohne Ran (nicht gezeigt). Damit verhält sich Spc72⁴³³ wie das Modellsubstrat GST-NES.

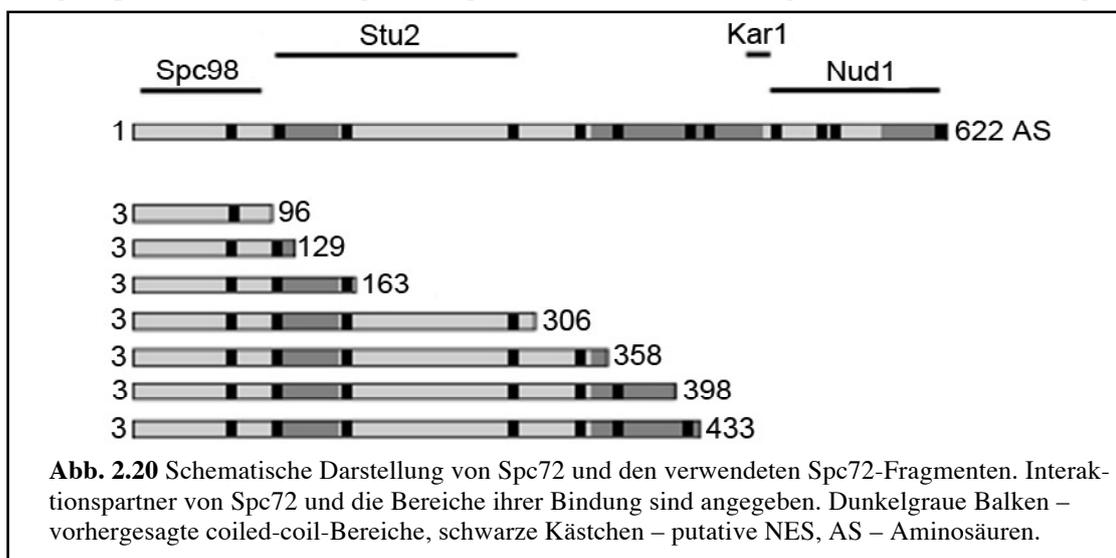
Besitzt Spc72⁴³³ eine NES, die die Bindung an Xpo1 vermittelt, sollte sich die Komplexbildung durch ein NES-enthaltendes Peptid verringern lassen, da dann zwei Substrate um Xpo1 konkurrieren. Dazu wurden der *in vitro*-Bindungsanalyse 50 µM eines



Peptids zugegeben, das die NES der PKI (GGGNELALKLAGLDINKT) trägt. Es führte zu einer deutlichen Verringerung der Bindung von Xpo1 an Spc72⁴³³ (vergleiche Spur 5 mit Spur 7). Zugabe einer mutierten Form des Peptids (GGGNELALK~~A~~AGLDINKT, Wen et al. 1995) hatte jedoch keinen Einfluss auf die Komplexbildung (Spur 9). Die Bindung von Spc72⁴³³ an Xpo1 ist somit in dieser Analyse RanGTP-abhängig und kann durch ein NES-Peptid kompetiert werden.

2.4.3 Analyse N-terminaler Fragmente von Spc72⁴³³

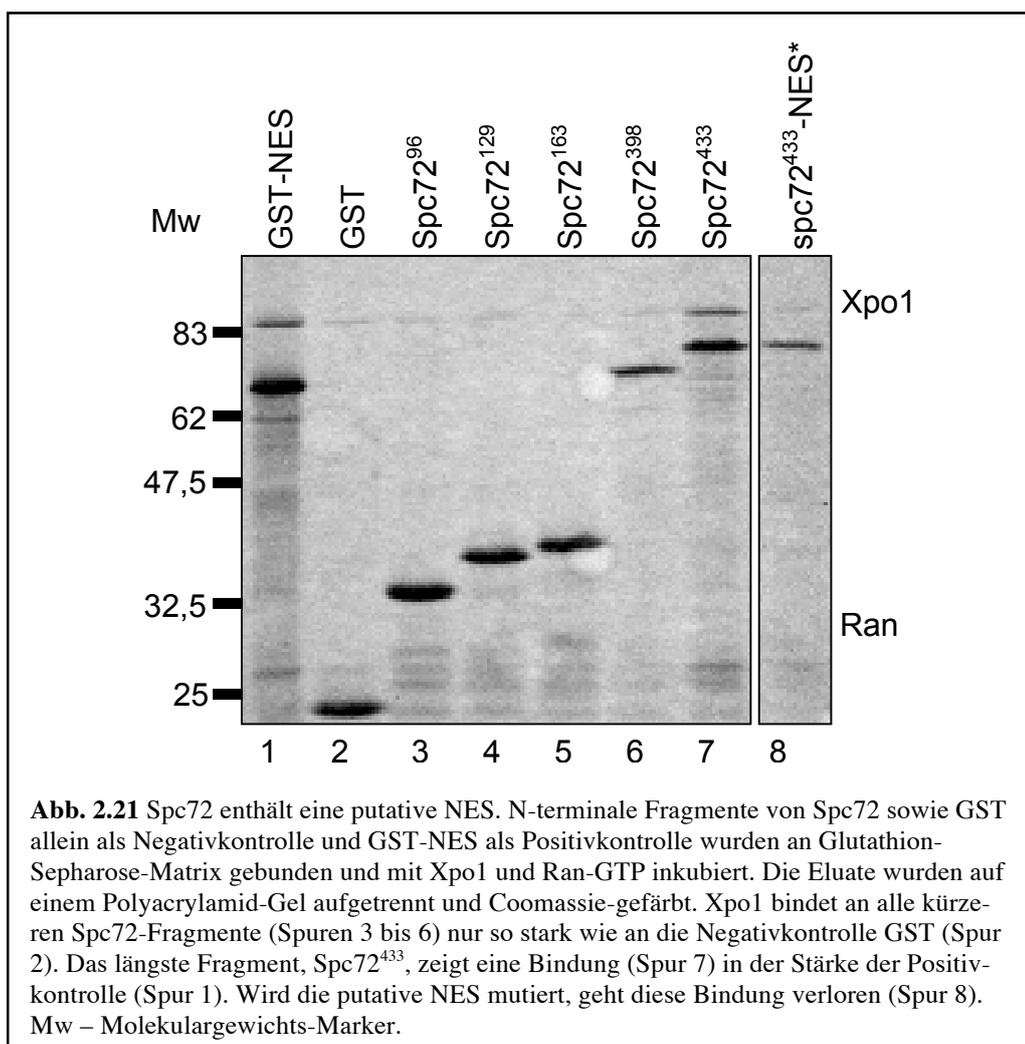
Um eine mögliche NES in Spc72 zu identifizieren, wurden STOP-Codons mit zielgerichteter Mutagenese in *SPC72* eingefügt und so mehrere N-terminale Fragmente erzeugt. Spc72 und die erzeugten Fragmente sind in Abbildung 2.20 schematisch dargestellt.



stellt. Dunkelgraue Balken repräsentieren vorhergesagte coiled-coil-Bereiche (Knop & Schiebel 1998), die zwölf schwarzen Kästchen putative NES. Darüber angegeben sind die Bereiche von Spc72, die die Wechselwirkung mit Spc98 (Knop & Schiebel 1998), Stu2 (Usui et al. 2003, Chen et al. 1998), Kar1 (Pereira et al. 1999) und Nud1 (Gruneberg et al. 2000) vermitteln.

Die N-terminalen Fragmente von Spc72 wurden rekombinant als GST-Fusionen exprimiert und in der *in vitro*-Bindungsanalyse eingesetzt (Abb. 2.21). Spur 1 zeigt den trimeren Komplex aus Xpo1, GST-NES und Ran-GTP; als Negativkontrolle diente GST allein (Spur 2). Alle kürzeren Fragmente von Spc72 banden in Gegenwart von Ran-GTP nicht stärker an Xpo1 als die Negativkontrolle (Spuren 3 bis 6, Spc72³⁰⁶ und Spc72³⁵⁸ sind nicht gezeigt). Erst mit Spc72⁴³³ erfolgte wieder die trimere Komplexbildung mit Xpo1 und Ran-GTP (Spur 7).

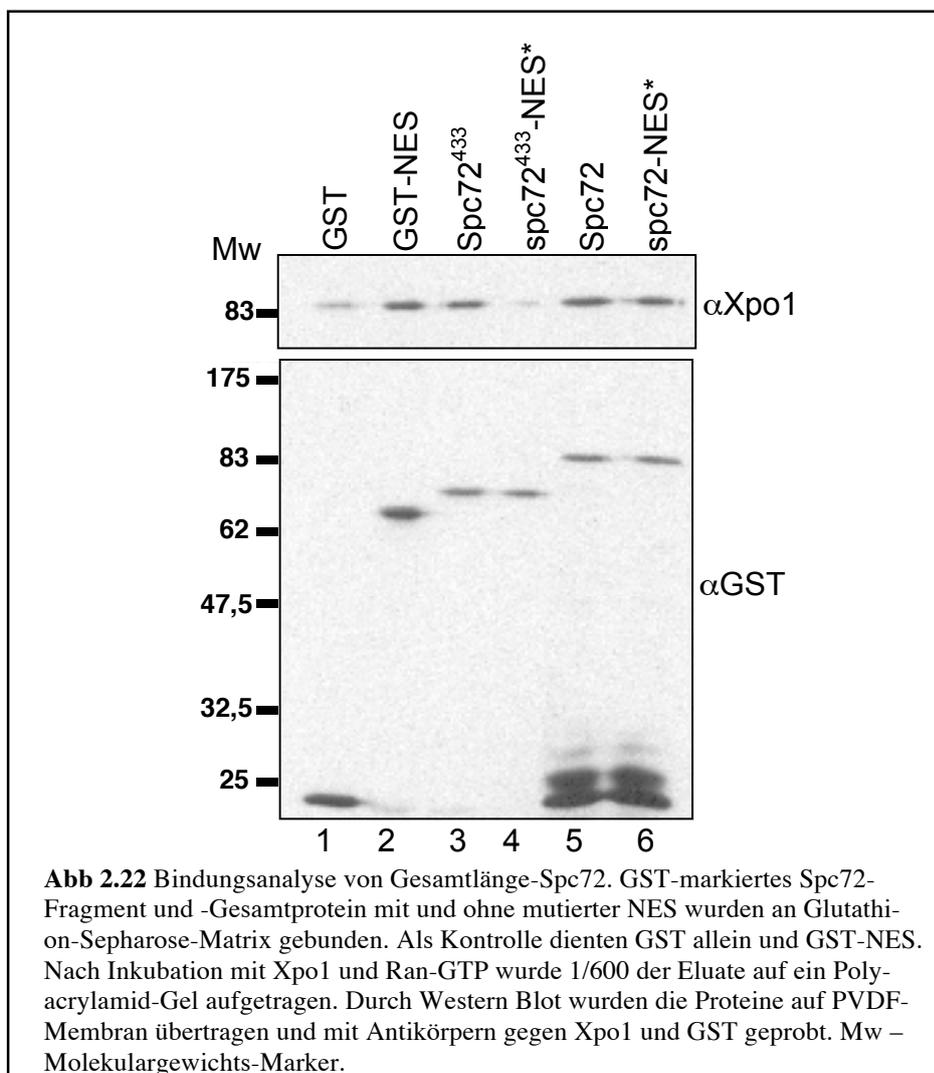
Die Sequenz **LEKQINDLQI** in Spc72⁴³³ (Aminosäuren 418–427) stimmt mit der Konsensus-Sequenz einer NES überein (Henderson & Elaftheriou 2000, Kutay et al. 2005). Sie ist nur im längsten Fragment enthalten und könnte die Bindung an Xpo1 vermitteln. Wird eine NES in kritischen Aminosäuren mutiert, verliert sie ihre Fähigkeit, Bindung an Xpo1 zu vermitteln (Henderson et al. 2000). Deshalb wurden zwei Leucin/Isoleucin-



zu-Alanin-Mutationen in Position 425 und 427 eingefügt, die die NES zu **LEKQIN-DAQA** verändern. Sie reduzierten die Bindung von Xpo1 auf Hintergrund-Stärke (Spur 8).

2.4.4 Vergleich von Spc72⁴³³ und Gesamtlänge-Spc72

Da Spc72 auch C-terminal nach der in 2.4.3 identifizierten NES weitere putative Kern-export-Sequenzen enthält, wurde das Gesamtlänge-Protein rekombinant exprimiert und in der Bindungsanalyse untersucht. Die Bildung von Einschlusskörpern während der Aufreinigung erlaubte die Gewinnung nur geringer Mengen von GST-Spc72. Deshalb wurden die Proteine durch Western Blot auf PVDF-Membran übertragen und mit Antikörpern gegen Xpo1 und GST geprobt (Abb. 2.22). Auch in dieser Form der Analyse bildete Xpo1 in Gegenwart von Ran-GTP trimere Komplexe mit GST-NES (Spur 2) und Spc72⁴³³ (Spur 3), aber nicht mit GST allein (Spur 1). Einführen der Mutation in Spc72 führte wiederum zum Verlust der Bindung (Spur 4). In der gezeigten Analyse bindet Gesamtlänge-Spc72 ohne (Spur 5) und mit Mutation (Spur 6) gleich stark an Xpo1 und Ran-GTP, dieses Verhalten war aber nicht konsistent in allen durchgeführten



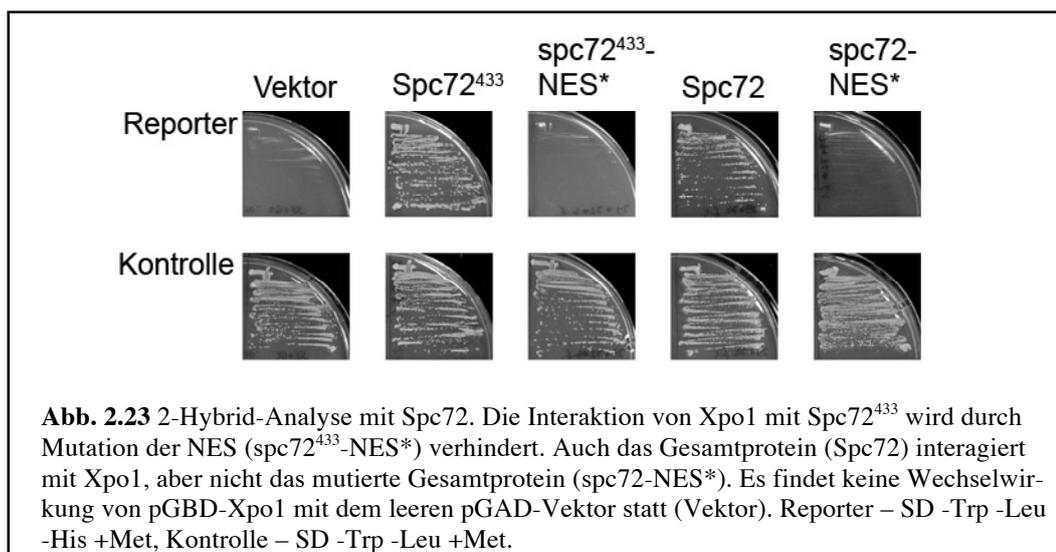
Bindungsexperimenten zu beobachten. Möglicherweise enthält der C-terminale Teil von Spc72 weitere NES, oder aufgrund der schwierigen Reinigungsbedingungen wurden unphysiologische Bindestellen exponiert. Eine eindeutige Aussage über das Bindungsverhalten von NES-mutiertem Gesamtlänge-Spc72 war mit dieser Analyse nicht möglich.

Bei den Signalen im ungefähren Molekulargewicht von 25 kDa in den Spuren 5 und 6 handelt es sich wahrscheinlich nicht um Abbauprodukte von Spc72, sondern um freies GST, das mit aufgereinigt wird und als Dimer vorliegen kann.

2.5 Untersuchung von Spc72 als Xpo1-Substrat *in vivo*

2.5.1 2-Hybrid-Analyse von Spc72 und spc72-NES*

Da die Bindungsanalyse mit Gesamtlänge-Spc72 nicht aussagefähig war, wurden Spc72⁴³³ und das Gesamtlänge-Protein mit und ohne Mutation in der 2-Hybrid-Analyse untersucht (Abb. 2.23). Alle Stämme wuchsen auf den Kontrollplatten. Es fand keine Interaktion zwischen Xpo1 und dem leeren Vektor statt. Xpo1 interagiert sowohl mit Spc72⁴³³ als auch mit Gesamtlänge-Spc72. In beiden Fällen wurde die Wechselwirkung durch Einführen der Punktmutationen in die NES von Spc72 (L425A und I427A) verhindert. Das Verhalten von Spc72⁴³³ im *in vitro*-Bindungsexperiment konnte damit

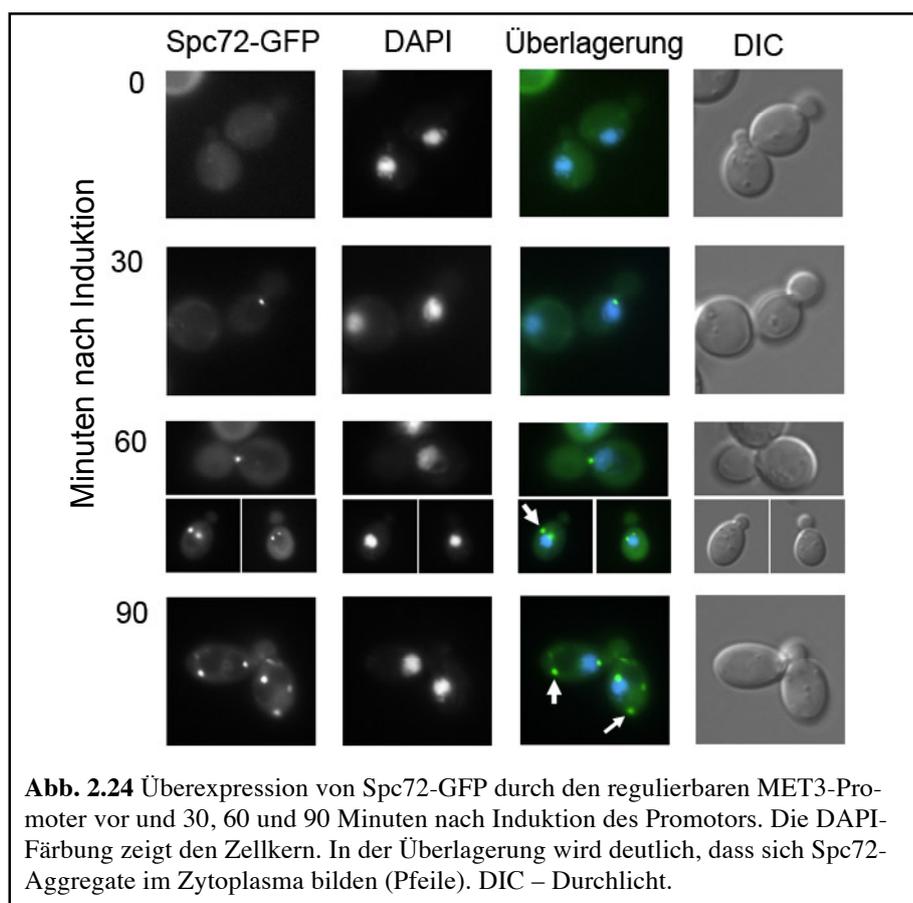


betätigt werden. Die 2-Hybrid-Analyse von Gesamtlänge-Spc72 steht im Widerspruch zu der in einigen *in vitro*-Bindungsexperimenten beobachteten Interaktion von Xpo1 mit spc72-NES*. Dies weist darauf hin, dass es sich in den *in vitro*-Bindungsanalysen des mutierten Gesamtlänge-Proteins um eine unphysiologische Interaktion handeln könnte.

2.5.2 Überexpression von Spc72-GFP

GFP-markierte Export-Substrate von Xpo1 akkumulieren im Zellkern, wenn deren Export durch Xpo1 blockiert wird. Dies kann in der temperatursensitiven Mutante *xpo1-1* durch Erhöhung der Temperatur erreicht werden (Stade et al. 1997) oder bei Verwendung einer Leptomycin B-sensitiven Form von Xpo1 durch Zugabe von Leptomycin B. Wird Spc72-GFP unter dem eigenen Promotor exprimiert, ist eine Anreicherung nach Leptomycin B-Zugabe nicht zu beobachten (Abb. 2.6), vermutlich weil das Protein in sehr geringer Menge in der Zelle vorliegt und das GFP-Signal, verteilt über das große Kernvolumen, nicht mehr erkennbar ist. Eine Überexpression von Spc72-GFP vom regulierbaren MET3-Promotor in *xpo1-1*-Zellen sollte die Menge an GFP-Signal so weit verstärken, dass eine Kernfärbung nach Temperaturerhöhung nachweisbar würde (Abb. 2.24).

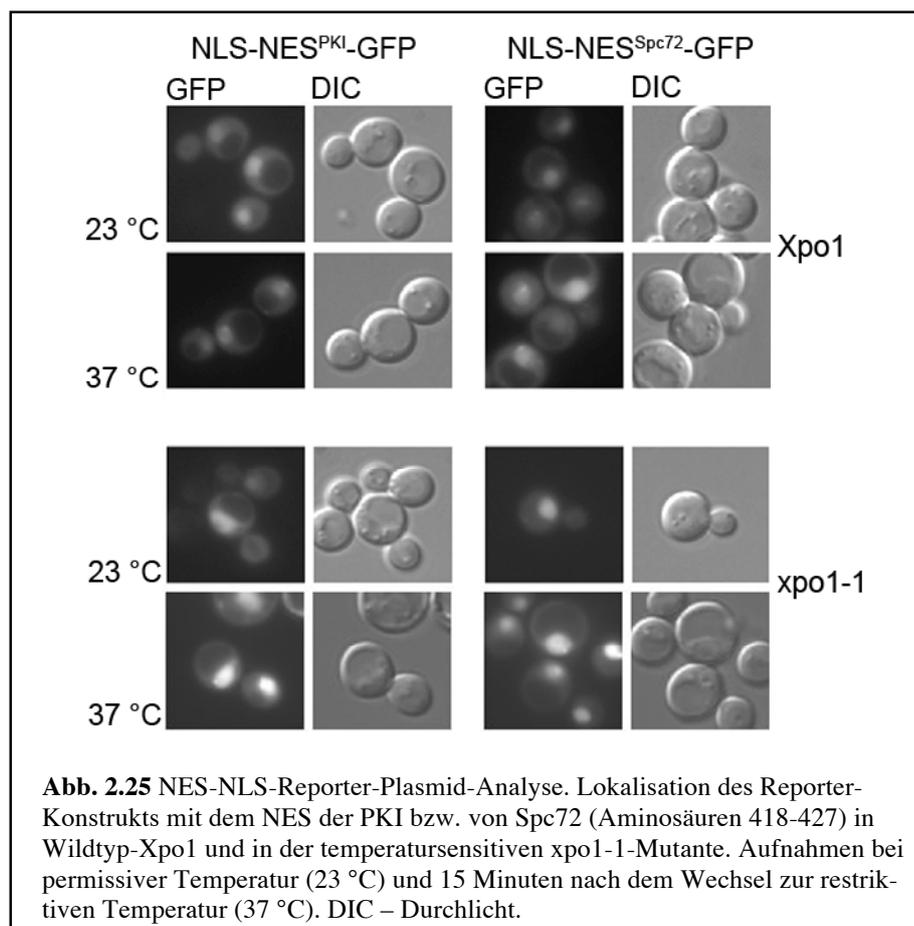
Etwa 30 Minuten nach Induktion des Promotors war ein GFP-Signal an den Spindelpolkörpern zu sehen. Dieses Signal wurde zunehmend stärker, bis sich bereits nach 60 Minuten vom Kernrand losgelöste Aggregate im Zytoplasma bildeten. Die Aggregatbildung nahm im Laufe der Zeit weiter zu, eine Färbung der Kerne war nicht zu beobachten. Spc72 weist putative coiled-coil-Domänen auf, die eine Aggregatbildung begünstigen können (Knop & Schiebel 1998). In dieser Form können die Spc72-Moleküle nicht zwischen Kern und Zytoplasma transportiert werden. Eine Analyse der Verteilung in einem *xpo1-1*-Stamm ist damit nicht möglich.



2.5.3 Reporter-Plasmid-Analyse der NES von Spc72

Da eine Überexpression von Spc72 zu Aggregaten führte, wurde die NES von Spc72 in einer Reporter-Plasmid-Analyse untersucht. Mit dieser Analyse kann eine Aminosäuresequenz auf ihre Fähigkeit getestet werden, Xpo1-abhängigen Export zu vermitteln (Stade et al. 1997). Dies ist in Abbildung 2.25 gezeigt. Das Reporter-Plasmid kodiert für die SV 40-NLS, gefolgt von der NES der PKI und zweimal GFP (Stade et al. 1997). Das dadurch exprimierte Protein ist zu groß, um passiv durch die Kernpore zu wandern, sondern muss aktiv im- und exportiert werden. In einem Stamm, der Wildtyp-Xpo1 trägt, lokalisierte das Reporter-Protein im Zytoplasma und etwas stärker im Zellkern, da die benutzte NLS etwas stärker ist als die NES. Eine Erhöhung der Temperatur veränderte die Verteilung des Proteins nicht und Im- und Export fanden statt. Wurde das Reporter-Protein dagegen im temperatursensitiven xpo1-1-Stamm exprimiert, beobachtete man die gleiche Verteilung über Kern und Zytoplasma wie im Wildtyp lediglich bei der permissiven Temperatur von 23 °C. Bei einer Erhöhung der Temperatur auf restriktive 37 °C akkumulierte das Reporter-Protein im Zellkern, da Import noch stattfand, Export durch xpo1-1 aber nicht mehr möglich war.

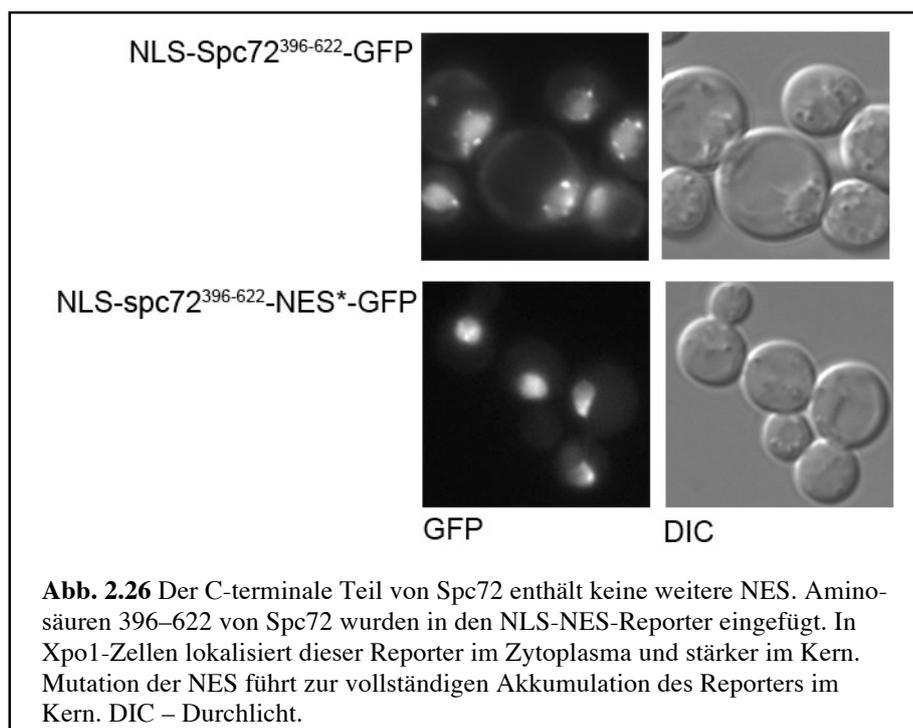
Wurde die NES der PKI im Reporter-Plasmid ersetzt durch eine Sequenz, die den Aminosäuren 418-427 in Spc72 entspricht, war im Wildtyp die gleiche Verteilung des GFP-Signals zu beobachten wie mit dem ursprünglichen Reporter-Protein: etwas stärker im Kern als im Zytoplasma, keine Veränderung durch Temperaturerhöhung. Auch in der



xpo1-1-Mutante ergab sich das entsprechende Bild, nach Blockierung des Exports durch Temperaturerhöhung akkumulierte das Protein im Zellkern. Dies zeigt, dass die NES von Spc72 in der Reporter-Plasmid-Analyse wie die PKI-NES in der Lage ist, Xpo1-abhängigen Export zu vermitteln.

2.5.4 Reporter-Plasmid-Analyse eines C-terminalen Fragments von Spc72

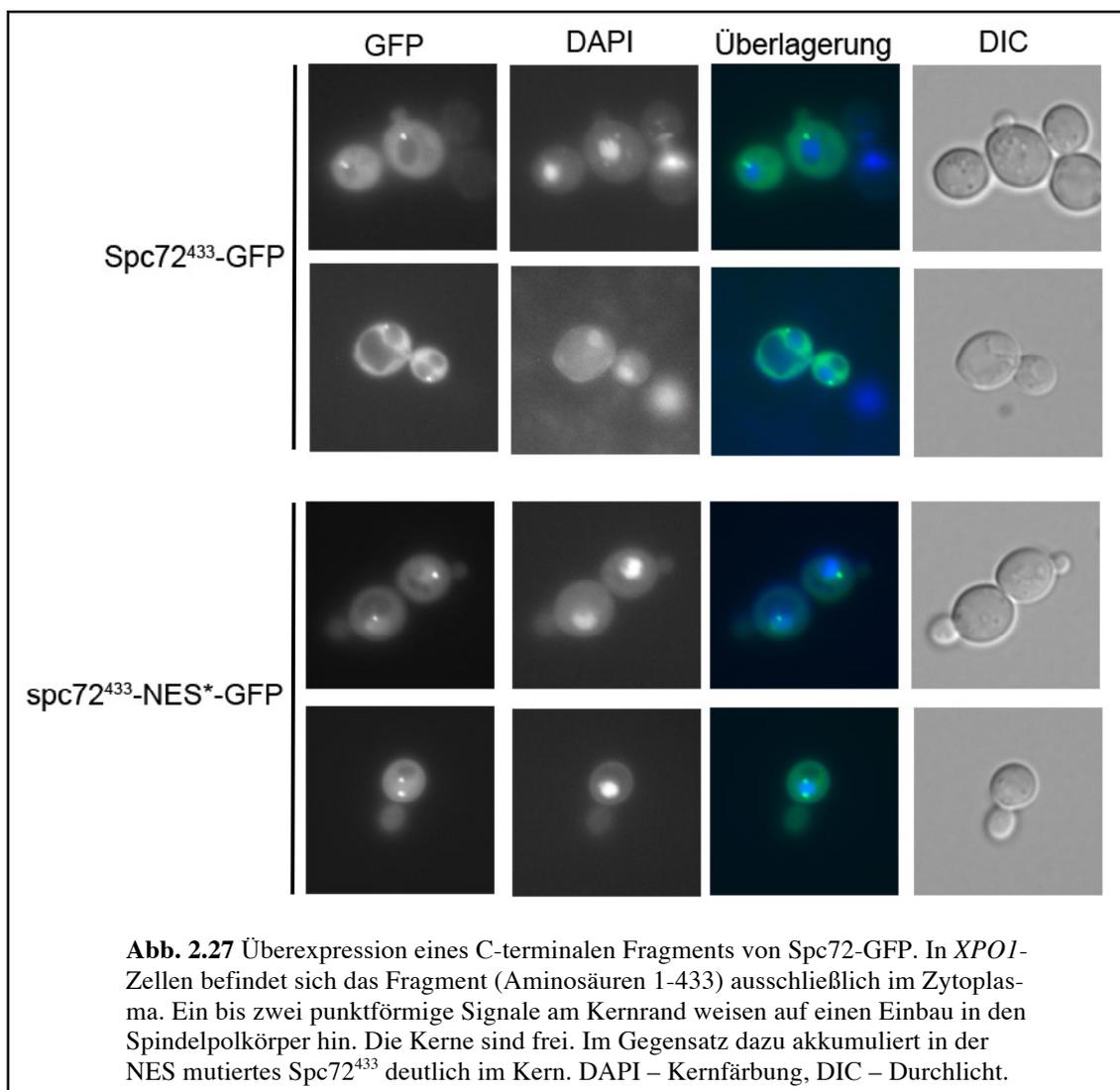
In der *in vitro*-Bindungsanalyse des Gesamtlänge-Spc72 interagiert dieses teilweise auch mit mutierter NES mit Xpo1, was auf eine weitere NES im C-terminalen Teil des Proteins hinweisen kann. Um dies zu testen, wurde der C-terminale Teil von Spc72 (Aminosäuren 396–622) mit und ohne Mutation in den NLS-NES-Reporter eingefügt (Abb. 2.26). In Xpo1-Zellen lokalisierte dieser Reporter ohne Mutation im Zytoplasma und stärker im Kern, ähnlich dem NLS-NES^{Spc72}-Reporter in Abb. 2.25. Zusätzlich tauchten Aggregate am Kernrand auf, die dem Bild der Überexpression von Spc72-GFP ähneln (Abb. 2.24). Wurde die NES₄₁₈₋₄₂₇ in Spc72³⁹⁶⁻⁶²² durch Mutation zerstört, akkumulierte das Reporter-Konstrukt vollständig im Kern, da ein Export durch Xpo1 nicht mehr möglich war. Eine Aggregatbildung war nicht zu erkennen. Die Existenz einer weiteren NES im C-terminalen Teil von Spc72 ist damit unwahrscheinlich.



2.5.5 Überexpression eines N-terminalen Fragments von Spc72-GFP

Die Überexpression von Spc72-GFP durch den regulierbaren MET3-Promotor führte zur Bildung von zytoplasmatischen Aggregaten (Abb. 2.24). Eine ähnliche Aggregatbildung wurde auch nach Expression des C-terminalen Teils von Spc72 (Aminosäuren 396-622) beobachtet (Abb. 2.26). Möglicherweise sind C-terminal gelegene Bereiche von Spc72 für die Aggregatbildung verantwortlich.

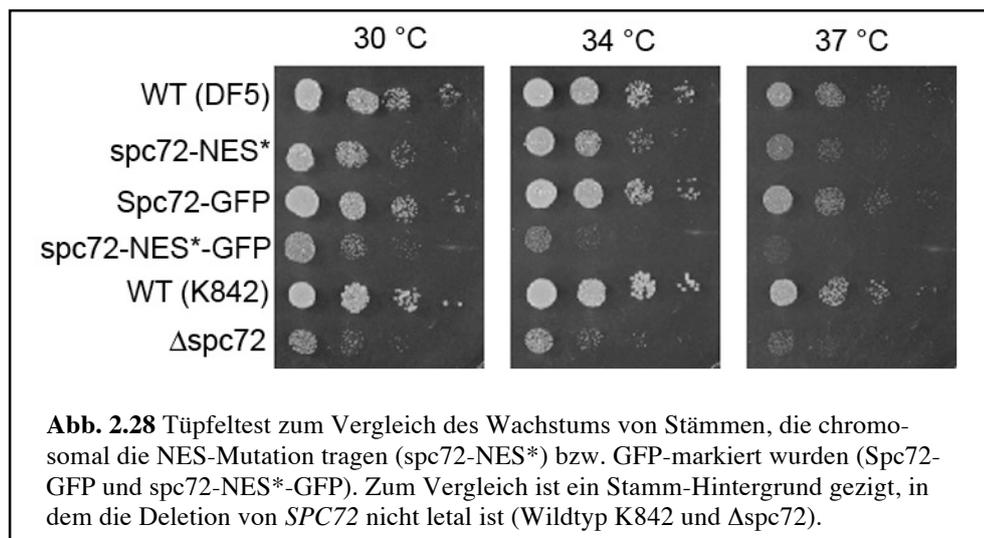
Ein Fragment von Spc72-GFP (Aminosäuren 1-433), dem der C-terminale Bereich fehlt, wurde deshalb unter dem regulierbaren MET3-Promotor in Xpo1-Zellen exprimiert (Abb. 2.27). Die Expressionsstärke des Konstrukts schwankte stärker als die des Gesamtlänge-Proteins in Abbildung 2.24. Zellen ohne Signal, aber auch Zellen mit extrem starkem Spindelpolkörper-Signal waren nach Induktion des Promotors zu beobachten. Zur Analyse wurden nur Zellen herangezogen, deren Spc72⁴³³-GFP-Signal am Spindelpolkörper etwa der Signalstärke unter dem endogenen Promotor (Abb. 2.6) ent-



spricht. In diesen Zellen war eine deutliche Färbung des Zytoplasmas zu erkennen, die Kerne blieben dabei frei. Wurde Spc72⁴³³-GFP jedoch in der NES mutiert, war das Nucleoplasma mindestens ebenso stark gefärbt wie das Zytoplasma. Das Konstrukt Spc72⁴³³-NES* wird offensichtlich in den Kern transportiert, kann aber aufgrund der mutierten NES nicht durch Xpo1 exportiert werden und akkumuliert im Zellkern. Beide Konstrukte zeigten auch 180 Minuten nach Induktion des Promotors keine zytoplasmatische Aggregatbildung.

2.5.6 Lokalisation von *spc72*-NES*-GFP

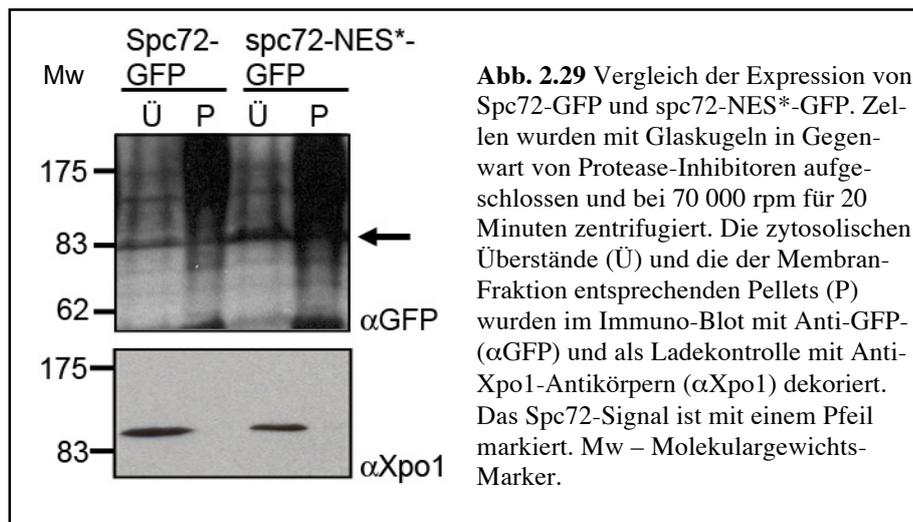
Wenn die NES von *Spc72* auch *in vivo* eine Funktion hat, sollte sich ihre Beeinträchtigung durch Mutation in einem Phänotyp äußern. Wird *Spc72* in den Kern importiert und durch *Xpo1* wieder exportiert, müsste sich eine Mutation der NES auf die Lokalisation von *Spc72* auswirken. Um einen Effekt der NES-Mutation *in vivo* zu analysieren, wurde die Mutation chromosomal in *Spc72* eingefügt. Zusätzlich wurden *SPC72* und die NES-Mutante chromosomal GFP-markiert. In einem Tüpfeltest wurde zunächst das Wachstum dieser Stämme analysiert (Abb. 2.28). Dazu wurden vier 1 : 10-Verdünnungen auf YPD-Platten getüpfelt und bei unterschiedlichen Temperaturen inkubiert.



Zellen, die *spc72*-NES* tragen, wuchsen bei allen Temperaturen schlechter als der Wildtyp. Eine Markierung des Wildtyp-Proteins mit GFP hatte dagegen keinen Effekt. Die GFP-markierte Mutante wuchs noch schlechter als die unmarkierte Mutante. Als Vergleich ist ein anderer Stamm-Hintergrund (K842) gezeigt, in dem die Deletion von *SPC72* nicht letal ist (Δ *spc72*), aber zu einem starken Wachstums-Defekt führt. Die Reduktion im Wachstum von *spc72*-NES* deutet darauf hin, dass die NES von *Spc72* auch *in vivo* eine Funktion hat.

Um auszuschließen, dass der Wachstumsdefekt lediglich auf einer geringeren Expression oder einem Abbau der mutierten Form beruht, wurde ein detergenten-freier Zellaufschluss mit Glaskugeln von Stämmen durchgeführt, die *Spc72* und *spc72*-NES* in GFP-markierter Form tragen. Nach Ultrazentrifugation wurden die zytosolischen Überstände (Ü) und die der Membran-Fraktion entsprechenden Pellets (P) auf einem Polyacrylamid-Gel getrennt und durch Western Blot auf PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde als Ladekontrolle mit Anti-*Xpo1*-Antikörpern und mit Anti-GFP-Antikörpern dekoriert (Abb. 2.29), da keine spezifischen *Spc72*-Antikörper zur Verfügung standen. Das Signal des *Xpo1*-Antikörpers war in beiden Stämmen etwa gleich stark, was zeigt, dass in beiden Fällen gleiche Mengen Protein aufgetragen wurden. Auch die Signalstärke des Anti-GFP-Antikörpers zeigte kaum Unterschied, *Spc72*-GFP und *spc72*-NES*-GFP lagen in gleicher Menge in den Zellen vor. In einem unmarkierten *Spc72*-Stamm konnte kein Signal beobachtet werden (nicht gezeigt). Der Wachstumsdefekt in *spc72*-NES*-GFP-tragenden Zellen lässt sich also nicht auf einen Man-

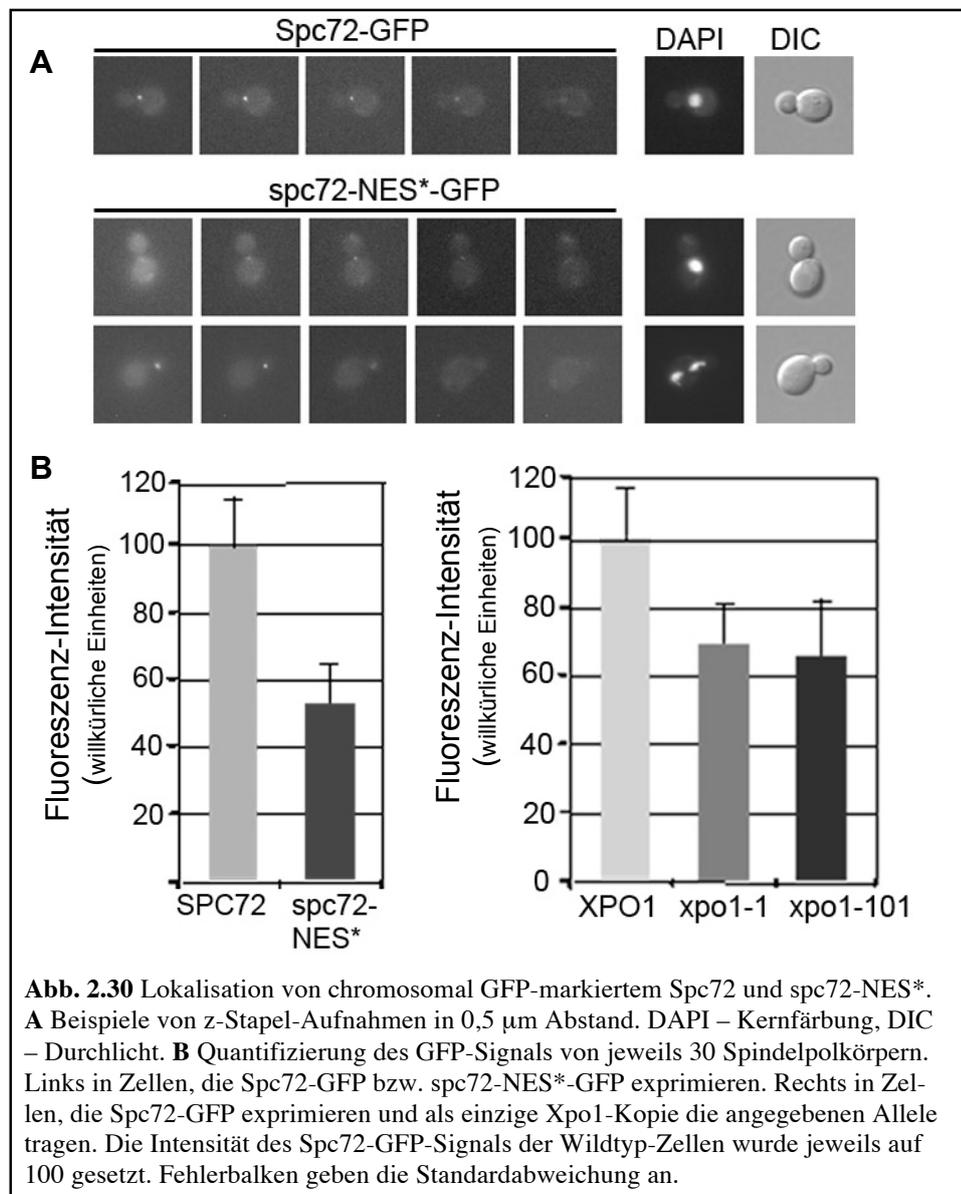
gel an Protein zurückführen, sondern weist auf einen funktionalen Defekt im Protein hin.



Um zu testen, ob die Mutation der NES die Lokalisation von Spc72 am Spindelpolkörper beeinflusst, wurden z-Stapel-Aufnahmen von Zellen angefertigt, die Spc72-GFP und spc72-NES*-GFP exprimieren (Abb. 2.30). Alle Zellen mit Spc72-GFP zeigten ein bis zwei klare, deutlich sichtbare GFP-Signale, die den Spindelpolkörpern entsprechen. In spc72-NES*-GFP war die Situation uneinheitlicher. Die meisten Zellen zeigten ein deutlich schwächeres GFP-Signal, das in einigen Fällen mit bloßem Auge nicht mehr erkennbar war (Abb. 2.30 A).

Zur Quantifizierung des GFP-Signals wurden z-Stapel-Aufnahmen von Zellen mit sehr kleiner Tochterzelle angefertigt (Abb. 2.30 B). In diesem Zellzyklus-Stadium sind die Spindelpolkörper bereits verdoppelt, aber noch nicht voneinander getrennt, und ihr Fluoreszenz-Signal hat die größte Intensität (Yoder et al. 2003). Die z-Stapel wurden mit dem *ImageJ*-Programm (Abramoff et al. 2004) summiert. Die integrierte Signalstärke um den Spindelpolkörper wurde berechnet, dabei wurde für jede Zelle ein entsprechender Hintergrund-Wert abgezogen. Jeweils 30 Spindelpolkörper wurden vermessen und die Intensität des Spc72-GFP-Signals auf 100 gesetzt. Die Stärke des spc72-NES*-Signals betrug nur 53 % des Wildtyp-Signals. Die Mutation der NES in Spc72 verhindert also nicht die Lokalisation am Spindelpolkörper, schwächt sie aber auf etwas mehr als die Hälfte ab. Dies könnte auf eine Anreicherung von spc72-NES* im Kern zurückzuführen sein, so dass weniger Protein an der zytosolischen Seite des Spindelpolkörpers zur Verfügung steht.

Wenn die verminderte Lokalisation von spc72-NES*-GFP am Spindelpolkörper durch eine gestörte Wechselwirkung mit Xpo1 verursacht wird, sollten auch Mutationen in Xpo1 einen vergleichbaren Effekt haben. Deshalb wurden Zellen untersucht, die Spc72-GFP exprimieren und als einzige Xpo1-Kopie die Allele *XPO1*, *xpo1-1* und *xpo1-101* tragen (Abb. 2.30 B rechts). Nach einer Temperaturerhöhung auf 37 °C für 15 Minuten erfolgte die Quantifizierung der Spc72-GFP-Signale wie oben beschrieben. Das Spc72-GFP-Signal im Xpo1-Wildtyp wurde auf 100 gesetzt. Die beiden *xpo1*-Allele führten zu einer Reduktion des GFP-Signals auf knapp 70 % (*xpo1-1*: 69 %, *xpo1-101*: 68 %). Auch hier kommt es also zu einer Verringerung des Spc72-GFP-Signals am Spindelpolkörper. Der Effekt ist allerdings nicht so ausgeprägt wie im spc72-NES*-Stamm.

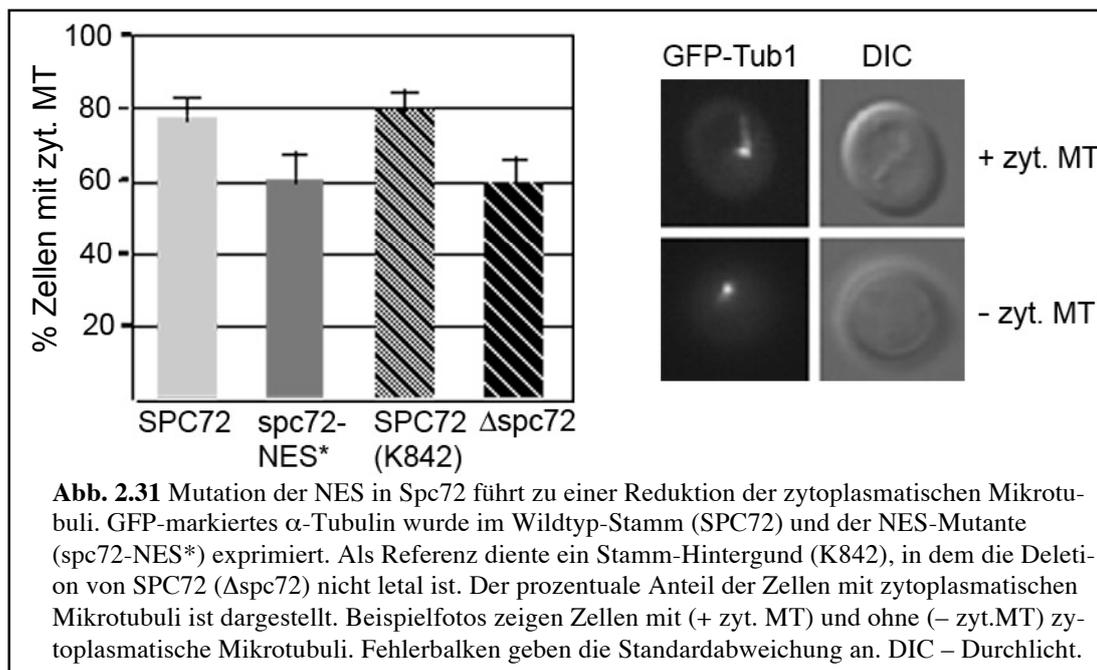


2.5.7 Zytoplasmatische Mikrotubuli in spc72-NES*

Spc72 bindet den γ -Tubulin-Komplex auf der zytosolischen Seite des Spindelpolkörpers. Am γ -Tubulin-Komplex polymerisieren die Mikrotubuli. Eine Verringerung des Spc72-Gehalts am Spindelpolkörper, wie sie durch Einfügen der NES-Mutation auftritt (Abb. 2.30), sollte die Bindung des γ -Tubulin-Komplexes und damit die Zahl der zytoplasmatischen Mikrotubuli reduzieren.

Zur Detektion der zytoplasmatischen Mikrotubuli wurden Zellen, die GFP-Tub1 tragen, in der G_1 -Phase betrachtet (Abb. 2.31), da in diesem Zellzyklus-Stadium die meisten Wildtyp-Zellen lange, leicht erkennbare zytoplasmatische Mikrotubuli tragen (nicht gezeigt). In drei unabhängigen Experimenten wurde von Zellen in der G_1 -Phase bestimmt,

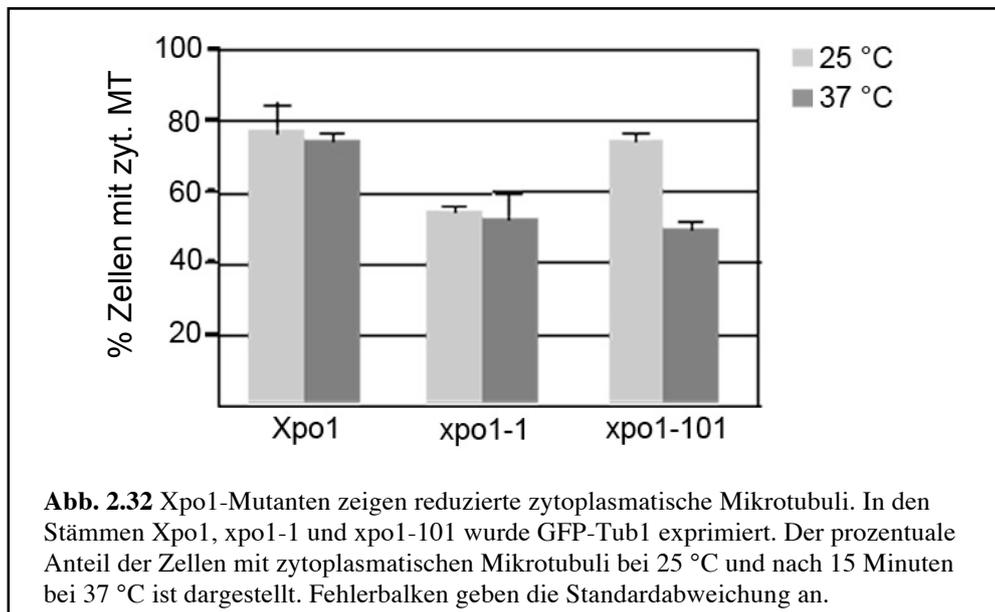
ob sie zytoplasmatische Mikrotubuli besitzen oder nicht. Im Spc72-Stamm wiesen $77\% \pm 6\%$ der Zellen zytoplasmatische Mikrotubuli auf ($n = 236$). Einfügen der NES-Mutation reduzierte diesen Anteil auf $61\% \pm 7\%$ ($n = 196$). Zum Vergleich wurde GFP-Tub1 im Stamm-Hintergrund K842 exprimiert, in dem die Deletion von Spc72 nicht letal ist. Hier zeigten $79\% \pm 7\%$ ($n = 215$) der Wildtyp-Zellen zytoplasmatische Mikrotubuli, durch vollständige Deletion von Spc72 (Δspc72) verringerte sich dieser Anteil auf $60\% \pm 6\%$ ($n = 169$). Die Abnahme der Zahl der zytoplasmatischen Mikrotubuli durch Einfügen der NES-Mutation ist damit vergleichbar stark mit dem Effekt einer Deletion des Proteins.



2.5.8 Zytoplasmatische Mikrotubuli in Xpo1-Mutanten

Zellen, die spc72-NES* exprimieren, zeigen einen Defekt in den zytoplasmatischen Mikrotubuli (Abb. 2.31). Wenn dieser Effekt darauf beruht, dass spc72-NES* nicht mehr mit Xpo1 wechselwirken kann, sollte ein ähnlicher Effekt auch in Xpo1-Mutanten zu beobachten sein. Dazu wurde GFP-Tub1 in Wildtyp-Xpo1 und den beiden Mutanten xpo1-1 und xpo1-101 exprimiert (Abb. 2.32). Analog zu Abbildung 2.31 wurden Zellen ohne Tochterzelle betrachtet und bestimmt, ob sie zytoplasmatische Mikrotubuli zeigen oder nicht. Dies wurde bei permissiver Temperatur und 15 Minuten nach einem Wechsel auf die restriktive Temperatur von $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durchgeführt. Im Wildtyp besaßen $77\% \pm 7\%$ der Zellen ($n = 175$) zytoplasmatische Mikrotubuli, ein Wert vergleichbar den Wildtypen aus Abbildung 2.31. Eine Erhöhung der Temperatur hatte kaum Einfluss auf den Prozentsatz der Zellen mit zytoplasmatischen Mikrotubuli ($74\% \pm 2\%$, $n = 175$). In der Mutante xpo1-1 zeigten bereits bei permissiver Temperatur weniger Zellen zytoplasmatische Mikrotubuli als der Wildtyp ($56\% \pm 1\%$, $n = 168$). Bei restriktiver Temperatur sank dieser Anteil etwas auf $53\% \pm 8\%$ ($n = 167$). Die Mutante xpo1-101 wies bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ etwa gleich viele Zellen mit zytoplasmatischen Mikrotubuli auf wie der Wild-

typ ($74 \% \pm 1 \%$, $n = 172$), ihr Anteil sank hier deutlich auf $47 \% \pm 2 \%$ bei restriktiver Temperatur ($n = 180$).



Mutationen in *XPO1* führen damit zum selben Phänotyp wie die *spc72-NES**-Mutation, zu einer Abnahme der zytoplasmatische Mikrotubuli in G_1 -Zellen.

3. Diskussion

3.1 Die Gesamtstruktur von Xpo1 trägt zur Exportfunktion bei

In der Bäckerhefe *S. cerevisiae* ist neben dem Proteinexport auch der generelle Export zellulärer mRNA von Xpo1 abhängig (Stade et al. 1997). Im Gegensatz dazu ist Crm1, das Xpo1-Ortholog in höheren Eukaryoten, nur eingeschränkt am Export zellulärer mRNA beteiligt (Gallouzi & Steitz 2001, Kimura et al. 2004). Ein Ziel dieser Arbeit war es, die doppelte Funktion von Xpo1 in der Bäckerhefe näher zu untersuchen. Im Crm1-Protein können mehrere Domänen unterschieden werden: der N-terminale Bereich zeigt Sequenzähnlichkeit zu Importin β und anderen Karyopherinen und ist an der Bindung von Ran-GTP beteiligt. Weiter C-terminal liegt ein nicht exakt definierter Bereich, der eine Rolle in der Substrat-Bindung spielt und zwischen Crm1-Orthologen verschiedener Spezies inklusive *S. cerevisiae* konserviert ist (Kudo et al. 1999, Ossareh-Nazari & Dargemont 1999).

Um die verschiedenen Domänen auf ihre Funktion im Protein- und mRNA-Export zu untersuchen, wurden ungerichtet Punktmutationen in *XPO1* eingeführt. Da *XPO1* ein essentielles Gen ist, wurden konditionelle, temperatursensitive Mutanten isoliert, bei denen ein zumindest partieller Funktionsverlust zu vermuten war. Sie wurden zunächst auf ihre Fähigkeit getestet, Wachstum bei verschiedenen Temperaturen zu vermitteln, sowie auf ihren Einfluss auf die Verteilung der Zellzyklus-Stadien. Alle Mutanten waren bei permissiver Temperatur funktional, verursachten jedoch in unterschiedlichem Ausmaß Wachstumsdefekte bei höheren Temperaturen. Bei der Analyse der Zellzyklus-Stadien fiel die verlängerte G_1 -Phase und die verkürzte M-Phase in allen Mutanten auf. Einzelne Mutanten zeigten darüber hinaus Abweichungen in der Länge der G_2 -Phase, die S-Phase war dagegen kaum beeinträchtigt.

Zur Untersuchung des Protein-Exports wurde ein Reporter-Konstrukt verwendet, in dem eine Export- und eine Import-Signalsequenz (PKI-NES und SV40-NLS) mit zwei Einheiten GFP verknüpft sind (Stade et al. 1997). Das exprimierte Protein pendelt aktiv zwischen Kern und Zytoplasma, denn es ist zu groß für passive Diffusion durch die Kernporen. In Wildtyp-Zellen war das Reporter-Konstrukt sowohl im Zellkern als auch im Zytoplasma lokalisiert. Das GFP-Signal im Zellkern war dabei etwas stärker. Wird der Xpo1-abhängige Export beeinträchtigt, kommt es zu einer Anreicherung des Reporter-Konstrukts im Zellkern. Dies trat in allen untersuchten Mutanten bei restriktiver Temperatur auf. Eine starke Beeinträchtigung des Protein-Exports war in den drei Mutanten zu erwarten, die Mutationen in der Substrat-Bindungsdomäne tragen. Zwei von ihnen zeigten auch bereits bei permissiver Temperatur einen Defekt im Protein-Export (xpo1-1 und xpo1-127), die dritte jedoch erst bei restriktiver Temperatur (xpo1-140). Hier führte eine Erhöhung der Temperatur auch zu morphologischen Defekten, die auf eine starke Einschränkung des Protein-Exports zurückzuführen sein können. Der Zusammenhang zwischen eingeschränktem Protein-Export und Mutationen in der Substrat-Bindungsdomäne ist jedoch nicht eindeutig, da auch eine Mutante ohne Punktmu-

tationen in dieser Domäne einen Export-Defekt bereits bei permissiver Temperatur zeigte (xpo1-112).

Der Export von snRNA und rRNA ist sowohl in *S. cerevisiae* als auch in höheren Eukaryoten durch Xpo1/Crm1 vermittelt. In der Hefe ist Xpo1 neben dem Mex67-Mtr2-Komplex (Segref et al. 1997) auch am generellen mRNA-Export beteiligt (Stade et al. 1997). In höheren Eukaryoten exportiert Crm1 spezifische zelluläre mRNAs und virale pre-mRNAs. Die RNA wird dabei von Adapter-Proteinen erkannt, die eine NES enthalten und darüber an Xpo1/Crm1 binden (Köhler & Hurt 2007). Deshalb sollten Mutationen in der Substrat-Bindungsdomäne auch den mRNA-Export in *S. cerevisiae* beeinträchtigen. Dies wurde durch *in situ*-Hybridisierung mit dig-markiertem oligo-dT untersucht. Im Wildtyp lokalisierte das mRNA-Signal unabhängig von der Temperatur im Kern und im Zytoplasma. Das Signal-Verhältnis zwischen Kern und Zytoplasma änderte sich in allen Mutanten bei restriktiver Temperatur, eine Akkumulation von mRNA im Zellkern wurde beobachtet. Zwei Mutanten mit stark eingeschränktem Protein-Export (xpo1-127 und xpo1-140) wiesen bereits bei permissiver Temperatur einen Defekt im mRNA-Export auf. In der dritten Mutante mit eingeschränktem Protein-Export (xpo1-1) war der mRNA-Export im Vergleich dazu nicht so stark beeinträchtigt.

Die Mutante xpo1-101 besitzt eine Punktmutation in der Ran-Bindungsdomäne. Da die Bindung von Substrat und Ran-GTP kooperativ erfolgt (Görlich & Kutay 1999), sollte eine Mutation in dieser Domäne generell einen starken Effekt auf die Bindung jeglicher Substrate haben. Dies war für den mRNA-Export auch der Fall, der Protein-Export war jedoch im Vergleich zu anderen Mutanten eher gering beeinträchtigt.

Diese Befunde weisen darauf hin, dass die Export-Funktion von Xpo1 nicht nur von einer strukturell intakten Substrat-Bindungsdomäne abhängt, sondern dass auch Mutationen in anderen Bereichen zu einer Einschränkung des Protein-Exports führen. Trifft das für Crm1 vorgeschlagene Struktur-Modell (Petosa et al. 2004) auch für Xpo1 zu, wird die globale Struktur des Proteins durch HEAT-Wiederholungen definiert. Einzelne Störungen der doppelten Helix-Struktur in diesen HEAT-Motiven könnten eine Auswirkung auf die Gesamtstruktur und damit auf die Funktion des Proteins haben. Insbesondere Störungen der Struktur oder Beweglichkeit der flexiblen Schleife, die für die kooperative Bindung von Ran-GTP und Fracht zuständig sein soll, müssten zu einer generellen Einschränkung in der Export-Funktion von Xpo1 führen.

3.2 Die 2-Hybrid-Analyse findet neue Interaktionspartner von Xpo1

Xpo1 ist in *S. cerevisiae* ein essentielles Protein, was auf eine wichtige Funktion hinweist. Die Suche nach Interaktionspartnern in diesem Organismus gestaltet sich schwierig. Von den wenigen bekannten Export-Substraten, wie Hog1 (Ferrigno et al. 1998), Yap1 (Winey & O'Toole 2001), Ssb1 (Shulga et al. 1999), Ace2 (Jensen et al. 2000) und Prp40 (Murphy et al. 2004), wurden nur einige der beteiligten Kernexport-Sequenzen (NES) auf molekularem Niveau charakterisiert. Die NES-Konsensus-Sequenz ist nicht eindeutig und kann sogar ganz fehlen (Paraskeva et al. 1999). Zudem ist Leucin, ein prominenter Bestandteil von NES, statistisch die häufigste Aminosäure (Görlich &

Kutay 1999). Eine Analyse der Aminosäure-Sequenz eines Proteins gibt deshalb keinen Hinweis darauf, ob es sich um ein Export-Substrat von Xpo1 handelt. Ebenfalls schwierig ist eine Aufreinigung von Xpo1-Substraten aus zellulären Extrakten (Kunzler et al. 2000, Kutay et al. 2005, Maurer et al. 2001). Die Bildung von Export-Komplexen erfolgt nur kooperativ mit Ran-GTP, das im Zellkern in hoher Konzentration vorliegt. Im Zytoplasma verursachen die dort lokalisierten akzessorischen Faktoren RanBP1 und RanGAP eine Hydrolyse von Ran-GTP zu Ran-GDP, und der Export-Komplex zerfällt. Ein Zell-Aufschluss bringt alle Export-Komplexe in Kontakt mit diesen akzessorischen Faktoren, so dass sie einer Analyse nicht mehr zugänglich sind.

Aus diesen Gründen wurde eine 2-Hybrid-Analyse (James et al. 1996) durchgeführt, um neue Interaktionspartner von Xpo1 zu finden. In dieser Analyse ermöglichten acht verschiedene Proteine oder Proteinfragmente das Wachstum auf Reporter-Platten. Darunter befanden sich bereits bekannte Interaktionspartner von Xpo1: zum einen zwei FG-Nukleoporine (Nup42 und Nup49), mit denen Xpo1 während der Passage durch die Kernpore wechselwirkt (Neville et al. 1997, Floer & Blobel 1999, Fornerod et al. 1997), zum anderen das Xpo1-Substrat Yap1 (Yan et al. 1998, Kuge et al. 1997). Dies zeigt, dass die verwendete Analyse in der Lage ist, Interaktionspartner von Xpo1 zu identifizieren.

Als bisher unbekannte Interaktionspartner von Xpo1 wurden Hpa3, Sgm1, Sla2 und Spc72 identifiziert. Für Ltv1, das ebenfalls gefunden wurde, konnte kürzlich eine Funktion im rRNA-Export gezeigt werden (Seiser et al. 2006). Eine Interaktion von Xpo1 mit Sgm1 und Spc72 wurde auch in zwei globalen Analysen der Protein-Protein-Interaktionen in *S. cerevisiae* gezeigt (Uetz et al. 2000, Ito et al. 2001).

In einem Leptomycin B-Test wurden die gefundenen Interaktionspartner weiter untersucht. Leptomycin B bindet kovalent an Crm1 in der Spalthefe und in humanen Zellen und blockiert seine Funktion vollständig, indem die NES-Bindestelle unzugänglich wird (Nishi et al. 1994, Kudo et al. 1998, Neville & Rosbash 1999). Das endogene Xpo1 der Bäckerhefe ist dagegen Leptomycin B-resistent (Hamamoto et al. 1985, Fornerod et al. 1997), aber das Einfügen einer Punktmutation (T539C, Neville & Rosbash 1999) in Xpo1 ermöglicht die kovalente Bindung von Leptomycin B.

Die putativen Interaktionspartner wurden als GFP-Fusionen in einem Hefestamm exprimiert, der die Leptomycin B-sensitive Form von Xpo1 besitzt. Hier führte die Zugabe von Leptomycin B bereits nach 15 Minuten zu einer Anreicherung des bekannten Export-Substrats Yap1-GFP im Kern. Die Lokalisation der putativen Interaktionspartner blieb jedoch auch 60 Minuten nach Zugabe von Leptomycin B unverändert. Dies kann mehrere Gründe haben: erstens führt die 2-Hybrid-Analyse häufig zu falsch positiven Ergebnissen, da die beteiligten Proteine überexprimiert werden und an die GAL4-Domänen fusioniert vorliegen (James et al. 1996). Dies kann zu einer unphysiologischen Interaktion zwischen Proteinen führen. Zweitens könnte es sich bei den gefundenen Proteinen um strukturelle Interaktionspartner und nicht um Export-Substrate von Xpo1 handeln. Das erscheint aufgrund der hauptsächlich zytoplasmatischen Lokalisation der gefundenen Proteine jedoch unwahrscheinlich. Drittens könnte eine starke Verschiebung eines zu untersuchenden Proteins in den Zellkern letal sein, so dass Zellen, in denen dieser Effekt eintritt, nicht beobachtet werden können. Und viertens könnte eine geringe Proteinexpression dazu führen, dass eine Akkumulation im Kern fluoreszenzmikroskopisch nicht nachweisbar ist. Dies könnte insbesondere für Spc72 zutreffen, das

nur in etwa 600 Kopien pro Zelle vorliegt. Dagegen befinden sich etwa 7000 Xpo1-Moleküle und etwa 3000 Moleküle des Kernporen-Bestandteils Nup2 in einer Hefezelle (Yeast GFP Fusion Localization Database, UCSF). Nur ein Teil der 600 Spc72-Moleküle liegt nicht am Spindelpolkörper gebunden vor und steht für ein Pendeln zwischen Kern und Zytoplasma zur Verfügung. Während die starke Konzentration von Spc72-GFP am Spindelpolkörper im Mikroskop deutlich erkennbar ist, könnte eine Anreicherung des pendelnden Anteils der Spc72-GFP Moleküle im relativ großen Kernvolumen lichtmikroskopisch nicht nachweisbar sein.

In humanen Zellen lokalisiert Crm1, das Xpo1-Ortholog, u.a. an den den Centrosomen, den Mikrotubuli-organisierenden Zentren (MTOC) der Zelle (Forgues et al. 2003, Wang et al. 2005). Spc72 ist ein Bestandteil des entsprechenden Organells in der Hefezelle, des Spindelpolkörpers, und deshalb ein interessanter Kandidat für weitere Untersuchungen. Eine mögliche Wechselwirkung zwischen Spc72 und Xpo1 wurde deshalb trotz des negativen Ergebnisses der Leptomycin B-Analyse genauer untersucht. Spc72 verankert den γ -Tubulin-Komplex, den Polymerisationskeim der Mikrotubuli, auf der zytoplasmatischen Seite des Spindelpolkörpers, Spc110 verankert ihn auf der nukleoplasmatischen Seite (Knop & Schiebel 1998, Kilmartin & Goh 1996). In einer gerichteten 2-Hybrid-Analyse wurde getestet, ob Xpo1 auch mit den Bestandteilen des γ -Tubulin-Komplexes und Spc110 wechselwirkt. Interessanterweise interagiert Xpo1 in dieser Analyse mit beiden γ Tub-Komplex-bindenden Proteinen: sowohl mit einem N-terminalen Fragment von Spc110 (Aminosäuren 1–204 von 944) als auch mit dem ursprünglich gefundenen Spc72-Fragment (Aminosäuren 3–433). Die Bestandteile des γ -Tubulin-Komplexes, Spc97, Spc98 und Tub4 zeigen jedoch keine Interaktion mit Xpo1. Auch ein kürzeres N-terminales Fragment von Spc72 (Aminosäuren 1–271) wechselwirkt nicht mit Xpo1, so dass die Xpo1-Spc72-Interaktion vermutlich von Domänen vermittelt ist, die zwischen Aminosäuren 271 und 433 in Spc72 liegen.

3.3 Xpo1 lokalisiert am Spindelpolkörper

Zur Untersuchung ihrer Lokalisation wurden Xpo1 und die Mutante xpo1-1 in lebenden Zellen GFP-markiert. Das typische Lokalisationsmuster zeigte für Wildtyp und Mutante ein starkes Signal im Zellkern, ein schwächeres Signal im Zytoplasma und punktförmige Signale entlang der Kernmembran, bei denen es sich wahrscheinlich um Kernporen handelt, die Xpo1 gerade passiert. Zusätzlich erschienen ein bis zwei stärker leuchtende punktförmige Signale in der Kernmembran. Sie traten in allen beobachteten Zellzyklus-Stadien auf. Dieses Lokalisationsmuster ist spezifisch für Xpo1. Andere Komponenten der Kerntransportmaschinerie wie das Importin β -Ortholog Kap95, das am mRNA-Export beteiligte Protein Sac3 oder das die Bildung von Export-Komplexen stimulierende Protein Yrb2 zeigten andere Lokalisationsmuster, in denen die ein bis zwei stärkeren punktförmigen Signale in der Kernmembran fehlen.

Diese Signale wurden als Spindelpolkörper identifiziert. Dazu wurde YFP-markiertes Xpo1 in einem Stammhintergrund exprimiert, der einen Bestandteil der zentralen Platte des Spindelpolkörpers in CFP-markierter Form trägt. Im Fluoreszenz-Mikroskop überlappten beide Signale deutlich. Die Lokalisation an den Spindelpolkörpern war dabei

sowohl für Xpo1 als auch xpo1-1 unabhängig von der Gegenwart zytoplasmatischer Mikrotubuli. Zusätzlich zur Co-Lokalisation in lebenden Zellen konnte gezeigt werden, dass Xpo1 und das Spindelpolkörper-Protein Spc110 aus einem Zellextrakt in derselben Fraktion eines Sucrose-Gradienten sedimentierten.

Die Lokalisation von Xpo1 an den Spindelpolkörpern wurde auch in einem Spc72-Deletionsstamm beobachtet. Für die Bindung von Xpo1 an den Spindelpolkörper ist also nicht nur Spc72, sondern auch ein oder mehrere andere Proteine verantwortlich. Dabei könnte es sich um Spc110 handeln, das in der gerichteten 2-Hybrid-Analyse als Interaktionspartner von Xpo1 gefunden wurde. Bei der Bindung von Xpo1 an den Spindelpolkörpern kann es sich um eine NES- und Ran-GTP-abhängige Bindung handeln, wie sie auch in Export-Komplexen auftritt. Wird das hohe Ran-GTP-Niveau im Kern erniedrigt, indem eine den Ran-Guanin-Austauschfaktor inhibierende Ran-Mutante überexprimiert wird, verringert sich deutlich der Anteil der Spindelpolkörper, die ein Xpo1-Signal zeigen. Die Bindung von Xpo1 an die Spindelpolkörper ist also Ran-GTP-abhängig und vermutlich über ein NES-Protein vermittelt, das nicht (oder nicht nur) Spc72 ist, bei dem es sich aber um Spc110 handeln könnte.

In Zellkultur-Studien konnte gezeigt werden, dass das Xpo1-Ortholog Crm1 (Forgues et al. 2003), sowie Ran-GTP (Keryer et al. 2003) und RanBP1 (Di Fiore et al. 2003) an den Centrosomen lokalisieren. Die Funktion der Crm1-Bindung scheint in der Regulation der Centrosomen-Verdopplung zu liegen (Forgues et al. 2001). Ein mögliches Ziel könnte das multifunktionale Kernprotein Nucleophosmin sein. Nucleophosmin bindet an die Centrosomen über dort lokalisiertes Crm1, und diese Bindung ist abhängig von einer NES in Nucleophosmin (Wang et al. 2005). Ein Ortholog von Nucleophosmin wurde in der Bäckerhefe bislang nicht gefunden (Jaspersen & Winey 2004), und obwohl der Spindelpolkörper das funktionelle Äquivalent der Centrosomen ist, ist unklar, in wie weit ihre Duplikation ein analoger Prozess ist (Adams & Kilmartin 2000). Die Centrosomen verdoppeln sich im Zytoplasma; in der Hefe dagegen entwickelt sich aus der Halbbrücke auf der zytoplasmatischen Seite des Spindelpolkörpers die Duplikationsplatte (Adams & Kilmartin 1999, Byers & Goetsch 1974, 1975a). Sie wird in die Kernmembran inseriert und nukleäre Komponenten wie Spc110, Cmd1 und der γ -Tubulin-Komplex werden eingebaut (Adams & Kilmartin 1999), so dass ein zweiter Spindelpolkörper entsteht.

Möglicherweise findet die Bindung von Xpo1 an den Spindelpolkörper nicht wie in höheren Eukaryoten über ein zusätzliches Protein wie Nucleophosmin statt, sondern Xpo1 wechselwirkt direkt mit einem Bestandteil des Spindelpolkörpers wie Spc110. In der gerichteten 2-Hybrid-Analyse sind die N-terminalen 204 Aminosäuren von Spc110 ausreichend, um eine Wechselwirkung mit Xpo1 zu vermitteln. In diesem Bereich finden sich mindestens zwei putative NES (155-LYINEIKSL-163 und 165-IKSLKHEIKEL-175). Der N-Terminus von Spc110 ist ein Teil der inneren Platte des Spindelpolkörpers und bindet an Spc98 (Knop & Schiebel 1997, Nguyen et al. 1998, Vinh et al. 2002). Darüber hinaus könnte Spc110 eine regulatorische Funktion besitzen, denn es wird zellzyklus-abhängig phosphoryliert (Friedman et al. 1996, 2001). Diese Phosphorylierung könnte die Bindung an den γ -Tubulin-Komplex verstärken und damit zur Ausbildung einer nukleären Spindel beitragen (Friedman et al. 1996, 2001). Mögli-

cherweise ist Xpo1 an diesem Prozess beteiligt oder in Analogie zur Situation in höheren Eukaryoten an der Regulation der Spindelpolkkörper-Verdopplung.

In der Immuno-Elektronenmikroskopie und der Immuno-Fluoreszenz konnte die Lokalisation von Xpo1 und xpo1-1 an den Spindelpolkkörpern nicht bestätigt werden. Die Darstellung dieser Strukturen ist mit beiden Methoden technisch schwierig (F. Vogel, persönliche Kommunikation). Stattdessen wurden Xpo1-Wildtyp und -Mutante zusätzlich zu ihrer Lokalisation im Zellkern und Zytoplasma auch entlang der Spindel dargestellt. Analog zu diesem Befund wurden in höheren Eukaryoten Crm1 (Arnaoutov et al. 2005) und RanGAP1 (Joseph et al. 2002) an den Kinetochoren gefunden. Eine Funktion in der Mikrotubuli-Bindung an die Kinetochore wurde postuliert (Arnaoutov et al. 2005). Dabei sorgt Kinetochor-gebundenes RCC1 für eine hohe lokale Ran-GTP-Konzentration auch nach dem Zusammenbruch der Kernmembran (Nachury et al. 2001, Wiese et al. 2001, Gruss et al. 2001). In der Bäckerhefe, in der die Kernmembran während der Zellteilung intakt bleibt, könnte Xpo1 eine Rolle in der Bildung von Mikrotubuli im Ran-GTP-reichen Kern spielen, sowohl an den Spindelpolkkörpern als auch an der Spindel selbst.

3.4 Xpo1 wechselwirkt mit Spc72

3.4.1 Identifikation der NES von Spc72

Eine Analyse aller Xpo1-Exportkomplexe ist technisch schwierig, da diese zerfallen, sobald sie in Kontakt mit RanBP1 und RanGAP im Zytoplasma kommen (Kunzler et al. 2000, Kutay et al. 2005, Maurer et al. 2001). Um zu testen, ob es sich bei Spc72 um ein Export-Substrat von Xpo1 handelt, wurde es in einer *in vitro*-Bindungsanalyse untersucht. Dazu wurden die beteiligten Proteine rekombinant exprimiert. Das N-terminale Fragment Spc72⁴³³ verhält sich wie von einem Xpo1-Exportsubstrat erwartet: ein trimere Komplex bildet sich nur aus Xpo1, Spc72⁴⁴³ und Ran-GTP, aber nicht mit Ran-GDP. Die Komplexbildung kann durch ein Peptid, das eine NES enthält, kompetiert werden. Eine mutierte Form des Peptids hat jedoch keinen Einfluss auf die Komplexbildung.

Durch C-terminale Verkürzungen konnten die Aminosäuren 418-427 von Spc72 als putatives NES in der Bindungsanalyse identifiziert werden. Wurden sie mutiert, verringerte sich die Bindung von Xpo1 auf Hintergrund-Niveau. Im Kontext des rekombinant exprimierten Gesamtlänge-Proteins schien diese Mutation jedoch nicht ausreichend zu sein, um die Bindung an Xpo1 zu unterdrücken. Möglicherweise werden hier aufgrund der schwierigen Reinigungsbedingungen hydrophobe Domänen exponiert, die zu unphysiologischem Bindungsverhalten führen.

Weitere *in vivo*-Experimente bestätigten die Funktion der Aminosäuren 418-427 als NES. So verhinderte ihre Mutation im Gesamtlänge-Spc72 dessen Wechselwirkung mit Xpo1 in der 2-Hybrid-Analyse. Die NES von Spc72 war zudem in der Lage, ein Reporter-Protein genau wie die NES der PKI in der Zelle zu verteilen. In dieser Analyse wurde die zu untersuchende Sequenz zwischen die NLS der PKI und zwei Einheiten GFP kloniert. Das entstehende Protein kann nur durch aktiven Transport über seine NLS in den Kern gelangen. Ist die zu untersuchende Sequenz als NES funktionell, wird ein Teil

des Proteins durch Xpo1 aus dem Kern exportiert. Das GFP-Signal findet sich dann im Kern und im Zytoplasma, und eine Störung des Xpo1-abhängigen Exports führt zu einer Anreicherung des Reporter-Konstrukts im Zellkern. Dies wurde sowohl mit dem Reporter-Konstrukt mit der NES der PKI als auch der NES von Spc72 beobachtet.

Die geringe Expressionsrate von Spc72 verhinderte die Beobachtung einer möglichen Akkumulation im Kern nach Ausschalten der Xpo1-Funktion. Eine Überexpression des Gesamtlänge-Proteins führte dagegen zur Bildung von zytoplasmatischen Aggregaten. Deshalb wurden beide Hälften von Spc72 getrennt GFP-markiert und in lebenden Hefezellen untersucht. Die C-terminale Hälfte (Aminosäuren 369-622) wurde einschließlich der NES in das Reporter-Konstrukt eingebracht. Dieses Konstrukt lokalisierte wie zuvor im Kern und im Zytoplasma. Wird die NES aber mutiert, veränderte sich die Lokalisierung zu einer ausschließlich nukleoplasmatischen. Da mutiertes Gesamtlänge-Spc72 in der 2-Hybrid-Analyse keine Wechselwirkung mit Xpo1 zeigte und die Mutation die C-terminale Hälfte des Proteins ausschließlich in den Kern dirigiert, ist die Existenz weiterer C-terminal gelegener NES in Spc72 unwahrscheinlich.

Die N-terminale Hälfte von Spc72 (Aminosäuren 1-433) einschließlich der NES wurde unter dem regulierbaren MET3-Promotor überexprimiert. Im Gegensatz zum Gesamtlänge-Protein wurden hier keine Aggregate beobachtet, sondern das Protein war ausschließlich im Zytoplasma lokalisiert, Kerne und Vakuolen waren frei. Zusätzlich wurde dieses Fragment von Spc72 in die Spindelpolkörper eingebaut. Dies ist überraschend, da die Bindestellen für Kar1 und Nud1 nicht im Fragment enthalten sind. Spc72 bindet über Kar1 an die Halbbrücke und über Nud1 an die äußere Platte des Spindelpolkörpers (Gruneberg et al. 2000, Pereira et al. 1999). Vermutlich lagert sich das GFP-markierte Fragment an bereits vorhandenes Wildtyp-Spc72 im Spindelpolkörper an. Dies könnte über die putativen coiled-coil-Regionen (Knop & Schiebel 1998) vermittelt sein, die Protein-Protein-Wechselwirkungen unterstützen können (Wigge et al. 1998). Eine Polymerbildung von Spc72 über diese coiled-coil-Regionen wurde postuliert (Souès & Adams 1998). Wurde das N-terminale Fragment von Spc72 in der NES mutiert, änderte sich seine Lokalisation: eine Akkumulation im Kern wurde beobachtet, während das Signal im Zytoplasma und an den Spindelpolkörper erhalten blieb. Damit konnte gezeigt werden, dass Aminosäuren 1-433 von Spc72 in den Kern importiert und abhängig von der NES durch Xpo1 exportiert werden.

Die N-terminalen 433 Aminosäuren von Spc72 könnten direkt in den Kern importiert werden. Eine mögliche *monopartite* NLS findet sich beispielsweise in Aminosäuren 7-13 (**PSGRHLR**). Im N-terminalen Bereich von Spc72 befindet sich auch die Bindestelle für Spc98 (Knop & Schiebel 1998), so dass auch ein indirekter Import über die NLS in Spc98 denkbar ist. Ein indirekter Import über ein anderes, unbekanntes Adapter-Protein ist ebenfalls nicht auszuschließen.

Spc72 erfüllt somit die Kriterien eines Exportsubstrats: Die Bindung von Xpo1 an das Spc72-Fragment ist Ran-GTP-abhängig und kann durch ein NES-Peptid kompetiert werden. Eine dem Konsensus entsprechende Leucin-reiche NES wurde in Spc72 identifiziert (Aminosäuren 418-429), deren Mutation die Bindung des Spc72-Fragments an Xpo1 verhindert. Diese NES verleiht den N- und C-terminalen Hälften des GFP-markierten Proteins eine Exportfunktion in lebenden Hefezellen.

3.4.2 Bedeutung der Spc72-NES *in vivo*

Mit verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass Spc72 ein Export-Substrat von Xpo1 ist. Dabei wurden teilweise artifizielle Situationen erzeugt, in denen nur Teile des Proteins untersucht und diese zudem unphysiologisch überexprimiert wurden. Zum Test der NES von Spc72 unter nahezu physiologischen Bedingungen wurde Spc72 chromosomal unter Kontrolle des endogenen Promotors als GFP-Fusion exprimiert. Eine Anreicherung im Kern durch Mutation der NES oder Störung der Xpo1-Funktion konnte nicht beobachtet werden, da die Expressionsrate zu gering ist. Aber die Einführung der NES-Mutation hatte phänotypische Konsequenzen. Zum einen wuchs in der NES mutiertes Spc72 schlechter als der Wildtyp, besonders bei höheren Temperaturen. Zum anderen lokalisierte mutiertes Spc72 nur etwa halb so stark wie das Wildtyp-Protein an den Spindelpolkörpern, obwohl die Proteinmenge vergleichbar war. Auch die untersuchten *xpo1*-Allele führten zu einer Reduktion des Spc72-GFP-Signals an den Spindelpolkörpern.

Spc72 verankert den γ -Tubulin-Komplex an der zytosolischen Seite des Spindelpolkörpers, von dem aus Mikrotubuli polymerisieren (Knop & Schiebel 1998). Eine Verringerung der Spc72-Menge am Spindelpolkörper sollte demnach zu einer Reduktion der Zahl der Zellen mit zytoplasmatischen Mikrotubuli führen. Dies wurde nach Einführen der NES-Mutation in der Tat beobachtet. Die Reduktion entsprach dabei derjenigen, die durch eine vollständige Deletion des Proteins hervorgerufen wird. Darüber hinaus führten auch Mutationen von Xpo1, die den Protein-Export beeinträchtigten, zu einer Verringerung der Zahl der Zellen, die zytoplasmatische Mikrotubuli zeigten.

Der Spindelpolkörper ist eine dynamische Struktur (Yoder et al. 2003). Dies lässt vermuten, dass ein zytoplasmatischer Pool von Spc72 existiert. Sollte Wildtyp-Spc72 in den Kern gelangen, könnte es von Xpo1 exportiert werden. Durch eine Mutation der NES in Spc72 oder durch eine Störung der Xpo1-Funktion in den Xpo1-Mutanten wird dies verhindert, und der normalerweise zwischen Kern und Zytoplasma pendelnde Teil von Spc72 bleibt im Kern. Dies führt zu einer Reduktion von Spc72 auf der zytoplasmatischen Seite des Spindelpolkörpers und damit zu einer Abnahme der Zahl der zytoplasmatischen Mikrotubuli.

3.5 Funktion von Xpo1 in der Spindel-Bildung

In höheren Eukaryoten haben bestimmte Komponenten der Kerntransport-Maschinerie zusätzliche Funktionen in der Bildung der Kernmembran, der Wiederherstellung der Kernporen nach erfolgter Mitose und der Spindelbildung (Dasso 2002, Mosammaparast & Pemberton 2004). In der Bäcker- und Spalthefe ist das Ran-System an der Regulation der Mikrotubuli und der Bildung der Kernporen beteiligt (Fleig et al. 2000, Kirkpatrick & Solomon 1994, Ouspenski 1998, Ryan et al. 2003). Da das Ran-System, die Transport-Rezeptoren und die Bestandteile der Kernporen hoch konserviert sind, sind auch in der Bäckerhefe weitere Funktionen der Kerntransport-Maschinerie denkbar.

In dieser Arbeit konnte eine Wechselwirkung des Kerntransport-Rezeptors Xpo1 mit Spc72, einem Bestandteil des Spindelpolkörpers, gezeigt werden. Die Funktion von Spc72 besteht in der Bindung des γ -Tubulin-Komplexes an der zytoplasmatischen Seite des Spindelpolkörpers (Knop & Schiebel 1998). Warum gelangt Spc72 dann überhaupt in den Kern und wird von Xpo1 wieder exportiert? Mehrere Erklärungen sind denkbar. Ein geringer Teil von Spc72 könnte zufällig in den Kern gelangen. Die Überexpression von Spc110, dessen γ -Tubulin-bindende Domäne durch die von Spc72 ersetzt wurde, ist letal (Knop & Schiebel 1998). Möglicherweise ist also die Gegenwart der γ -Tubulin-bindenden Domäne von Spc72 bzw. des gesamten Proteins im Kern toxisch für die Zelle, indem es beispielsweise die Bildung der Kernspindel stört. Sollte Spc72 doch einmal in den Kern gelangen, wird es deshalb sofort von Xpo1 exportiert.

Der Kernimport und -export von Spc72 könnte auch eine Voraussetzung für die korrekte Spindelbildung sein, weil es im Kern modifiziert wird. Spc72 wird mit Beginn der S-Phase phosphoryliert und relokalisiert dadurch von der Halbbrücke zur äußeren Platte (Gruneberg et al. 2000, Pereira et al. 1999). Die Kinase ist noch unbekannt, möglicherweise handelt es sich um Mps1, das Spc42, Spc110 und Spc98 phosphoryliert (Castillo et al. 2002, Friedman et al. 2001, Pereira et al. 1998) und dessen Lokalisation noch nicht bestimmt wurde. Diese Phosphorylierung oder eine andere Modifikation könnte im Kern stattfinden. Dann müsste alles Spc72 einmal in den Kern gelangen und nach erfolgter Modifikation durch Xpo1 wieder exportiert werden.

Möglicherweise bindet Spc72 auch bereits im Zytoplasma an den γ -Tubulin-Komplex, und erst danach erfolgt der Einbau in den Spindelpolkörper. Die Spindelpolkörper werden nicht nur Molekül für Molekül aufgebaut, sondern z.T. assemblieren bereits vorgeformte Subkomplexe, wie für Cnm67 und Nud1 gezeigt werden konnte (Wigge et al. 1998).

Eine Komponente des γ -Tubulin-Komplexes, Spc98, trägt eine NLS, die den gesamten Komplex in den Kern dirigiert (Geissler et al. 1996). Es wurde postuliert, dass die Bindung von Spc72 die NLS maskiert (Knop & Schiebel 1998), so dass an Spc72 gebundener γ -Tubulin-Komplex im Zytoplasma verbleibt und in den Spindelpolkörper eingebaut werden kann. Es ist jedoch unklar, welche Bereiche von Spc98 durch die Bindung an Spc72 verdeckt werden. Wird die NLS nicht oder nicht vollständig durch die Spc72-Bindung maskiert, könnte ein Teil des Spc72-gebundenen γ -Tubulin-Komplexes über die NLS in Spc98 in den Kern gelangen. Der Export dieser Komplexe durch Xpo1 über die NES von Spc72 würde dann sicherstellen, dass sie auf der richtigen Seite des Spindelpolkörpers integriert werden können.

Dem steht entgegen, dass in der 2-Hybrid-Analyse keine Wechselwirkung von Xpo1 mit dem γ -Tubulin-Komplex gefunden wurde, so dass die Situation vielleicht komplizierter ist. Die 2-Hybrid-Analyse scheint hier jedoch nur bedingt aussagefähig zu sein, da auch eine Wechselwirkung von Gesamtlänge-Spc72 mit Spc98, seinem Bindungspartner im γ -Tubulin-Komplex, nicht gezeigt werden konnte (Knop & Schiebel 1998).

3.6 Offene Fragen

Diese Arbeit liefert weitere Indizien, dass die Kerntransport-Maschinerie auch in der Bäckerhefe *S. cerevisiae* an der Spindel-Bildung beteiligt ist: einerseits bindet Xpo1 an die Spindelpolkörper, andererseits ist Spc72 ein Xpo1-Exportsubstrat. Viele Fragen bleiben jedoch noch offen. So ist die Funktion der Xpo1-Bindung an den Spindelpolkörpern unklar. Die Xpo1-Mutanten zeigen keine offensichtlichen Defekte in der Verdopplung der Spindelpolkörper, und die Lokalisation von Xpo1 scheint zellzyklus-unabhängig zu sein. Möglicherweise handelt es sich um eine strukturelle Funktion, die die Spindelpolkörper stabilisiert oder die Bindung von nukleoplasmatischen Mikrotubuli fördert, ähnlich der Funktion von Stu2 auf der zytoplasmatischen Seite des Spindelpolkörpers (Usui et al. 2003, Chen et al. 1998).

Es ist unwahrscheinlich, dass die Bindung von Xpo1 an den Spindelpolkörpern nur sicherstellt, dass Xpo1 nach der Zellteilung gleichmäßig auf Mutter- und Tochterzelle verteilt wird. Xpo1 lokalisiert im gesamten Nukleoplasma und an den Kernporen, und durch die Kernteilung erfolgt eine gleichmäßige Verteilung auf Mutter- und Tochterzelle.

Die Xpo1-Bindung an die Spindelpolkörper ist wahrscheinlich Ran-GTP-abhängig, da sie durch eine Überexpression von Ran-T26N reduziert wird. Wenn die Bindung auch abhängig von einer NES ist, sollte sie durch Behandlung mit Leptomycin B verringert werden, was in einem Hefestamm, der nur Leptomycin B-sensitives Xpo1 trägt, getestet werden kann. Welches Protein die Bindung vermittelt, ist noch unklar, ein möglicher Kandidat ist das essentielle Protein Spc110. Hier könnten die Untersuchung temperatursensitiver Mutanten von Spc110 *in vivo* und Bindungsanalysen *in vitro* weiteren Aufschluss geben. Die Bindung erfolgt höchstwahrscheinlich auf der nukleären Seite der Spindelpolkörper, da im Zytoplasma eine Komplexbildung ausgeschlossen scheint. Weitere elektronenmikroskopische Untersuchungen könnten dies bestätigen.

Desweiteren wurde in dieser Arbeit eine Lokalisation von Xpo1 an der Spindel in der Elektronenmikroskopie und mit Immuno-Fluoreszenz gezeigt. In höheren Eukaryoten lokalisieren Crm1 (Arnaoutov et al. 2005) und Ran-GAP1 (Joseph et al. 2002) an den Kinetochoren, und eine Funktion in der Mikrotubuli-Bindung an die Kinetochore wurde diskutiert (Arnaoutov et al. 2005). Analog dazu könnte Xpo1 auch in der Bäckerhefe, deren Kernmembran während der Zellteilung intakt bleibt, eine generelle Rolle in der Bildung von Mikrotubuli spielen. Dabei könnte Xpo1 durch die Bindung an die Spindelpolkörper und die Spindel selbst eine Mikrotubuli-Polymerisation im Ran-GTP-reichen Kern fördern.

Schließlich bleibt die Frage offen, wie die Verteilung des γ -Tubulin-Komplexes auf beiden Seiten des Spindelpolkörpers sichergestellt wird. Diese Arbeit eröffnet eine weitere Möglichkeit über den Export Spc72-gebundener γ -Tubulin-Komplexe. Zur Klärung der Analogie der Spindelbildung in Hefe und höheren Eukaryoten und der Ähnlichkeit der Centrosomen- bzw. Spindelpolkörper-Verdopplung ist weitere Forschung erforderlich.

4. Material und Methoden

4.1 Verwendete Hefestämme und ihre Erzeugung

Die in dieser Arbeit verwendeten Hefestämme sind in Tabelle 4.1 aufgelistet. Ihre Manipulation und Analyse erfolgte nach molekularbiologischen Standardmethoden (Ausubel et al. 1989, Guthrie & Fink 1991). Deletion und Modifikation von Hefegenen erfolgte in der Regel nach der von Longtine et al. (1998) beschriebenen Methode, die auf der Integration von Konstrukten aufgrund homologer Rekombination basiert. Als Stammhintergünde wurden W303, DF5 und K842 verwendet.

Tabelle 4.1 In dieser Arbeit verwendete Hefestämme

Name	Genotyp	Referenz
pJ69-4A	<i>MATa, trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7lacZ</i>	James et al. 1996
DF5	<i>Mata/α, trp1-1(am)/trp1-1(am), his3-Δ200/his3-Δ200, ura3-52/ura3-52, lys2-802/lys2-801, leu2-3,-112/leu2-3,-112</i>	D. Finley
YWO1	<i>Matα, trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</i>	Seufert et al. 1990
W303	<i>Mata/α, ade2-1/ade2-1 ura3-1/ura3-1 his3-11,15/his3-11,15 trp1-1/trp1-1 leu2-3,112/leu2-3,112 can1-100/can1-100</i>	Stade et al. 1997
GSY835	XPO1-GFP integriert über <i>Trp</i>	G. Schlenstedt
KSY68	<i>Mat?, XPO1::LEU2 XPO1-GFP (His3) ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	Stade et al. 1997
KSY69	<i>Mat?, XPO1::LEU2 xpo1-1-GFP (His3) ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	Stade et al. 1997
KSY57	<i>Mat?, XPO1::LEU2 XPO1 (His3) ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	Stade et al. 1997
KSY56	<i>Mat?, XPO1::LEU2 xpo1-1 (His3) ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	Stade et al. 1997
KSY447	<i>Mat?, XPO1::LEU2 xpo1-101 (His3) ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	K. Stade
KSY448	<i>Mat?, XPO1::LEU2 xpo1-112 (His3) ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	K. Stade
KSY449	<i>Mat?, XPO1::LEU2 xpo1-127 (His3) ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	K. Stade
KSY450	<i>Mat?, XPO1::LEU2 xpo1-134 (His3) ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	K. Stade
KSY459	<i>Mat?, XPO1::LEU2 xpo1-140 (His3) ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	K. Stade
KWY175	<i>Mat?, XPO1::LEU2 xpo1-T539C (His3) ade2-1 ura3-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 can1-100</i>	K. Stade
DHY45a	<i>MATa, SPC29-CFP (KanMX) ade2-loc ade3D100 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 ura3-1 TR</i>	Yeast Resource Center, Univ. of Washington
KSY456	<i>MATa/a, SPC29-CFP (KanMX) XPO1-YFP (His5) ade2-loc/ade2-loc ade3D100/ade3D100 can1-100/can1-100 his3-11,15/his3-11,15 leu2-3,112/leu2-3,112 ura3-1 TR/ura3-1 TR</i>	diese Arbeit
KSY585	<i>Mata/α, SPC72 (KanMX6) trp1-1(am)/trp1-1(am), his3-Δ200/his3-Δ200, ura3-52/ura3-52, lys2-802/lys2-801, leu2-3,-112/leu2-3,-112</i>	diese Arbeit

KSY586	<i>Mata/α, spc72-NES* (KanMX6) trp1-1(am)/trp1-1(am), his3-Δ200/his3-Δ200, ura3-52/ura3-52, lys2-802/lys2-801, leu2-3,-112/leu2-3,-112</i>	diese Arbeit
KSY581	<i>Mata/α, SPC72-GFP (KanMX6) trp1-1(am)/trp1-1(am), his3-Δ200/his3-Δ200, ura3-52/ura3-52, lys2-802/lys2-801, leu2-3,-112/leu2-3,-112</i>	diese Arbeit
KSY587	<i>Mata/α, spc72-NES*-GFP (KanMX6) trp1-1(am)/trp1-1(am), his3-Δ200/his3-Δ200, ura3-52/ura3-52, lys2-802/lys2-801, leu2-3,-112/leu2-3,-112</i>	diese Arbeit
KSY588	<i>Mata, SPC72 (KanMX6) trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</i>	diese Arbeit
KSY589	<i>Mata, spc72-NES* (KanMX6) trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</i>	diese Arbeit
KSY457	<i>Mata, SPC72-GFP (KanMX6) trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</i>	diese Arbeit
KSY458	<i>Mata, spc72-NES*-GFP (KanMX6) trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</i>	diese Arbeit
KSY462	<i>Mata, SPC72 (KanMX6) GFP-TUB1 (His3) trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</i>	diese Arbeit
KSY463	<i>Mata, spc72-NES* (KanMX6) GFP-TUB1 (His3) trp1-1(am), his3-Δ200, ura3-52, lys2-801, leu2-3,-112</i>	diese Arbeit
KSY361	<i>K842, MATα/alpha, SPC72/spc72::klTRP1 ade2-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ ssd1-d2</i>	K. Stade
KSY544	<i>K842, MAT?, spc72::klTRP1 SPC72-GFP (Ura3) ade2-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ ssd1-d2</i>	diese Arbeit
KSY545	<i>K842, MAT?, spc72::klTRP1 spc72-NES*-GFP (Ura3) ade2-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ ssd1-d2</i>	diese Arbeit
KSY590	<i>K842, MAT?, SPC72 ade2-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ ssd1-d2</i>	diese Arbeit
KSY591	<i>K842, MAT?, spc72::klTRP1 ade2-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ ssd1-d2</i>	diese Arbeit
KSY451	<i>K842, MAT?, SPC72 GFP-TUB1 (His3) ade2-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ ssd1-d2</i>	diese Arbeit
KSY452	<i>K842, MAT?, spc72::klTRP1 GFP-TUB1 (His3) ade2-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ ssd1-d2</i>	diese Arbeit
KSY460	<i>K842, MAT?, SPC72 XPO1-GFP (His3) ade2-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ ssd1-d2</i>	diese Arbeit
KSY461	<i>K842, MAT?, spc72::klTRP1 XPO1-GFP (His3) ade2-1 can1-100 leu2-3,112 his3-11,15 ura3 GAL psi+ ssd1-d2</i>	diese Arbeit
KSY318	<i>GFP-TUB1 (Ura3) in JD-4713c</i>	Stade et al. 2002
KSY453	<i>Mata, XPO1::LEU2 XPO1 (His3) GFP-TUB1 (Ura3) leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 [phi+]</i>	diese Arbeit
KSY454	<i>Mata, XPO1::LEU2 xpo1-1 (His3) GFP-TUB1 (Ura3) leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 [phi+]</i>	diese Arbeit
KSY455	<i>Mata, XPO1::LEU2 xpo1-101 (His3) GFP-TUB1 (Ura3) leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 [phi+]</i>	diese Arbeit
KSY582	<i>Mat?, SPC72-GFP (KanMX) XPO1::LEU2 XPO1 (His3) trp1-1(am) his3-Δ200 ura3-52 lys2-801 leu2-3,-112</i>	diese Arbeit
KSY583	<i>Mat?, SPC72-GFP (KanMX) XPO1::LEU2 xpo1-1 (His3) trp1-1(am) his3-Δ200 ura3-52 lys2-801 leu2-3,-112</i>	diese Arbeit
KSY584	<i>Mat?, SPC72-GFP (KanMX) XPO1::LEU2 xpo1-101 (His3) trp1-1(am) his3-Δ200 ura3-52 lys2-801 leu2-3,-112</i>	diese Arbeit

Zur Erzeugung von KSY57 bzw. KSY56 wurde zunächst in den diploiden Hefestamm W303 sowohl das XPO1-Knockout-Konstrukt pKW435 als auch pKW466 (XPO1-GFP,

URA3) transformiert. Nach Sporulation und Tetradenanalyse wurde ein Stamm isoliert, der Leu^+ und Ura^+ war, d.h. dessen endogenes *XPO1*-Gen durch Insertion des LEU2-Markers zerstört wurde und das funktionell ersetzt wurde durch das *XPO1-GFP*-Gen auf dem URA3-Plasmid. In diesen haploiden Stamm wurden nun die Plasmide pKW440 (*XPO1*, HIS3) bzw. pKW457 (*xpo1-1*, HIS3) transformiert. Durch Plasmid-Shuffling über 5'-FOA-Platten wurde auf die Zellen selektiert, die das URA3-Plasmid verloren hatten, so dass die Stämme KSY57 (*XPO1::LEU2*, *XPO1*) und KSY56 (*XPO1::LEU2*, *xpo1-1*) entstanden.

Zur Erzeugung der Stämme KSY447, KSY448, KSY449, KSY450 und KSY459 wurde die gleiche Strategie wie oben beschrieben angewandt. Statt des Plasmids pKW440 (*XPO1*, HIS3) wurden aber durch chemische Mutagenese daraus erzeugte Mutanten (pKS64 – pKS67) verwendet.

Zur Erzeugung der Stämme KSY68 und KSY69 wurde ebenfalls die oben beschriebene Strategie eingesetzt, aber statt des Plasmids pKW440 wurden die Plasmide pKW470 (*XPO1-GFP*, HIS3) bzw. pKW456 (*xpo1-1-GFP*, HIS3) verwendet. Die Verwendung des Plasmids pKS29 führte mit dieser Strategie zur Erzeugung von KSY175 (*XPO1::LEU2*, *xpo1-T539C*).

Die C-terminale Markierung von *XPO1* mit GFP in GSY835 wurde nach der von Longtine et al. (1998) beschriebenen Methode erzeugt, dabei diente das Plasmid pFA6a-GFP-TRP als PCR-Template.

Sporulation und Tetradenanalyse von KSY361 ergab KSY590 und KSY591. In beiden Stämmen wurde *XPO1* C-terminal GFP-markiert (Longtine et al. 1998) mit dem Plasmid pFA6a-GFP-His3MX6 als PCR-Template, so dass die Stämme KSY460 und KSY461 entstanden.

Die YFP-Markierung von *XPO1* erfolgte mit dem Plasmid pDH5 als PCR-Template. Durch Kreuzung mit dem Stamm DHY45a (*SPC29-CFP*) wurde KSY456 (*SPC29-CFP XPO1-YFP*) erhalten.

KSY462 und KSY463 entstanden durch Transformation des Integrationsplasmids pASF125 (*GFP-TUB1*) in die Stämme KSY588 bzw. KSY589. Ebenso gingen die Stämme KSY451 und KSY452 aus den Stämmen KSY590 bzw. KSY591 hervor. KSY453, KSY454 und KSY455 entstanden durch Transformation von pASF125 (*GFP-TUB1*) in die Stämme KSY57, KSY56 und KSY447.

Die für den C-Terminus von Spc72 und *spc72-NES** kodierende Sequenz (bp 985–1866) wurde durch PCR amplifiziert von den Plasmiden pKS260 und pKS261. Parallel dazu wurde die *kanMX6*-Kassette amplifiziert, dabei diente das Plasmid pFA-*kanMX6* als PCR-Template. In einer zweiten PCR-Reaktion wurden die Produkte der beiden vorangegangenen PCR-Reaktionen kombiniert und mit einem dritten Primer-Paar amplifiziert. Das entstandene PCR-Produkt wurde über ein Agarose-Gel gereinigt, Ethanol-präzipitiert und in den diploiden Stamm DF5 transformiert. Subklonierung und Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigten die Mutationen, und die korrekte Integration wurde durch PCR Southern überprüft. Die so entstandenen Stämme KSY585 und KSY586 wurden sporuliert und eine Selektion auf Kanamycin führte zu den Stämmen KSY588 und KSY589.

Zur Erzeugung von GFP-markiertem Spc72 und *spc72-NES** wurde die gleiche PCR-Strategie mit den Plasmiden pKS223 und pKS224 als PCR-Template benutzt. Trans-

formation in DF5 führte zu den Stämmen KSY581 und KSY587, deren Sporulation und Selektion auf Kanamycin zu KSY457 und KSY458.

Zur Herstellung von KSY582, KSY583 und KSY584 wurde das *XPO1*-Knockout-Plasmid pKW435 in den Stamm KSY581 transformiert und die Integration in den *XPO1* Locus durch PCR Southern überprüft. Zusätzlich wurden die Plasmide pKW440 (*XPO1*), pKW457 (*xpo1-1*) und pKS63 (*xpo1-101*) in diesen Stamm transformiert. Nach Sporulation erfolgte eine Tetradenanalyse durch Selektion auf die Markergene *KanMX6*, *LEU2* und *HIS3*.

KSY544 und KSY545 entstanden durch Transformation von pKS223 bzw. pKS224 in KSY361. Nach Sporulation und Tetradenanalyse wurden Ura⁺ Trp⁺-Stämme isoliert.

4.2 Verwendete Plasmide und ihre Herstellung

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 4.2 aufgelistet. Bei allen Arbeiten mit DNA wurden die üblichen Standardmethoden angewandt (Ausubel et al. 1989).

Tabelle 4.2 In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz
pGEM-T	Klonierungsvektor	Promega
pBluescript KS+	Klonierungsvektor	Stratagene
pFA6a-Serie	Vektoren für die GFP-Markierung von Proteinen in <i>S. cerevisiae</i>	Longtine et al. 1998
pDH5	Vektor für die YFP-Markierung von Proteinen in <i>S. cerevisiae</i>	Yeast Resource Center, Univ. of Washington
pKW465	Xpo1-GFP in pBluescript KS+	Stade et al. 1997
pKW470	Xpo1-GFP in pRS313	Stade et al. 1997
pKS22	Xpo1-GFP unter endogenem Promotor in pRS313	K. Stade
pKW466	Xpo1-GFP in YCp50	K. Stade
pKW456	xpo1-1-GFP in pRS313	Stade et al. 1997
pKW435	Xpo1::LEU2 in pBluescript KS+	Stade et al. 1997
pKW440	Xpo1 in pRS313	Stade et al. 1997
pKW457	xpo1-1 in pRS313	Stade et al. 1997
pKS63	xpo1-101 in pRS313	K. Stade
pKS64	xpo1-112 in pRS313	K. Stade
pKS65	xpo1-127 in pRS313	K. Stade
pKS66	xpo1-134 in pRS313	K. Stade
pKS67	xpo1-140 in pRS313	K. Stade
pKS29	xpo1-T539C in pRS313	K. Stade
pKS15	Yap1-GFP	K. Stade
pASF125	GFP-Tub1 in pRS306	Straight et al. 1997
pGS978	Gal-Gsp1 in YCp	Schlenstedt et al. 1995a
pGS979	Gal-gsp1-G21V in YCp	Schlenstedt et al. 1995a
pGS980	Gal-gsp1-T26N in YCp	Schlenstedt et al. 1995a
pGAD	Gal4-AD	clontech
pGBD	Gal4-BD	clontech
pIA204-1	Xpo1 in Gal4-BD	P. Preker, UCSF
pKS102	Yap1 (AS 84–640) in Gal4-AD	diese Arbeit

pKS103	Sgm1 (AS 218–707) in Gal4-AD	diese Arbeit
pKS104	Spc72 (AS 3–433) in Gal4-AD	diese Arbeit
pKS192	spc72-NES* (AS 3–433) in Gal4-AD	diese Arbeit
pKS193	Spc72 in Gal4-AD	diese Arbeit
pKS194	spc72-NES* in Gal4-AD	diese Arbeit
pKS105	Hpa3 in Gal4-AD	diese Arbeit
pKS106	Ltv1 (AS 55–463) in Gal4-AD	diese Arbeit
pKS107	Sla2 (AS 309–720) in Gal4-AD	diese Arbeit
pKS108	Nup49 in Gal4-AD	diese Arbeit
pKS109	Nup42 (AS 1–379) in Gal4-AD	diese Arbeit
pMK15	Spc97 in Gal4-AD	Knop & Schiebel 1998
pSG26	Spc98 in Gal4-AD	Knop & Schiebel 1998
pSG46	Tub4 in Gal4-AD	Knop & Schiebel 1998
pGP63	Spc72 (AS 1–271) in Gal4-AD	Knop & Schiebel 1998
pMK151	Spc110 (AS 1–204) in Gal4-AD	Knop & Schiebel 1998
pGS512	Xpo1-His ₆ in pQE70	Maurer et al. 2001
pGS467	His ₆ -Gsp1 in pQE9	Maurer et al. 2001
pGEX-6P-1	GST	Amersham
pGS488	NES _{pKI} -2xGFP in pGEX-6P	Maurer et al. 2001
pKS186	Spc72 (AS 3–433) in pGEX-6P	diese Arbeit
pKS187	spc72-NES* (AS 3–433) in pGEX-6P	diese Arbeit
pKS188	Spc72 in pGEX-6P	diese Arbeit
pKS189	Spc72-NES* in pGEX-6P	diese Arbeit
pKS197	Spc72 (AS 3–96) in pGEX-6P	diese Arbeit
pKS198	Spc72 (AS 3–129) in pGEX-6P	diese Arbeit
pKS199	Spc72 (AS 3–163) in pGEX-6P	diese Arbeit
pKS200	Spc72 (AS 3–306) in pGEX-6P	diese Arbeit
pKS201	Spc72 (AS 3–358) in pGEX-6P	diese Arbeit
pKS202	Spc72 (AS 3–398) in pGEX-6P	diese Arbeit
pUL11	MET3 in pRS426	U. Lenk
pKS001	MET3-Spc72 in pRS426	diese Arbeit
pKS002	MET3-spc72-NES* in pRS426	diese Arbeit
pKS223	MET3-Spc72-GFP in pRS426	diese Arbeit
pKS224	MET3-spc72-NES*-GFP in pRS426	diese Arbeit
pKS227	MET3-Spc72 _{N-Term.} -GFP in pRS426 (AS 1–433)	diese Arbeit
pKS228	MET3-spc72-NES* _{N-Term.} -GFP in pRS426 (AS 1–433)	diese Arbeit
pKW430	NLS-NES _{pKI} -2xGFP	Stade et al. 1997
pKS195	NLS-NES _{Spc72} -2xGFP (AS 415–431)	diese Arbeit
pKS225	NLS-Spc72 _{C-Term.} -2xGFP (AS 396–622)	diese Arbeit
pKS226	NLS-spc72-NES* _{C-Term.} -2xGFP (AS 396–622)	diese Arbeit

Das *XPO1*-Gen wurde von genomischer Hefe-DNA amplifiziert und über *Sal I* / *Eco RI* in pBluescript KS+ (Stratagene) kloniert (pKW465). Über *Sal I* / *Bam HI* erfolgte die Umklonierung in YCp50 zur Erzeugung von pKW466 (*XPO1-GFP*, URA3) bzw. in pRS313 zur Entstehung von pKW470 (*XPO1-GFP*, HIS3).

Der *XPO1*-Knockout-Vektor entstand durch Insertion des *LEU2*-Gens, das von genomischer Hefe-DNA amplifiziert wurde, über *Bgl II* / *Hind III* in *XPO1* auf pKW465, so dass pKW435 entstand (*XPO1::LEU2-GFP*, pBluescript KS+). Schneiden dieses Vektors mit *Sal I* / *Nco I* führt zu einem Produkt, das sich durch homologe Rekombination in das Hefegenom einbaut und den *XPO1*-Locus zerstört.

Das *xpo1-1*-Allel entstand durch low fidelity PCR mit genomischer Hefe-DNA als Template (Stade et al. 1997). Die PCR-Produkte wurden über *Sal I / Eco RI* in pBlue-script KS+ (Stratagene) eingefügt und von dort über *Sal I / Bam HI* in pRS313 (pKW456, *xpo1-1-GFP*, HIS3). Ersetzen von GFP durch einen Oligonukleotid-Linker ergab dann pKW457 (*xpo1-1*, HIS3). Chemische Mutagenese von pKW457 führte zur Entstehung der weiteren *xpo1*-Allele (pKS63 – pKS67).

pKS102 – pKS109 wurden aus der initialen 2-Hybrid-Analyse isoliert. pKS192 entstand durch zielgerichtete PCR-Mutagenese (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) von pKS104. Aus genomischer Hefe-DNA des Stamms YWO1 wurde die gesamte kodierende Sequenz von *SPC72* amplifiziert und zunächst in pGEM-T kloniert. Über *Sac I / Bgl II* wurde das *SPC72*-Fragment in pKS104 ersetzt durch die gesamte kodierende Sequenz von *SPC72*, so dass pKS193 entstand. Über *Blp I / Nco I* wurde die für den C-Terminus von Spc72 kodierende Sequenz in pKS193 durch die des *spc72-NES**-C-Terminus aus pKS261 ersetzt, damit ergab sich pKS194.

pKS186 entstand durch Umklonieren des *SPC72*-Fragments aus dem in der initialen 2-Hybrid-Analyse gefundenen pKS104 über *Eco RI* in pGEX-6P-1. Zielgerichtete PCR-Mutagenese (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) ließ daraus pKS187 entstehen. Einfügen von STOP-Codons über zielgerichtete PCR-Mutagenese führte zur Entstehung von pKS197 – pKS202.

Zur Erzeugung von pKS188 wurde zunächst aus genomischer Hefe-DNA die gesamte kodierende Sequenz von *SPC72* amplifiziert und in pGEM-T kloniert. Über *Hind III / Bgl II* bzw. *Bam HI* wurde diese Sequenz in pUL11 kloniert, was zu pKS260 führte. Die Sequenz des *SPC72*-Fragments in pKS186 wurde ausgetauscht durch die Sequenz für das gesamte *SPC72* aus pKS260 durch Schneiden mit *Sac I / Not I* und führte zur Entstehung von pKS188. Ersetzen der kodierenden Sequenz für den C-Terminus von Spc72 in pKS188 durch die mutierte Sequenz aus pKS261 über *Blp I / Nco I* ergab pKS189.

Zur Erzeugung von pKS223 wurde zunächst aus genomischer Hefe-DNA des Stamms KSY178 die Sequenz von *SPC72-GFP* amplifiziert und in pGEM-T kloniert. Diese ersetzte über *Eco RI / Spe I* das *SPC72*-Fragment in pKS260, so dass pKS223 entstand. Die NES-Mutation wurde über *Blp I / Eco RI* aus pKS187 in pKS223 eingefügt, was zu pKS224 führte. Die für GFP kodierende Sequenz wurde über *Bam HI* ausgeschnitten und der Vektor wieder ligiert, so dass pKS261 erzeugt wurde.

pKS227 und pKS228 entstanden durch PCR-Amplifikation der für den C-Terminus von Spc72 kodierenden Sequenz aus genomischer Hefe-DNA der Stämme KSY457 und KSY458. Über das BD In-Fusion Klonierungssystem (Clontech) wurden die Produkte in pKW430 kloniert. Die 3'-gelegenen 775 Basenpaare wurden durch Schneiden mit *Eco RI / Bam HI* freigesetzt, so dass pKS227 und pKS228 entstanden.

Zur Erzeugung des Plasmids pKS195 (NLS-NES_{Spc72}-2xGFP) wurde zunächst der Vektor pKW430 mit *Bam HI / Eco RI* geschnitten, so dass die Sequenz der PKI-NES und eine GFP-Sequenz ausfielen. Vom Template pS65T-C1 (Invitrogen) wurde eine GFP-Sequenz durch PCR amplifiziert. Der verwendete *forward*-Primer enthielt dabei die für die NES von Spc72 kodierende Sequenz. Das PCR-Produkt wurde zunächst in pGEM-T

kloniert, sequenziert und schließlich über *Bam HI* / *Eco RI* in den geschnittenen Vektor pKW430 eingefügt.

Um pKS225 zu erhalten, wurde von genomischer Hefe-DNA (Stamm KSY457) die kodierende Sequenz für Aminosäuren 396-622 von Spc72 und das anschließende GFP amplifiziert. Diese Sequenz ersetzte die PKI-NES und ein GFP in pKW430 über *Eco RI* / *Bam HI*, so dass pKS225 entstand. pKS226 wurde durch zielgerichtete PCR-Mutagenese von pKS225 (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit, Stratagene) erzeugt.

4.3 Grundlegende Methoden

4.3.1 Anzucht von Hefen

Die Anzucht von Hefen in Flüssigmedium erfolgte entweder in Vollmedium (YPD) oder Minimalmedium (SD) (Sherman et al. 1991). Letzteres ermöglicht durch Weglassen einer oder mehrerer Aminosäuren die Selektion von Zellen mit bestimmten Markergenen, die das Wachstum unabhängig von diesen Aminosäuren erlauben. Eine weitere Selektionsmethode ergibt sich durch Zugabe von Kanamycin oder 5'-Fluororotsäure (5'-FOA). Wenn nicht anders angegeben, wurden die Hefen in einem Schüttelinkubator unter aeroben Bedingungen bei 30 °C angezogen. Zur Herstellung fester Medien wurden die Flüssigmedien mit 2 % Agar versehen und in Petrischalen gegossen.

<u>YPD</u>	<u>SD</u>
1 % Bacto-Hefeextrakt	6,7 g/l Yeast Nitrogene Base
2 % Bacto-Pepton	2 % Glukose
2 % Glukose	<i>Aminosäuren:</i> Adeninsulfat 20 mg/l, Uracil 20 mg/l,
pH 5,5	L-Tryptophan 20 mg/l, L-Histidin 20 mg/l, L-Leucin
	30 mg/l, L-Lysin 30 mg/l
	<i>Kanamycin:</i> 200 mg/l
	<i>5'-FOA:</i> 1 mg/ml

4.3.2 Sporulation und Tetradenanalyse

Zur Sporulation und Tetradenanalyse diploider Hefestämme wurden 0,5 OD₆₀₀ einer über Nacht gewachsenen, stationären Hefekultur in 5 ml PreSpo-Medium verdünnt und für 6 Stunden bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch vorsichtiges Zentrifugieren sedimentiert, dreimal unter sterilen Bedingungen mit Wasser gewaschen und in 3 ml Spo-Medium aufgenommen. Nach zweitägiger Inkubation wurden die Zellen, sofern die im Lichtmikroskop bestimmte Sporulationsrate über 80 % lag, zentrifugiert und in 200 µl SED aufgenommen. Die Zellwand wurde durch Zugabe von 10 µl Zymolyase (10 µg/ml) und 5 µl Dithiothreitol (1 M) für 20 Minuten bei Raumtemperatur abgedaut. Die Sporen wurden anschließend mit einem Mikromanipulator auf YPD-Platten gelegt und bei 30 °C inkubiert.

<u>PreSpo-Medium</u>	<u>Spo-Medium</u>	<u>SED</u>
0,8 % Bacto-Hefeextrakt	1 % Kaliumacetat	1 M Sorbit
0,3 % Bacto-Pepton	0,1 % Bacto-Pepton	25 mM EDTA
10 % Glukose	0,05 % Glukose	

4.3.3 Tüpfeltest zur Analyse des Zellwachstums

Hefezellen einer frühen logarithmischen Wachstumsphase wurden auf eine OD_{600} von 0,4 eingestellt und anschließend in einer Verdünnungsreihe in den Verhältnissen 1:10, 1:100 und 1:1000 mit Wasser verdünnt. Von diesen Verdünnungen wurden jeweils 2 μ l in einer Reihe auf eine YPD- oder SD-Platte getüpfelt und bei den angegebenen Temperaturen für 48 Stunden inkubiert.

4.3.4 Immunoblotten

Standardmethoden wurden für die Durchführung der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) verwendet (Ausubel et al. 1989). Die zu untersuchenden Proben wurden für 10 Minuten bei 90 °C in Probenpuffer erhitzt. Die Proben wurden auf einem Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden mit einer Hoefer Western Blot-Apparatur aus dem Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF-Membran) übertragen (90 Minuten bei 80 V). Die PVDF-Membran wurde anschliessend mit 5 % Milchpulver in 1x TBT abgesättigt und mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die zweite Inkubation mit sekundärem, Peroxidase-gekoppeltem Antikörper wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Visualisierung erfolgte mit dem ECL-System (Amersham) und Auflegen eines Röntgenfilms (Kodak).

<u>Probenpuffer</u>	<u>10x TBT</u>
4 % SDS	0,5 M Tris-HCl pH 7,5
20 % Glycerin	1,5 M NaCl
135 mM Tris pH 6,8	1 % Tween 20
100 mM Dithiothreitol	
0,1 % Bromphenolblau	

Die verwendeten primären Antikörper waren anti-Xpo1 (Kaninchen polyklonal, affinitäts-gereinigt, 1 : 5000, A. Witstruck), anti-GST (Maus monoklonal, 1 : 1000, Rockland) und anti-GFP (Kaninchen polyklonal, 1 : 1000, Santa Cruz).

4.3.5 Mikroskopie

Zur Mikroskopie wurde das Axioplan II Mikroskop mit der AxioCam Digitalkamera und dem AxioVision 3.0 Programm benutzt. Filtersätze waren Zeiss 01 (DAPI), 05 (CFP), 09 (FITC), 13 (GFP/YFP). Die Belichtungszeiten innerhalb eines Experiments wurden konstant gehalten. Die Weiterverarbeitung der Fotos erfolgte mit Adobe Photoshop 7.0.

Hefestämme, die fluorophor-markierte Proteine exprimieren, wurden in entsprechendem Minimalmedium angezogen, dabei sorgte die Zugabe von 20 μ g/ml Adenin für eine Unterdrückung der Auto-Fluoreszenz. Die Fluorophor-Signale von Zellen in der frühen logarithmischen Wachstumsphase wurden im Mikroskop analysiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde 1 μ l DAPI (1 mg/ml) auf 1 ml Kulturvolumen zugegeben.

4.4 Methoden zur Charakterisierung der Xpo1-Mutanten

4.4.1 Degradations-Analyse

Die Xpo1-Stämme wurden im 25 °C-Wasserbad bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Dann wurden die Kulturen halbiert und für eine Stunde bei 37 °C bzw. 25 °C inkubiert. Je 8 OD Zellen wurden bei 4 °C pelletiert, mit 1 ml kaltem Na-Azid (10 mM) gewaschen und in 100 µl Lyse-Puffer_{PMSF+PI} resuspendiert. Nach zweiminütigem Glaskugel-Aufschluss auf dem Schüttelvortex wurden 900 µl Verdünnungs-Puffer zugegeben und bei 14 000 rpm und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Die Proteine im Überstand wurden durch Zugabe von TCA präzipitiert und in 60 µl Probenpuffer aufgenommen.

<u>Lyse-Puffer</u>	<u>Verdünnungs-Puffer</u>	<u>PMSF</u>
1 % SDS	1,1 % Triton	100 µg/ml Endkonzentration
50 mM Tris-HCl pH 7,5	50 mM Tris-HCl pH 7,5	
	165 mM NaCl	<u>PI-Mix</u> (Endkonzentration)
	5 mM EDTA	10 µg/ml Chymostatin
		10 µg/ml Leupeptin
		10 ng/ml Aprotinin

4.4.2 Zellzyklus-Analyse

Zellen wurden über Nacht in 2 ml SD -Ura -His bei 30 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Kultur auf eine OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt und bei 30 °C bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert. Nach Zugabe von Formaldehyd (3,7 % Endkonzentration) wurden die Zellen 15 Minuten bei 37 °C inkubiert, einmal in 1x PBS gewaschen, zentrifugiert und in 50 µl 1x PBS resuspendiert. Die Auszählung der Zellzyklus-Stadien erfolgte im Lichtmikroskop unter Durchlicht-Bedingungen.

4.4.3 Untersuchung des Protein-Exports

Das Plasmid pKW430 wurde in die Hefestämme KSY57, KSY56 und KS447–KSY459 transformiert. Die Kulturen wurden in SD -Ura bis zur Mitte der logarithmischen Wachstumsphase im 25 °C-Wasserbad angezogen. Vor und nach einer Temperaturerhöhung auf 37 °C für 15 Minuten wurden die GFP-Signale in lebenden Zellen analysiert.

4.4.4 Untersuchung des mRNA-Exports

Die Untersuchung des mRNA-Exports wurde wie beschrieben vorgenommen (Amberg et al. 1992, Kadowaki et al. 1994). Zur Herstellung Dig-markierter (dT)50-Oligos wurden 800 pmol (dT)50-Oligo mit Digoxigenin-11-dUTP (25 µM Endkonzentration), dTTP (10 µM Endkonzentration) und 150 Einheiten Terminaler Deoxynukleotidyl-Transferase in 100 µl 1x Reaktionspuffer 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Ethanol-Fällung wurde das Pellet in 500 µl DEPC-Wasser aufgenommen.

Die Xpo1-Mutanten wuchsen bei 25 °C bzw. 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3. Je 1 ml Zellsuspension wurde mit Formaldehyd (5 % Endkonzentration) eine Stunde lang fixiert, zweimal mit 500 µl Sorbitol-Puffer (1,2 M) gewaschen und in 100 µl Zymolyase-Lösung resuspendiert. Nach 40 Minuten bei 37 °C wurde die Zymolyase-Aktivität

durch Zugabe von 100 µl Formaldehyd-PBS gestoppt. In jede Kammer einer Polylysin-beschichteten 16-Well-Chamberslide (Lab Tek) wurden 100 µl dieser Lösung gegeben und zwei Minuten inkubiert. Nach Absaugen und Trocknen an der Luft wurde auf Eis 6 Minuten lang mit Methanol (-20 °C) inkubiert, abgesaugt und luftgetrocknet.

Der Hybridisierungs-Mix wurde 10 Minuten lang auf 90 °C erhitzt, dann bei 55 °C warmgehalten. Der Objektträger wurde 10 Minuten lang in einer feuchten Kammer bei 37 °C vorgewärmt.

Pro Kammer wurden 50 µl Hybridisierungs-Mix zugegeben und über Nacht bei 37 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Unter leichtem Schütteln wurde mit je 250 µl wie folgt gewaschen: 30 Minuten mit 2x SSC bei Raumtemperatur, 30 Minuten mit 1x SSC bei Raumtemperatur, 10 Minuten mit 0,5x SSC bei 37 °C und 30 Minuten mit 0,5x SSC bei Raumtemperatur.

Je 50 µl Block-Puffer wurden für 30 Minuten bei 37 °C zugegeben und abgesaugt. Mit je 30 µl Anti-Digoxigenin-Antikörper (Maus monoklonal, Roche Molecular Biochemicals, 1:50 in Block-Puffer) wurde 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend dreimal 5 Minuten mit PBS gewaschen. Je 30 µl FITC-markierter Ziege Anti-Maus-Antikörper (Roche Molecular Biochemicals, 1:400 in Block-Puffer) wurden für 30 Minuten bei 37 °C zugegeben. Nach dreimal fünfminütigem Waschen mit PBS wurden auf einem 55 °C-Heizblock 18 µl Mounting-Medium aufgetropft und mit einem Deckgläschen abgeschlossen.

Sorbitol-Puffer (1,2 M)
10,93 g Sorbitol in
50 ml Kaliumphosphat-Puffer

Kaliumphosphat-Puffer 0,1 M
3295 µl K₂HPO₄ 1 M
6705 µl KH₂PO₄ 1 M
ad 100 ml mit DEPC-Wasser

DEPC-Wasser
0,1 % Diethylpyrocarbonat
über Nacht stehen lassen,
autoklavieren

Zymolyase-Lösung
20 µl Zymolyase 1 mg/ml
1 ml β-Mercaptoethanol
ad 1 ml mit Sorbitol-Puffer 1,2 M

Formaldehyd-PBS
8 % Formaldehyd
10 mM MgCl₂
in 1x PBS

10x PBS
40 g NaCl
1 g KCl
5,75 g Na₂HPO₄ · 2 H₂O
ad 500 ml mit H₂O, pH 7,2

2x Hybridisierungs-Lösung
5x SSC
10 % Denhardt's
0,02 % Tween
20 mM Vanadyl-Komplex
ad 5 ml mit DEPC-H₂O

20x SSC
3 M NaCl
0,3 M Na-Citrat
in DEPC-H₂O, pH 7,0

Block-Puffer

1 % Blocking agent (Roche)
10 mM MgCl₂
in DEPC-H₂O

Hybridisierungs-Mix

500 µl 2x Hybridisierungs-Lösung
300 µl Formamid
120 µl DEPC-H₂O
20 µl SSS DNA 5 mg/ml
(100 µg/ml Endkonzentration)
20 µl *E. coli* tRNA 10 mg/ml
(200 µg/ml Endkonzentration)
40 µl Dig-markiertes (dT)₅₀
(oligo ca. 17 ng/µl, 1 pmol/µl)

4.5 Untersuchung der 2-Hybrid-Interaktionen

4.5.1 Ungerichtete und gerichtete 2-Hybrid-Analyse

Die 2-Hybrid-Analysen folgten dem Protokoll nach James et al. 1996. Als Köder-Plasmid diente pIA204-1 (pGBD-Xpo1), ein Geschenk von Pascal Preker (Universität von San Francisco, Kalifornien). Zur ungerichteten 2-Hybrid-Analyse wurde dieses Plasmid und eine genomische Hefe-Bibliothek auf pGAD (Elizabeth Craig, Universität von Wisconsin, Madison) separat in den Hefestamm PJ69-4a transformiert. Daraus entstanden 3×10^6 Transformanten, die das Hefegenom fünfmal repräsentieren. Nach zehn Tagen bei 30 °C auf Reporterplatten (SD -Trp -Leu -His) wurden 264 Kolonien isoliert, von denen 62 auf SD -Trp -Leu -Ade-Platten wuchsen. Die Plasmide dieser Stämme wurden isoliert und retransformiert in den pGBD-Xpo1 exprimierenden PJ69-4a-Stamm. 32 Plasmide mit positiver Interaktion wurden sequenziert.

Zur gerichteten 2-Hybrid-Analyse wurden die entsprechenden Plasmide in den Stamm PJ69-4a cotransformiert. Zur Kontrolle der Transformation wurde auf SD -Trp -Leu +Met-Platten (3 mM Methionin) selektiert. Die Interaktion wurde anschließend auf Reporterplatten (SD -Trp -Leu -His +Met) getestet.

4.5.2 Leptomycin B-Test zur Lokalisation der putativen NES-Substrate

Im Stamm KWY175 (*XPO1::LEU2, xpo1-T539C*) wurden die in der ungerichteten 2-Hybrid-Analyse gefundenen putativen Interaktionspartner C-terminal GFP-markiert. Dabei diente das Plasmid pFA6a-GFP(S65T)-TRP1 als PCR-Template (Longtine et al. 1998). Die korrekte Integration wurde durch PCR Southern überprüft.

Zellen wurden in entsprechendem Minimalmedium mit Adenin bis zur frühen logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,4$) bei 25 °C inkubiert. Die Lokalisation der markierten Proteine wurde im Mikroskop bestimmt. 500 µl Zellsuspension wurden mit Leptomycin B versetzt (LC Laboratories, Endkonzentration 100 ng/ml) und nach 60 Minuten bei 25 °C die Lokalisation der markierten Proteine erneut bestimmt. Als Kontrolle der Leptomycin B-Wirkung diente der Stamm KWY175, der mit dem Plasmid pKS15 (*YAP1-GFP*) transformiert wurde. Yap1-GFP akkumulierte bereits nach 15 Minuten Leptomycin B-Behandlung im Zellkern.

4.6 Methoden zur Untersuchung der Lokalisation von Xpo1

4.6.1 Immuno-Fluoreszenz von Xpo1 und xpo1-1

Zellen der Stämme KSY68 und KSY69 wuchsen in YPD bei 25 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4. Je 2 ml Zellsuspension wurden abgenommen und bei 25 °C und 37 °C für 30 Minuten inkubiert. Die Fixierung erfolgte durch tropfenweise Zugabe von Formaldehyd (4 % Endkonzentration) und anschließendem 60minütigem Schütteln bei gleicher Temperatur.

Je 1 ml der Zellsuspension wurde sedimentiert, das Pellet zweimal mit Sorbitol-Puffer gewaschen und in 100 µl Zymolyase-Lösung resuspendiert. Die Proben wurden im 37 °C-Heizblock etwa 40 Minuten inkubiert, bis die Spheroblasten-Bildung 30–40 % betrug. Nach Zugabe von 100 µl Formaldehyd-PBS zum Abbruch der Zymolyase-Aktivität wurden je 50 µl Zellsuspension pro Well einer Polylysin-beschichteten 16-Well-Chamberslide (Lab Tek) gegeben und 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Auf Eis erfolgte die Zugabe von 100 µl Methanol (-20 °C). Nach 6 Minuten wurden die Überstände abgesaugt, 100 µl Aceton (-20 °C) zugegeben und nach 30 Sekunden wieder abgesaugt. Die Objektträger tockneten dann 5 Minuten bei Raumtemperatur.

Die Objektträger wurden fünfmal mit 200 µl PBS pro Well gewaschen, bevor 75 µl Block-Puffer zugegeben und in einer feuchten Kammer über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert wurde. Der Block-Puffer wurde abgesaugt und der primäre Antikörper (Ratte anti-Tubulin, 1:200, Roche Molecular Biochemicals) zugegeben. Nach Inkubation für zwei Stunden bei 30 °C wurde der Objektträger viermal mit PBS gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (Ziege Anti-Ratte, FITC-gekoppelt, 1:1000, Roche Molecular Biochemicals) für zwei Stunden bei 30 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Nach viermaligem Waschen mit PBS wurde der obere Teil der Kammer abgebrochen, restliche Dichtungsmasse abgekratzt und 18 µl geschmolzenes Mounting-Medium auf den Objektträger gegeben, bevor das Deckgläschen angedrückt wurde.

Sorbitol-Puffer (1,2 M)

10,93 g Sorbitol in
50 ml Kaliumphosphat-
Puffer 0,1 M pH 7,2

Zymolyase-Lösung

40 µl Zymolyase 1 mg/ml
2 µl β-Mercaptoethanol
ad 1 ml mit Sorbitol-Puffer

Formaldehyd-PBS

8 % Formaldehyd
in 1x PBS

10x PBS

40 g NaCl
1 g KCl
1 g KH₂PO₄
5,75 g Na₂HPO₄ · 2 H₂O
ad 500 ml mit H₂O
pH 7,2

Block-Puffer 1 %

0,1 % Blocking Reagent
in 10 ml 1x PBS
lösen bei 60 °C

Mounting-Medium

15 ml Glycerolgelatin
im Wasserbad auf 65 °C erwärmen,
225 µl p-Phenylendiamin (25 mg/ml) und
7,5 µl DAPI (1 mg/ml) zugeben

4.6.2 Einfluss von Nocodazol

20 ml SD -Ura wurden mit Vorkulturen der Hefestämme KSY318 (*XPO1*, *GFP-TUB1*) sowie KSY68 (*XPO1-GFP*) und KSY69 (*xpo1-1-GFP*) auf eine OD₆₀₀ von 0,2 angeimpft und im 25 °C-Wasserbad inkubiert, bis die OD₆₀₀ etwa 0,5 betrug. 10 ml der Kultur wurden mit 30 µg/ml Nocodazol (Sigma), die anderen 10 ml mit dem entsprechenden Volumen DMSO versetzt und über Nacht im 25 °C-Wasserbad inkubiert. Am nächsten Morgen waren in der Nocodazol-behandelten Probe etwa 70 % der Zellen hantelförmig, in der DMSO-Kontrolle nur etwa 10 %. Die GFP-Signale von Xpo1 und Tub1 wurden im Mikroskop analysiert.

4.6.3 Co-Fraktionierung von Xpo1 und Spc110 im Sucrose-Gradienten

Der Sucrose-Gradient wurde in Zentrifugen-Röhrchen (Beckman) aufgebaut. Dazu wurden jeweils 400 µl 40 %, 30 %, 20 %, 10 % und 5 % Saccharose-Lösung vorsichtig überschichtet. Nach 45 Minuten bei Raumtemperatur hatte sich ein kontinuierlicher Gradient gebildet.

Wildtyp-Zellen (W303) wuchsen bei 30 °C in YPD. 80 OD Zellen wurden sedimentiert, einmal mit Na-Azid (10 mM) gewaschen und in 85 µl Lysis-Puffer_{PMSF+PI} resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mit Glaskugeln bei 4 °C auf dem Schüttelvortex. Der Überstand wurde abgenommen, die Glaskugeln mit 100 µl Lysis-Puffer_{PMSF+PI} gewaschen und mit dem Überstand vereinigt. Zellrümpfer wurden abzentrifugiert. Zur Abtrennung des Zytoplasts erfolgte eine Zentrifugation bei 13 000 x g für 20 Minuten. Das Pellet, das die Kerne und Organellen enthielt, wurde in 100 µl Resuspensions-Puffer_{PMSF+PI} aufgenommen und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer Ultrazentrifugation (100 000 x g, 15 Minuten) zur Abtrennung der Membranen wurden die Überstände abgenommen, mit den Marker-Proteinen (50 µg BSA, 50 µg Aldolase, 100 µg Catalase, 140 µg Thyroglobulin) gemischt und auf den Gradienten gegeben.

Die Gradienten-Zentrifugation erfolgte bei 210 000 x g für 5 Stunden. Der Gradient wurde in 150 µl-Schritten abgenommen. 15 µl jeder Fraktion wurden mit 3 µl Probenpuffer gemischt, auf ein Polyacrylamid-Gel aufgetragen und dieses mit Coomassie gefärbt. Der Rest der Fraktionen wurde mit TCA behandelt, in Probenpuffer resuspendiert und nach Trennen über ein Polyacrylamid-Gel im Immunoblot untersucht.

Lysis-Puffer

1 mM EDTA
2 mM DTT
0,1 mM GTP
in 1x HB-Puffer

10x HB-Puffer

400 mM K-HEPES
10 mM EGTA
10 mM MgCl₂

10x HB100-Puffer

400 mM K-HEPES
1 mM KCl
10 mM EGTA
10 mM MgCl₂

Resuspensions-Puffer

1 mM EDTA
2 mM DTT
0,1 mM GTP
1 % NP-40
in 1x HB100-Puffer

Saccharose-Lösungen

1x HB100-Puffer mit
2 mM DTT
0,1 mM GTP
Saccharose entspr. 40 %, 30 %, 20 %, 10 %, 5 % Endkonzentration

4.6.4 Überexpression von Ran

Die Plasmide pGS978 (Wildtyp-Gsp1), pGS979 (Gsp1-G21V) und pGS980 (Gsp1-T26N) wurden in den Stamm KSY456 (*SPC29-CFP*, *XPO1-YFP*) transformiert. Zur Selektion auf die Plasmide wuchsen die Stämme in SD -Ura als Vorkultur. Die eigentliche Anzucht erfolgte in Selektivmedium mit 2 % Raffinose, um die reprimierende Wirkung der Glukose zu minimieren. Die Proteinexpression wurde durch dreistündiges Wachstum in Selektivmedium mit 2 % Galaktose induziert. Für jede Ran-Mutante wurden 100 zufällig ausgewählte Zellen, die ein Spc29-CFP-Signal zeigten, auf die Gegenwart oder Abwesenheit von Xpo1-YFP an derselben Stelle untersucht. Die Resultate dreier unabhängiger Experimente wurden vereinigt.

4.7 Methoden zur *in vitro*-Bindungsanalyse

4.7.1 Anzucht von Bakterien

E. coli-Zellen wurden in LB-Medium bei 37 °C unter aeroben Bedingungen angezogen. Zur Selektion wurden entsprechende Antibiotika (50 µg/ml Ampicillin, 20 µg/ml Kanamycin) eingesetzt. Für das Wachstum auf Festmedium wurde LB-Medium mit 1,6 % Agar versetzt.

LB-Medium

1 % Bacto-Trypton

0,5 % Hefeextrakt

1 % NaCl

4.7.2 Rekombinante Expression und Reinigung His-markierter Proteine

Die Expression und Reinigung rekombinanter Proteine erfolgte nach Maurer et al. 2001. Im Detail wurden 1 µl des Plasmids pGS512 (Xpo1-His₆) in 50 µl JM101-Zellen elektrottransformiert. Nach Zugabe von 500 µl SOC-Medium wurden die Zellen 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der gesamte Transformationsansatz wurde in 100 ml LB_{Amp} über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 800 ml LB_{Amp} auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 inkubiert. Ein Aliquot von 250 µl wurde abgenommen (–, vor Induktion), zentrifugiert und das Pellet in 50 µl Probenpuffer resuspendiert.

Zur Abkühlung der Lösung wurden 100 ml LB_{Amp} mit einer Temperatur von 4 °C zugegeben, zur Induktion des Promotors 150 µl IPTG (1 M) und zur Verringerung der Bildung von Einschlusskörpern 10 ml Ethanol (100 %). Die Induktion erfolgte für drei Stunden in einem 15 °C-Wasserbad. Ein Aliquot von 250 µl wurde abgenommen (+, nach Induktion), zentrifugiert und das Pellet in 50 µl Probenpuffer resuspendiert.

Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation bei 7000 rpm für 5 Minuten (4 °C) in der Sorvall GS3-Zentrifuge sedimentiert. Das Pellet wurde in 10 ml Lyse-Puffer_{PMSF+PI} resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall (4x 20 Pulse à 0,7 Sekunden, Branson Sonifier 450) auf Eis. Nach einer Zentrifugation (Sorvall SS-34, 18 000 rpm, 4 °C, 30 Minuten) wurden 40 µl des Überstands (Ü) abgenommen und mit 60 µl Probenpuffer versetzt. Das Pellet wurde in 5 ml Wasser resuspendiert, davon 10 µl abgenommen (P) und mit 90 µl Probenpuffer versetzt.

300 µl Nickel-NTA-Matrix (Qiagen) wurden zweimal mit 10 ml Lyse-Puffer gewaschen. Der Überstand der Zentrifugation wurde zugefügt und für eine Stunde bei 4 °C auf dem Rotator inkubiert. Die Matrix wurde in eine Säulenvorrichtung (Econo-Column, Bio-Rad) überführt. 10 µl des Durchflusses (Df) wurden abgenommen und mit 40 µl Probenpuffer versetzt. Die Matrix wurde einmal mit 10 ml Lyse-Puffer_{PMSF+PI} und zweimal mit 10 ml Wasch-Puffer_{PMSF+PI} für 5 Minuten auf dem Rotator gewaschen. Von den Wasch-Schritten wurden jeweils 1 ml abgenommen, die Proteine mit TCA präzipitiert und das Pellet in 40 µl Probenpuffer resuspendiert (W1-W3).

Die Elution gebundener Proteine von der Ni-NTA-Matrix erfolgte durch Zugabe von viermal 500 µl Elutions-Puffer_{PMSF+PI} für jeweils 5 Minuten auf dem Rotator. 5 µl der Elutions-Fractionen wurden mit 45 µl Probenpuffer versetzt (E1-E4). Die Matrix wurde mit 150 µl Elutions-Puffer vermischt, davon wurden 20 µl abgenommen und mit 20 µl Probenpuffer versetzt (M).

Eine erste Bestimmung des Proteingehalts der Elutions-Fractionen erfolgte durch Tüpfeln von je 1 µl auf eine Nitrozellulose-Membran und Färben mit Amidoschwarz. Die Fractionen mit dem höchsten Proteingehalt (gewöhnlich die ersten beiden Fractionen) wurden vereinigt und eine Proteinbestimmung nach Lowry erfolgte mit dem Bio-Rad D_C Protein Assay. Dabei diente eine BSA-Eichreihe als Standard.

Lag der Proteingehalt unter 1 mg/ml, erfolgte eine Aufkonzentrierung in Centriprep-Zentrifugengefäßen (YM-10, Millipore). Anschließend wurde die Proteinlösung zweimal 40 Minuten gegen 500 ml Dialyse-Puffer dialysiert (Slide-A-Lyzer[®] Dialyse-kassette, 10 000 MWCO, Pierce). Die Proteinlösung wurde mit Glycerol versetzt (10 % Endkonzentration), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt. Von allen abgenommenen Proben wurden 10 µl auf einem 12%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt (siehe Abb. 2.17).

Zur rekombinanten Expression von Ran-GTP wurde 1 µl des Plasmids pGS467 (His₆-Ran) in 50 µl BL21-Zellen elektrotransformiert. Die weitere Expression und Reinigung erfolgte wie oben angegeben, dabei wurden alle Puffer mit GTP bzw. GDP (1 µM Endkonzentration) versetzt. Vor dem Ultraschall-Aufschluss wurden die Proben dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und im 37 °C-Wasserbad schnell wieder aufgetaut. Die Beladung von Ran mit den Nukleotiden erfolgte nach Bischoff & Ponstingl 1995. Zur Induktion der Austauschreaktion wurden 2 mM EDTA, zur Beladung von Ran 1 mM GTP bzw. GDP zugegeben und 40 Minuten auf Eis inkubiert. 6 mM MgCl₂ wurde vorsichtig in mehreren Schritten zugeben, um die Austauschreaktion zu stoppen. Schließlich erfolgte die Dialyse wie oben beschrieben.

SOC-Medium

2 % Bacto-Trypton
0,5 % Hefe-Extrakt
10 mM NaCl
2,5 mM KCl
10 mM MgCl₂
10 mM MgSO₄
20 mM Glukose

Lyse-Puffer

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
5 mM Imidazol
pH 8,0

Wasch-Puffer

50 mM NaH₂PO₄
300 mM NaCl
10 mM Imidazol
pH 8,0

<u>Elutions-Puffer</u>	<u>Amidoschwarz</u>	<u>Dialyse-Puffer</u>
50 mM NaH ₂ PO ₄	0,5 % Amidoschwarz	50 mM Kaliumphosphat
300 mM NaCl	50 % Methanol	10 mM KCl
250 mM Imidazol	10 % Essigsäure	1 mM MgCl ₂
pH 8,0		2 mM β-Mercaptoethanol
		pH 6,8

4.7.3 Rekombinante Expression und Reinigung GST-markierter Proteine

Die Expression und Reinigung rekombinanter Proteine erfolgte nach Maurer et al. 2001. Im Detail wurden 1 µl des entsprechenden Plasmids in 50 µl M15-Zellen (pKS488 und pGEX-6P-1: JM101-Zellen) elektrotransformiert. Nach Zugabe von 500 µl SOC-Medium wurden die Zellen 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Der gesamte Transformationsansatz wurde in 100 ml LB_{Amp+Kana}-Medium (pKS488 und pGEX-6P-1: LB_{Amp}) über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Am nächsten Morgen wurden 800 ml LB_{Amp+Kana} auf eine OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und wuchsen bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0. Ein Aliquot von 250 µl wurde abgenommen (–, vor Induktion), zentrifugiert und das Pellet in 50 µl Probenpuffer resuspendiert.

Zur Abkühlung der Lösung wurden 100 ml LB_{Amp+Kana} mit einer Temperatur von 4 °C zugegeben, zur Induktion des Promotors 150 µl IPTG (1 M) und zur Verringerung der Bildung von Einschlusskörpern 10 ml Ethanol (100 %). Die Induktion erfolgte für drei Stunden in einem 15 °C-Wasserbad. Ein Aliquot von 250 µl wurde abgenommen (+, nach Induktion), zentrifugiert und das Pellet in 50 µl Probenpuffer resuspendiert.

Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation bei 7000 rpm für 5 Minuten (4 °C) in der Sorvall GS3-Zentrifuge sedimentiert. 10 ml KT-Puffer (mit 0,5 M NaCl) wurden mit 100 µl PMSF, einer Tablette Protease-Inhibitor (complete Mini EDTA-free, Roche), 20 µl EDTA (0,5 M), 5 µl Benzamidin (1 M) und 10 µl PI-Mix versetzt und das Pellet damit resuspendiert. Der Zellausschluss erfolgte zunächst durch Zugabe von 10 mg Lysozym ("Muramidase from hen egg white", Roche) und Inkubation für eine Stunde auf Eis, dann durch Ultraschall (4x 20 Pulse à 0,7 Sekunden, Branson Sonifier 450). Nach einer Zentrifugation (Sorvall SS-34, 18 000 rpm, 4 °C, 30 Minuten) wurden 40 µl des Überstands (Ü) abgenommen und mit 60 µl Probenpuffer versetzt. Das Pellet wurde in 5 ml Wasser resuspendiert, davon 10 µl abgenommen (P) und mit 90 µl Probenpuffer versetzt.

100 µl Glutathione SepharoseTM 4B (Amersham) wurden zweimal mit 5 ml PBS-KT gewaschen. Der Überstand der Zentrifugation wurde dazufiltriert (Schleicher & Schuell MicroScience, Rotrand, 0,2 µm) und für eine Stunde bei 4 °C auf dem Rotator inkubiert. Die Matrix wurde in eine Säulenvorrichtung (Econo-Column, Bio-Rad) überführt. 10 µl des Durchflusses (Df) wurden abgenommen und mit 40 µl Probenpuffer versetzt. Die Matrix wurde einmal mit 10 ml KT-Puffer_{PMSF+PI} und zweimal mit 10 ml KM-Puffer_{PMSF+PI} für 5 Minuten auf dem Rotator gewaschen. Von den Wasch-Schritten wurden jeweils 1 ml abgenommen, die Proteine mit TCA präzipitiert und das Pellet in 40 µl Probenpuffer resuspendiert (W1-W3).

Die Elution gebundener Proteine von der GSH-Sepharose-Matrix erfolgte durch Zugabe von dreimal 100 µl Elutions-Puffer_{PMSF+PI} für jeweils 10 Minuten bei Raumtemperatur. 5 µl der Elutions-Fraktionen wurden mit 45 µl Probenpuffer versetzt (E1-E4). Die Ma-

trix wurde mit 150 μ l Elutions-Puffer vermischt, davon wurden 20 μ l abgenommen und mit 20 μ l Probenpuffer versetzt (M).

Eine erste Bestimmung des Proteingehalts der Elutions-Fractionen erfolgte durch Tüpfeln von je 1 μ l auf eine Nitrozellulose-Membran und Färben mit Amidoschwarz. Die Fraktionen mit dem höchsten Proteingehalt (gewöhnlich die ersten beiden Fraktionen) wurden vereinigt und eine Proteinbestimmung nach Lowry erfolgte mit dem Bio-Rad D_C Protein Assay. Dabei diente eine BSA-Eichreihe als Standard.

Lag der Proteingehalt unter 1 mg/ml, erfolgte eine Aufkonzentrierung in Centriprep-Zentrifugengefäßen (YM-10, Millipore). Anschließend wurde die Proteinlösung zweimal 40 Minuten gegen 900 ml Tris-HCl (50 mM, pH 8,0) dialysiert (Slide-A-Lyzer[®] Dialysekassette, 10 000 MWCO, Pierce). Die Proteinlösung wurde mit Glycerol versetzt (10 % Endkonzentration), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

Von allen abgenommenen Proben wurden 10 μ l auf einem 12%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

10x Mix

0,2 g KCl
1,2 g KH₂PO₄
1,44 g Na₂HPO₄ x 2 H₂O
ad 100 ml mit H₂O

KT-Puffer

10 ml 10x Mix
10 ml NaCl 5 M
1 ml Tween20 10 %
ad 100 ml mit H₂O
pH 7,3

KM-Puffer

10 ml 10x Mix
10 ml NaCl 5 M
400 μ l MgCl₂ 250 mM
ad 100 ml mit H₂O
pH 7,3

10x GST-Elutions-Puffer

1 g reduziertes Glutathion
in 32,5 ml 10x Rekonstitutions-Puffer lösen

10x Rekonstitutions-Puffer

500 mM Tris-HCl pH 8,0

4.7.4 *In vitro*-Bindungsanalyse

Die *in vitro*-Bindungsanalyse folgte dem Protokoll nach Maurer et al. 2001. Für jeden Ansatz wurden 20 μ l GSH-SepharoseTM 4B (Amersham) zweimal mit 500 μ l KM-Puffer gewaschen. Je 18 μ g der GST-markierten Spc72-Proteine, GST allein oder GST-NES wurden mit 64 μ l BSA (1 mg/ml) in einem Gesamtvolumen von 1 ml KM-Puffer_{PMSF+PI} eine Stunde bei 4 °C rotiert. Die Überstände wurden abgenommen, die enthaltenen Proteine mit TCA präzipitiert und in 50 μ l Probenpuffer resuspendiert. Die Matrix wurde zweimal mit 500 μ l KM-Puffer_{PMSF+PI} gewaschen.

In einem Gesamtvolumen von 500 μ l KM-Puffer_{PMSF+PI} wurden dann 12 μ g Xpo1-His₆ und 15 μ g His₆-Ran-GTP bzw. -GDP zugefügt. Von den NES-Peptiden wurden jeweils 50 μ M eingesetzt. Nach einer Stunde auf dem Rotator bei 4 °C wurden die Überstände abgenommen, die enthaltenen Proteine mit TCA präzipitiert und in 50 μ l Probenpuffer resuspendiert. Die Matrix wurde zweimal mit 500 μ l KM-Puffer_{PMSF+PI} gewaschen, mit einer Hamilton-Spritze trockengezogen und mit 50 μ l Probenpuffer versetzt. Alle Proben wurden für 10 Minuten auf 95 °C erhitzt, dann wurden jeweils 10 μ l auf einem 12 %igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie gefärbt. Für Immunoblots wurden die Proben 1 : 10 verdünnt.

<u>NES-Peptid</u>	<u>NES*-Peptid</u>
GGGNELALKLAGLDINKT-Amid	GGGNELALK <u>A</u> AG <u>A</u> DINKT-Amid
als TFA-Salz	als TFA-Salz
Biosyntan	Biosyntan
85 % HPLC-Reinheit	90 % HPLC-Reinheit
gelöst in KM-Puffer, pH 5,0	gelöst in KM-Puffer, pH 5,0

4.8 Methoden zur Charakterisierung der Spc72-Xpo1-Interaktion

4.8.1 Überexpression von Spc72 durch MET3

Die Hefestämme KSY544 und KSY545 wurden bis zur frühen logarithmischen Wachstumsphase in SD -Ura bei 25 °C inkubiert. Die Zugabe von 200 µM Methionin unterdrückte dabei die Expression von den Plasmiden pKS223 (MET3-Spc72-GFP) bzw. pKS224 (MET3-spc72-NES*-GFP). Die Zellen wurden dann in frisches, Methionin-freies Medium gewaschen und für die angegebenen Zeiten inkubiert.

Analog erfolgte die Transformation der Plasmide pKS227 (MET3-Spc72_{N-Term.}-GFP) und pKS228 (MET3-spc72-NES*_{N-Term.}-GFP) in den Stamm KSY57. Das Wachstum in Methionin-freiem Medium erfolgte für 180 Minuten.

4.8.2 Analysen mit NES-NLS-Reporter-Plasmid

Analog zur Analyse des Protein-Exports in den Xpo1-Mutanten (siehe 4.4.3) wurden das NLS-NES-Reporterplasmid (NLS-NES_{PKI}-2xGFP, pKW430) und das Plasmid pKS195 (NLS-NES_{Spc72}-2xGFP) in die Stämme KSY57 (*XPO1*) und KSY56 (*xpo1-1*) transformiert. Sie wuchsen in entsprechendem Minimalmedium bei 25 °C bis zur frühen logarithmischen Wachstumsphase. Vor und nach einer Erhöhung der Temperatur auf 37 °C für 15 Minuten wurden die GFP-Signale im Mikroskop analysiert.

In gleicher Weise wurde der Hefestamm KSY57 (*XPO1*) mit den Plasmiden pKS225 (NLS-Spc72_{C-Term.}-2xGFP) und pKS226 (NLS-spc72-NES*_{C-Term.}-2xGFP) transformiert. Das Wachstum erfolgte bei 25 °C.

4.8.4 Vergleich der Expression von Spc72-GFP und spc72-NES*-GFP

Je 10 OD Zellen der Stämme KSY588 (*SPC72*), KSY457 (*SPC72-GFP*) und KSY458 (*spc72-NES*-GFP*) wurden pelletiert und in 100 µl Lyse-Puffer_{PMSF+PI} resuspendiert. Der Aufschluss erfolgte durch Zugabe von Glaskugeln für 2 Minuten auf dem Schüttelvortex. Anschließend wurden 1 ml Lyse-Puffer_{PMSF+PI} zugegeben, gemischt und Zelltrümmer und Glaskugeln bei 800 x g für 5 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert. 900 µl des Überstands wurden in Ultrazentrifugen-Röhrchen gegeben und bei 70 000 rpm und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Die Proteine im zytosolischen Überstand wurden mit TCA gefällt und in 100 µl Probenpuffer resuspendiert. Das der Membranfraktion entsprechende Pellet wurde in 50 µl Probenpuffer resuspendiert und beide Proben bei 65 °C für 20 Minuten erwärmt. Eine 1 OD Zellen entsprechende Proteinmenge wurde auf einem 12%igen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Nach Transfer auf PVDF-Membran erfolgte

die Dekorierung mit anti-GFP-Antikörpern und als Ladekontrolle mit anti-Xpo1-Antikörpern.

Lyse-Puffer

50 mM Tris-HCl pH 7,2

150 mM NaCl

4.8.5 Quantifizierung der SPB-Signale

Hefen der Stämme KSY457 und KSY458 wuchsen bis zur frühen logarithmischen Wachstumsphase bei 25 °C. Für jeden Stamm wurden Zellen mit kleiner Tochterzelle und einem GFP-Signal am Spindelpolkörper ausgewählt und von diesen ein z-Stapel-Bild aus neun Schnitten im Abstand von 0,2 µm angefertigt. Nur Stapel, die das gesamte GFP-Signal abdeckten, wurden verwendet, mindestens jedoch 30 Stapel pro Stamm. Alle neun Schnitte eines Stapels wurden mit dem *ImageJ*-Programm (Abramoff et al. 2004) summiert. Die integrierte Dichte um den Spindelpolkörper (kreisförmige ROI, 21 Pixel Durchmesser) wurde bestimmt. Für jede Zelle wurde ein entsprechender Hintergrund-Wert bestimmt und von der Spindelpolkörper-Intensität abgezogen. Die Werte der Wildtyp-Stämme wurden willkürlich auf den Wert 100 gesetzt. Zur Fluoreszenz-Quantifizierung in den Stämmen KSY582, KSY583 und KSY584 wurden diese bei 25 °C bis zur frühen logarithmischen Wachstumsphase angezogen und dann für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Analyse erfolgte innerhalb 10 Minuten.

4.8.6 Vergleich der zytoplasmatischen Mikrotubuli

Der Spc72-Wildtyp-Stamm KSY462 und die spc72-NES*-Mutante KSY463 wurden auf die Gegenwart oder Abwesenheit von zytoplasmatischen Mikrotubuli untersucht. Zum Vergleich diente der K842-Stamm-Hintergrund (KSY451), in dem die Deletion von *SPC72* (KSY452) nicht letal ist. Jeweils 200 zufällig ausgewählte Zellen ohne Tochterzelle wurden im Mikroskop auf ihre zytoplasmatischen Mikrotubuli untersucht. Daten dreier unabhängiger Experimente wurden kombiniert.

Die Analyse der zytoplasmatischen Mikrotubuli in den *xpo1*-Allelen erfolgte anhand der Hefestämme KSY453 (*XPO1*), KSY454 (*xpo1-1*) und KSY455 (*xpo1-101*). Wie oben wurden Zellen ohne Tochterzelle zufällig ausgewählt. Die Stämme wuchsen dabei in einem 25 °C-Wasserbad bzw. wurden für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend auf einem Heiztisch in den folgenden 10 Minuten untersucht.

5. Literaturverzeichnis

- Abramoff, M.D., Magelhaes, P.J., and Ram, S.J. (2004): Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International*, **11**, 36-42
- Adachi, Y. and Yanagida, M. (1989): 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. *J Cell Biol*, **108**, 1195-207
- Adam, E. J. and Adam, S. A. (1994): Identification of cytosolic factors required for nuclear location sequence-mediated binding to the nuclear envelope. *J Cell Biol*, **125**, 547-55
- Adams, I. R. and Kilmartin, J. V. (1999): Localization of core spindle pole body (SPB) components during SPB duplication in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **145**, 809-23
- Adams, I.R. and Kilmartin, J.V. (2000): Spindle pole body duplication: a model for centrosome duplication? *Trends Cell Biol*, **10**, 329-35
- Aebi, M., Clark, M. W., Vijayraghavan, U. and Abelson, J. (1990): A yeast mutant, PRP20, altered in mRNA metabolism and maintenance of the nuclear structure, is defective in a gene homologous to the human gene RCC1 which is involved in the control of chromosome condensation. *Mol Gen Genet*, **224**, 72-80
- Amberg, D. C., Goldstein, A. L. and Cole, C. N. (1992): Isolation and characterization of RAT1: an essential gene of *Saccharomyces cerevisiae* required for the efficient nucleocytoplasmic trafficking of mRNA. *Genes Dev*, **6**, 1173-89
- Amon, A. (2002): Synchronization procedures. *Methods Enzymol*, **351**, 457-67
- Arnautov, A., Azuma, Y., Ribbeck, K., Joseph, J., Boyarchuk, Y., Karpova, T., McNally, J. and Dasso, M. (2005): Crm1 is a mitotic effector of Ran-GTP in somatic cells. *Nat Cell Biol*, **7**, 626-32
- Askjaer, P., Jensen, T. H., Nilsson, J., Englmeier, L. and Kjems, J. (1998): The specificity of the CRM1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP. *J Biol Chem*, **273**, 33414-22
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1989): *Current protocols in molecular biology*. John Wiley and Sons, Inc.
- Bamba, C., Bobinnec, Y., Fukuda, M. and Nishida, E. (2002): The GTPase Ran regulates chromosome positioning and nuclear envelope assembly in vivo. *Curr Biol*, **12**, 503-7
- Belhumeur, P., Lee, A., Tam, R., DiPaolo, T., Fortin, N. and Clark, M. W. (1993): GSP1 and GSP2, genetic suppressors of the *prp20-1* mutant in *Saccharomyces cerevisiae*: GTP-binding proteins involved in the maintenance of nuclear organization. *Mol Cell Biol*, **13**, 2152-61
- Bischoff, F. R., Klebe, C., Kretschmer, J., Wittinghofer, A. and Ponstingl, H. (1994): RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 2587-91
- Bischoff, F. R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W. and Ponstingl, H. (1995): Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran-GTP binding protein RanBP1. *Embo J*, **14**, 705-15
- Bischoff, F. R. and Ponstingl, H. (1991): Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a nuclear ras-related polypeptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10830-4

- Bogerd, H. P., Benson, R. E., Truant, R., Herold, A., Phingbodhipakkiya, M. and Cullen, B. R. (1999): Definition of a consensus transportin-specific nucleocytoplasmic transport signal. *J Biol Chem*, **274**, 9771-7
- Bogerd, H. P., Fridell, R. A., Benson, R. E., Hua, J. and Cullen, B. R. (1996): Protein sequence requirements for function of the human T-cell leukemia virus type 1 Rex nuclear export signal delineated by a novel in vivo randomization-selection assay. *Mol Cell Biol*, **16**, 4207-14
- Bornens, M. (2002): Centrosome composition and microtubule anchoring mechanisms. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 25-34
- Botstein, D., et al. (1997): The Yeast Cytoskeleton, in: "The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*", Volume 3, Cell Cycle and Cell Biology, J.R. Pringle (Ed.), Cold Spring Harbour Laboratory Press
- Budhu, A. S. and Wang, X. W. (2005): Loading and unloading: orchestrating centrosome duplication and spindle assembly by Ran/Crm1. *Cell Cycle*, **4**, 1510-4
- Bullitt, E., Rout, M. P., Kilmartin, J. V. and Akey, C. W. (1997): The yeast spindle pole body is assembled around a central crystal of Spc42p. *Cell*, **89**, 1077-86
- Byers, B. and Goetsch, L. (1974): Duplication of spindle plaques and integration of the yeast cell cycle. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **38**, 123-31
- Byers, B. and Goetsch, L. (1975): Electron microscopic observations on the meiotic karyotype of diploid and tetraploid *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **72**, 5056-60
- Byers, B. and Goetsch, L. (1975): Behavior of spindles and spindle plaques in the cell cycle and conjugation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **124**, 511-23
- Carazo-Salas, R. E., Guarguaglini, G., Gruss, O. J., Segref, A., Karsenti, E. and Mattaj, I. W. (1999): Generation of GTP-bound Ran by RCC1 is required for chromatin-induced mitotic spindle formation. *Nature*, **400**, 178-81
- Castillo, A. R., Meehl, J. B., Morgan, G., Schutz-Geschwender, A. and Winey, M. (2002): The yeast protein kinase Mps1p is required for assembly of the integral spindle pole body component Spc42p. *J Cell Biol*, **156**, 453-65
- Chen, X. P., Yin, H. and Huffaker, T. C. (1998): The yeast spindle pole body component Spc72p interacts with Stu2p and is required for proper microtubule assembly. *J Cell Biol*, **141**, 1169-79
- Chi, N. C., Adam, E. J., Visser, G. D. and Adam, S. A. (1996): RanBP1 stabilizes the interaction of Ran with p97 nuclear protein import. *J Cell Biol*, **135**, 559-69
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K. and Muller, C. W. (1999): Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature*, **399**, 221-9
- Conti, E. and Kuriyan, J. (2000): Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. *Structure*, **8**, 329-38
- Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G. and Kuriyan, J. (1998): Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell*, **94**, 193-204
- Conti, E., Uy, M., Leighton, L., Blobel, G. and Kuriyan, J. (1998): Crystallographic analysis of the recognition of a nuclear localization signal by the nuclear import factor karyopherin alpha. *Cell*, **94**, 193-204

- Corbett, A. H. and Silver, P. A. (1996): The NTF2 gene encodes an essential, highly conserved protein that functions in nuclear transport in vivo. *J Biol Chem*, **271**, 18477-84
- Cronshaw, J. M., Krutchinsky, A. N., Zhang, W., Chait, B. T. and Matunis, M. J. (2002): Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J Cell Biol*, **158**, 915-27
- Dasso, M. (2002): The Ran GTPase: Theme and Variations. *Curr Biol*, **12**, R502
- Dasso, M., Nishitani, H., Kornbluth, S., Nishimoto, T. and Newport, J. W. (1992): RCC1, a regulator of mitosis, is essential for DNA replication. *Mol Cell Biol*, **12**, 3337-45
- Di Fiore, B., Ciciarello, M., Mangiacasale, R., Palena, A., Tassin, A. M., Cundari, E. and Lavia, P. (2003): Mammalian RanBP1 regulates centrosome cohesion during mitosis. *J Cell Sci*, **116**, 3399-411
- Dingwall, C. and Laskey, R. A. (1991): Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci*, **16**, 478-81
- Donaldson, A. D. and Kilmartin, J. V. (1996): Spc42p: a phosphorylated component of the *S. cerevisiae* spindle pole body (SPB) with an essential function during SPB duplication. *J Cell Biol*, **132**, 887-901
- Dworetzky, S. I. and Feldherr, C. M. (1988): Translocation of RNA-coated gold particles through the nuclear pores of oocytes. *J Cell Biol*, **106**, 575-84
- Elliott, S., Knop, M., Schlenstedt, G. and Schiebel, E. (1999): Spc29p is a component of the Spc110p subcomplex and is essential for spindle pole body duplication. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6205-10
- Enenkel, C., Blobel, G. and Rexach, M. (1995): Identification of a yeast karyopherin heterodimer that targets import substrate to mammalian nuclear pore complexes. *J Biol Chem*, **270**, 16499-502
- Englmeier, L., Fornerod, M., Bischoff, F. R., Petosa, C., Mattaj, I. W. and Kutay, U. (2001): RanBP3 influences interactions between CRM1 and its nuclear protein export substrates. *EMBO Rep*, **2**, 926-32
- Entian, K. D., Schuster, T., Hegemann, J. H., Becher, D., Feldmann, H., Guldener, U., Gotz, R., Hansen, M., Hollenberg, C. P., Jansen, G., Kramer, W., Klein, S., Kotter, P., Kricke, J., Launhardt, H., Mannhaupt, G., Maierl, A., Meyer, P., Mewes, W., Munder, T., Niedenthal, R. K., Ramezani Rad, M., Rohmer, A., Romer, A., Hinnen, A. and et al. (1999): Functional analysis of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. *Mol Gen Genet*, **262**, 683-702
- Eyers, P. A., Erikson, E., Chen, L. G. and Maller, J. L. (2003): A novel mechanism for activation of the protein kinase Aurora A. *Curr Biol*, **13**, 691-7
- Fabre, E. and Hurt, E. (1997): Yeast genetics to dissect the nuclear pore complex and nucleocytoplasmic trafficking. *Annu Rev Genet*, **31**, 277-313
- Feldherr, C. M. (1962): The nuclear annuli as pathways for nucleocytoplasmic exchanges. *J Cell Biol*, **14**, 65-72
- Feng, W., Benko, A. L., Lee, J. H., Stanford, D. R. and Hopper, A. K. (1999): Antagonistic effects of NES and NLS motifs determine *S. cerevisiae* Rna1p subcellular distribution. *J Cell Sci*, **112** (Pt 3), 339-47

- Ferrigno, P., Posas, F., Koepp, D., Saito, H. and Silver, P. (1998): Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin beta homologs NMD5 and XPO1. *Embo J.*, **17**, 5606-14
- Fischer, U., Huber, J., Boelens, W. C., Mattaj, I. W. and Luhrmann, R. (1995): The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*, **82**, 475-83
- Fleig, U., Salus, S. S., Karig, I. and Sazer, S. (2000): The fission yeast ran GTPase is required for microtubule integrity. *J Cell Biol*, **151**, 1101-12
- Floer, M. and Blobel, G. (1999): Putative reaction intermediates in Crm1-mediated nuclear protein export. *J Biol Chem*, **274**, 16279-86
- Fontes, M. R., Teh, T., Jans, D., Brinkworth, R. I. and Kobe, B. (2003): Structural basis for the specificity of bipartite nuclear localization sequence binding by importin-alpha. *J Biol Chem*, **278**, 27981-7
- Forgues, M., Difilippantonio, M. J., Linke, S. P., Ried, T., Nagashima, K., Feden, J., Valerie, K., Fukasawa, K. and Wang, X. W. (2003): Involvement of Crm1 in hepatitis B virus X protein-induced aberrant centriole replication and abnormal mitotic spindles. *Mol Cell Biol*, **23**, 5282-92
- Forgues, M., Marrogi, A. J., Spillare, E. A., Wu, C. G., Yang, Q., Yoshida, M. and Wang, X. W. (2001): Interaction of the hepatitis B virus X protein with the Crm1-dependent nuclear export pathway. *J Biol Chem*, **276**, 22797-803
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. and Mattaj, I. W. (1997): CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*, **90**, 1051-60
- Francis, S. E. and Davis, T. N. (2000): The spindle pole body of *Saccharomyces cerevisiae*: architecture and assembly of the core components. *Curr Top Dev Biol*, **49**, 105-32
- Freedman, D. A. and Levine, A. J. (1998): Nuclear export is required for degradation of endogenous p53 by MDM2 and human papillomavirus E6. *Mol Cell Biol*, **18**, 7288-93
- Frey, S., Richter, R. P. and Gorlich, D. (2006): FG-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties. *Science*, **314**, 815-7
- Friedman, D. B., Kern, J. W., Huneycutt, B. J., Vinh, D. B., Crawford, D. K., Steiner, E., Scheiltz, D., Yates, J., 3rd, Resing, K. A., Ahn, N. G., Winey, M. and Davis, T. N. (2001): Yeast Mps1p phosphorylates the spindle pole component Spc110p in the N-terminal domain. *J Biol Chem*, **276**, 17958-67
- Friedman, D. B., Sundberg, H. A., Huang, E. Y. and Davis, T. N. (1996): The 110-kD spindle pole body component of *Saccharomyces cerevisiae* is a phosphoprotein that is modified in a cell cycle-dependent manner. *J Cell Biol*, **132**, 903-14
- Friedrich, B., Quensel, C., Sommer, T., Hartmann, E. and Kohler, M. (2006): Nuclear localization signal and protein context both mediate importin alpha specificity of nuclear import substrates. *Mol Cell Biol*, **26**, 8697-709
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M. and Nishida, E. (1997): CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature*, **390**, 308-11
- Gaglio, T., Saredi, A. and Compton, D. A. (1995): NuMA is required for the organization of microtubules into aster-like mitotic arrays. *J Cell Biol*, **131**, 693-708

- Gallouzi, I. E. and Steitz, J. A. (2001): Delineation of mRNA export pathways by the use of cell-permeable peptides. *Science*, **294**, 1895-901
- Geissler, S., Pereira, G., Spang, A., Knop, M., Soues, S., Kilmartin, J. and Schiebel, E. (1996): The spindle pole body component Spc98p interacts with the gamma-tubulin-like Tub4p of *Saccharomyces cerevisiae* at the sites of microtubule attachment. *Embo J*, **15**, 3899-911
- Gilchrist, D., Mykytka, B. and Rexach, M. (2002): Accelerating the rate of disassembly of karyopherin.cargo complexes. *J Biol Chem*, **277**, 18161-72
- Gorlich, D., Kraft, R., Kostka, S., Vogel, F., Hartmann, E., Laskey, R. A., Mattaj, I. W. and Izaurraide, E. (1996): Importin provides a link between nuclear protein import and U snRNA export. *Cell*, **87**, 21-32
- Gorlich, D. and Kutay, U. (1999): Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 607-60
- Gorlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aebi, U. and Bischoff, F. R. (1996): Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *Embo J*, **15**, 5584-94
- Gorlich, D., Prehn, S., Laskey, R. A. and Hartmann, E. (1994): Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell*, **79**, 767-78
- Gorlich, D., Vogel, F., Mills, A. D., Hartmann, E. and Laskey, R. A. (1995): Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature*, **377**, 246-8
- Gruneberg, U., Campbell, K., Simpson, C., Grindlay, J. and Schiebel, E. (2000): Nud1p links astral microtubule organization and the control of exit from mitosis. *Embo J*, **19**, 6475-88
- Gruss, O. J., Carazo-Salas, R. E., Schatz, C. A., Guarguaglini, G., Kast, J., Wilm, M., Le Bot, N., Vernos, I., Karsenti, E. and Mattaj, I. W. (2001): Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity. *Cell*, **104**, 83-93
- Gruss, O. J. and Vernos, I. (2004): The mechanism of spindle assembly: functions of Ran and its target TPX2. *J Cell Biol*, **166**, 949-55
- Gruss, O. J., Wittmann, M., Yokoyama, H., Pepperkok, R., Kufer, T., Sillje, H., Karsenti, E., Mattaj, I. W. and Vernos, I. (2002): Chromosome-induced microtubule assembly mediated by TPX2 is required for spindle formation in HeLa cells. *Nat Cell Biol*, **4**, 871-9
- Guthrie, C., and Fink, G.R. (1991): Guide to yeast genetics and molecular biology. Methods in Enzymology, Academic Press, Inc., Vol. **194**
- Hamamoto, T., Uozumi, T. and Beppu, T. (1985): Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. III. Mode of action of leptomycin B on *Schizosaccharomyces pombe*. *J Antibiot (Tokyo)*, **38**, 1573-80
- Henderson, B. R. and Eleftheriou, A. (2000): A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals. *Exp Cell Res*, **256**, 213-24
- Hieda, M., Tachibana, T., Yokoya, F., Kose, S., Imamoto, N. and Yoneda, Y. (1999): A monoclonal antibody to the COOH-terminal acidic portion of Ran inhibits both the recycling of Ran and nuclear protein import in living cells. *J Cell Biol*, **144**, 645-55
- Hood, J. K. and Silver, P. A. (1998): Cse1p is required for export of Srp1p/importin-alpha from the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **273**, 35142-6.

- Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S. and O'Shea, E. K. (2003): Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, **425**, 686-91
- Iovine, M. K., Watkins, J. L. and Wentz, S. R. (1995): The GLFG repetitive region of the nucleoporin Nup116p interacts with Kap95p, an essential yeast nuclear import factor. *J Cell Biol*, **131**, 1699-713
- Ito, T., Chiba, T., Ozawa, R., Yoshida, M., Hattori, M. and Sakaki, Y. (2001): A comprehensive two-hybrid analysis to explore the yeast protein interactome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4569-74
- Izaurralde, E., Kann, M., Pante, N., Sodeik, B. and Hohn, T. (1999): Viruses, microorganisms and scientists meet the nuclear pore. Leysin, VD, Switzerland, February 26-March 1, 1998. *Embo J*, **18**, 289-96
- Izaurralde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I. W. and Gorlich, D. (1997): The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *Embo J*, **16**, 6535-47
- Jakel, S. and Gorlich, D. (1998): Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *Embo J*, **17**, 4491-502
- James, P., Halladay, J. and Craig, E. A. (1996): Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics*, **144**, 1425-36
- Jaspersen, S. L. and Winey, M. (2004): THE BUDDING YEAST SPINDLE POLE BODY: Structure, Duplication, and Function. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **20**, 1-28
- Jensen, T. H., Neville, M., Rain, J. C., McCarthy, T., Legrain, P. and Rosbash, M. (2000): Identification of novel *Saccharomyces cerevisiae* proteins with nuclear export activity: cell cycle-regulated transcription factor ace2p shows cell cycle-independent nucleocytoplasmic shuttling. *Mol Cell Biol*, **20**, 8047-58
- Joseph, J., Tan, S. H., Karpova, T. S., McNally, J. G. and Dasso, M. (2002): SUMO-1 targets RanGAP1 to kinetochores and mitotic spindles. *J Cell Biol*, **156**, 595-602
- Kadowaki, T., Chen, S., Hitomi, M., Jacobs, E., Kumagai, C., Liang, S., Schneiter, R., Singleton, D., Wisniewska, J. and Tartakoff, A. M. (1994): Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mRNA transport-defective (mtr) mutants. *J Cell Biol*, **126**, 649-59
- Kaffman, A. and O'Shea, E. K. (1999): Regulation of nuclear localization: a key to a door. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 291-339
- Kalab, P., Pu, R. T. and Dasso, M. (1999): The ran GTPase regulates mitotic spindle assembly. *Curr Biol*, **9**, 481-4
- Kalab, P., Weis, K. and Heald, R. (2002): Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts. *Science*, **295**, 2452-6
- Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F. and Smith, A. E. (1984): Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature*, **311**, 33-8
- Keryer, G., Di Fiore, B., Celati, C., Lechtreck, K. F., Mogensen, M., Delouvee, A., Lavia, P., Bornens, M. and Tassin, A. M. (2003): Part of Ran is associated with AKAP450 at the centrosome: involvement in microtubule-organizing activity. *Mol Biol Cell*, **14**, 4260-71
- Kilmartin, J. V., Dyos, S. L., Kershaw, D. and Finch, J. T. (1993): A spacer protein in the *Saccharomyces cerevisiae* spindle poly body whose transcript is cell cycle-regulated. *J Cell Biol*, **123**, 1175-84

- Kilmartin, J. V. and Goh, P. Y. (1996): Spc110p: assembly properties and role in the connection of nuclear microtubules to the yeast spindle pole body. *Embo J*, **15**, 4592-602
- Kimura, T., Hashimoto, I., Nagase, T. and Fujisawa, J. (2004): CRM1-dependent, but not ARE-mediated, nuclear export of IFN-alpha 1 mRNA. *J Cell Sci*, **117**, 2259-70
- Kirkpatrick, D. and Solomon, F. (1994): Overexpression of yeast homologs of the mammalian checkpoint gene RCC1 suppresses the class of alpha-tubulin mutations that arrest with excess microtubules. *Genetics*, **137**, 381-92
- Klebe, C., Prinz, H., Wittinghofer, A. and Goody, R. S. (1995): The kinetic mechanism of Ran--nucleotide exchange catalyzed by RCC1. *Biochemistry*, **34**, 12543-52
- Knop, M. and Schiebel, E. (1997): Spc98p and Spc97p of the yeast gamma-tubulin complex mediate binding to the spindle pole body via their interaction with Spc110p. *Embo J*, **16**, 6985-95
- Knop, M. and Schiebel, E. (1998): Receptors determine the cellular localization of a gamma-tubulin complex and thereby the site of microtubule formation. *Embo J*, **17**, 3952-67
- Kohler, A. and Hurt, E. (2007): Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 761-73
- Kohler, M., Speck, C., Christiansen, M., Bischoff, F. R., Prehn, S., Haller, H., Gorlich, D. and Hartmann, E. (1999): Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import. *Mol Cell Biol*, **19**, 7782-91
- Kudo, N., Matsumori, N., Taoka, H., Fujiwara, D., Schreiner, E. P., Wolff, B., Yoshida, M. and Horinouchi, S. (1999): Leptomycin B inactivates CRM1/exportin 1 by covalent modification at a cysteine residue in the central conserved region. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 9112-7
- Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E. P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S. and Yoshida, M. (1998): Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res*, **242**, 540-7
- Kuge, S., Jones, N. and Nomoto, A. (1997): Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *Embo J*, **16**, 1710-20
- Kuge, S., Toda, T., Iizuka, N. and Nomoto, A. (1998): Crm1 (Xpo1) dependent nuclear export of the budding yeast transcription factor yAP-1 is sensitive to oxidative stress. *Genes Cells*, **3**, 521-32
- Kunzler, M., Gerstberger, T., Stutz, F., Bischoff, F. R. and Hurt, E. (2000): Yeast Ran-binding protein 1 (Yrb1) shuttles between the nucleus and cytoplasm and is exported from the nucleus via a CRM1 (XPO1)-dependent pathway. *Mol Cell Biol*, **20**, 4295-308
- Kunzler, M. and Hurt, E. C. (1998): Cse1p functions as the nuclear export receptor for importin alpha in yeast. *FEBS Lett*, **433**, 185-90
- Kutay, U. and Guttinger, S. (2005): Leucine-rich nuclear-export signals: born to be weak. *Trends Cell Biol*, **15**, 121-4
- Kutay, U., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Mattaj, I. W. and Gorlich, D. (1997): Dominant-negative mutants of importin-beta block multiple pathways of import and export through the nuclear pore complex. *Embo J*, **16**, 1153-63.
- Lei, E. P. and Silver, P. A. (2002): Protein and RNA export from the nucleus. *Dev Cell*, **2**, 261-72

- Lei, E. P., Stern, C. A., Fahrenkrog, B., Krebber, H., Moy, T. I., Aebi, U. and Silver, P. A. (2003): Sac3 is an mRNA export factor that localizes to cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex. *Mol Biol Cell*, **14**, 836-47
- Lindsay, M. E., Holaska, J. M., Welch, K., Paschal, B. M. and Macara, I. G. (2001): Ran-binding protein 3 is a cofactor for Crm1-mediated nuclear protein export. *J Cell Biol*, **153**, 1391-402
- Lingle, W. L. and Salisbury, J. L. (2000): The role of the centrosome in the development of malignant tumors. *Curr Top Dev Biol*, **49**, 313-29
- Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, J. R. (1998): Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **14**, 953-61
- Malim, M. H., Bohnlein, S., Hauber, J. and Cullen, B. R. (1989): Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator--derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. *Cell*, **58**, 205-14
- Malim, M. H., McCarn, D. F., Tiley, L. S. and Cullen, B. R. (1991): Mutational definition of the human immunodeficiency virus type 1 Rev activation domain. *J Virol*, **65**, 4248-54
- Marschall, L. G., Jeng, R. L., Mulholland, J. and Stearns, T. (1996): Analysis of Tub4p, a yeast gamma-tubulin-like protein: implications for microtubule-organizing center function. *J Cell Biol*, **134**, 443-54
- Mattaj, I. W. and Englmeier, L. (1998): Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem*, **67**, 265-306
- Maurer, P., Redd, M., Solsbacher, J., Bischoff, F. R., Greiner, M., Podtelejnikov, A. V., Mann, M., Stade, K., Weis, K. and Schlenstedt, G. (2001): The nuclear export receptor xpo1p forms distinct complexes with nes transport substrates and the yeast ran binding protein 1 (yrb1p). *Mol Biol Cell*, **12**, 539-49
- Melchior, F., Paschal, B., Evans, J. and Gerace, L. (1993): Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J Cell Biol*, **123**, 1649-59
- Merdes, A., Ramyar, K., Vechio, J. D. and Cleveland, D. W. (1996): A complex of NuMA and cytoplasmic dynein is essential for mitotic spindle assembly. *Cell*, **87**, 447-58
- Moore, J. D. (2001): The Ran-GTPase and cell-cycle control. *Bioessays*, **23**, 77-85
- Moore, M. S. and Blobel, G. (1993): The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature*, **365**, 661-3
- Mosammaparast, N. and Pemberton, L. F. (2004): Karyopherins: from nuclear-transport mediators to nuclear-function regulators. *Trends Cell Biol*, **14**, 547-56
- Mueller, L., Cordes, V. C., Bischoff, F. R. and Ponstingl, H. (1998): Human RanBP3, a group of nuclear RanGTP binding proteins. *FEBS Lett*, **427**, 330-6
- Murphy, M. W., Olson, B. L. and Siliciano, P. G. (2004): The yeast splicing factor Prp40p contains functional leucine-rich nuclear export signals that are essential for splicing. *Genetics*, **166**, 53-65
- Nachury, M. V., Maresca, T. J., Salmon, W. C., Waterman-Storer, C. M., Heald, R. and Weis, K. (2001): Importin beta is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly. *Cell*, **104**, 95-106

- Nemergut, M. E., Mizzen, C. A., Stukenberg, T., Allis, C. D. and Macara, I. G. (2001): Chromatin docking and exchange activity enhancement of RCC1 by histones H2A and H2B. *Science*, **292**, 1540-3
- Neville, M. and Rosbash, M. (1999): The NES-Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, **18**, 3746-56
- Neville, M., Stutz, F., Lee, L., Davis, L. I. and Rosbash, M. (1997): The importin-beta family member Crm1p bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export. *Curr Biol*, **7**, 767-75
- Newmeyer, D. D. (1993): The nuclear pore complex and nucleocytoplasmic transport. *Curr Opin Cell Biol*, **5**, 395-407
- Nguyen, T., Vinh, D. B., Crawford, D. K. and Davis, T. N. (1998): A genetic analysis of interactions with Spc110p reveals distinct functions of Spc97p and Spc98p, components of the yeast gamma-tubulin complex. *Mol Biol Cell*, **9**, 2201-16
- Nishi, K., Yoshida, M., Fujiwara, D., Nishikawa, M., Horinouchi, S. and Beppu, T. (1994): Leptomycin B targets a regulatory cascade of crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression. *J Biol Chem*, **269**, 6320-4
- Noguchi, E., Hayashi, N., Nakashima, N. and Nishimoto, T. (1997): Yrb2p, a Nup2p-related yeast protein, has a functional overlap with Rna1p, a yeast Ran-GTPase-activating protein. *Mol Cell Biol*, **17**, 2235-46
- Noguchi, E., Saitoh, Y., Sazer, S. and Nishimoto, T. (1999): Disruption of the YRB2 gene retards nuclear protein export, causing a profound mitotic delay, and can be rescued by overexpression of XPO1/CRM1. *J Biochem (Tokyo)*, **125**, 574-85
- Ohba, T., Nakamura, M., Nishitani, H. and Nishimoto, T. (1999): Self-organization of microtubule asters induced in *Xenopus* egg extracts by GTP-bound Ran. *Science*, **284**, 1356-8
- Ohtsubo, M., Okazaki, H. and Nishimoto, T. (1989): The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds to DNA. *J Cell Biol*, **109**, 1389-97
- Okuda, M. (2002): The role of nucleophosmin in centrosome duplication. *Oncogene*, **21**, 6170-4
- Ossareh-Nazari, B., Bachelier, F. and Dargemont, C. (1997): Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science*, **278**, 141-4
- Ossareh-Nazari, B. and Dargemont, C. (1999): Domains of Crm1 involved in the formation of the Crm1, RanGTP, and leucine-rich nuclear export sequences trimeric complex. *Exp Cell Res*, **252**, 236-41
- Ouspenski, II (1998): A RanBP1 mutation which does not visibly affect nuclear import may reveal additional functions of the ran GTPase system. *Exp Cell Res*, **244**, 171-83
- Ouspenski, II, Mueller, U. W., Matynia, A., Sazer, S., Elledge, S. J. and Brinkley, B. R. (1995): Ran-binding protein-1 is an essential component of the Ran/RCC1 molecular switch system in budding yeast. *J Biol Chem*, **270**, 1975-8
- Paine, P. L., Moore, L. C. and Horowitz, S. B. (1975): Nuclear envelope permeability. *Nature*, **254**, 109-14
- Paraskeva, E., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Huber, J., Kutay, U., Hartmann, E., Luhrmann, R. and Gorlich, D. (1999): CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *J Cell Biol*, **145**, 255-64

- Pereira, G., Grueneberg, U., Knop, M. and Schiebel, E. (1999): Interaction of the yeast gamma-tubulin complex-binding protein Spc72p with Kar1p is essential for microtubule function during karyogamy. *Embo J*, **18**, 4180-95
- Pereira, G., Knop, M. and Schiebel, E. (1998): Spc98p directs the yeast gamma-tubulin complex into the nucleus and is subject to cell cycle-dependent phosphorylation on the nuclear side of the spindle pole body. *Mol Biol Cell*, **9**, 775-93
- Petosa, C., Schoehn, G., Askjaer, P., Bauer, U., Moulin, M., Steuerwald, U., Soler-Lopez, M., Baudin, F., Mattaj, I. W. and Muller, C. W. (2004): Architecture of CRM1/Exportin1 suggests how cooperativity is achieved during formation of a nuclear export complex. *Mol Cell*, **16**, 761-75
- Rexach, M., and Blobel, G. (1995): Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell*, **83**, 683-92
- Ribbeck, K. and Gorlich, D. (2001): Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *Embo J*, **20**, 1320-30
- Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H. M., Stewart, M. and Gorlich, D. (1998): NTF2 mediates nuclear import of Ran. *Embo J*, **17**, 6587-98
- Richards, S. A., Carey, K. L. and Macara, I. G. (1997): Requirement of guanosine triphosphate-bound ran for signal-mediated nuclear protein export. *Science*, **276**, 1842-4
- Richards, S. A., Lounsbury, K. M., Carey, K. L. and Macara, I. G. (1996): A nuclear export signal is essential for the cytosolic localization of the Ran binding protein, RanBP1. *J Cell Biol*, **134**, 1157-68
- Richards, S. A., Lounsbury, K. M. and Macara, I. G. (1995): The C terminus of the nuclear RAN/TC4 GTPase stabilizes the GDP-bound state and mediates interactions with RCC1, RAN-GAP, and HTF9A/RANBP1. *J Biol Chem*, **270**, 14405-11
- Richardson, W. D., Mills, A. D., Dilworth, S. M., Laskey, R. A. and Dingwall, C. (1988): Nuclear protein migration involves two steps: rapid binding at the nuclear envelope followed by slower translocation through nuclear pores. *Cell*, **52**, 655-64
- Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A. and Dingwall, C. (1991): Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell*, **64**, 615-23
- Rodriguez, M. S., Dargemont, C. and Stutz, F. (2004): Nuclear export of RNA. *Biol Cell*, **96**, 639-55
- Rout, M. P. and Aitchison, J. D. (2001): The nuclear pore complex as a transport machine. *J Biol Chem*, **276**, 16593-6
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. and Chait, B. T. (2000): The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol*, **148**, 635-51
- Ryan, K. J., McCaffery, J. M. and Wenthe, S. R. (2003): The Ran GTPase cycle is required for yeast nuclear pore complex assembly. *J Cell Biol*, **160**, 1041-53
- Sazer, S. and Dasso, M. (2000): The ran decathlon: multiple roles of Ran. *J Cell Sci*, **113**, 1111-8
- Schlenstedt, G., Saavedra, C., Loeb, J. D., Cole, C. N. and Silver, P. A. (1995): The GTP-bound form of the yeast Ran/TC4 homologue blocks nuclear protein import and appearance of poly(A)⁺ RNA in the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **92**, 225-9

- Schlenstedt, G., Wong, D. H., Koepp, D. M. and Silver, P. A. (1995): Mutants in a yeast Ran binding protein are defective in nuclear transport. *Embo J*, **14**, 5367-78
- Segref, A., Sharma, K., Doye, V., Hellwig, A., Huber, J., Luhrmann, R. and Hurt, E. (1997): Mex67p, a novel factor for nuclear mRNA export, binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores. *Embo J*, **16**, 3256-71
- Seiser, R. M., Sundberg, A. E., Wollam, B. J., Zobel-Thropp, P., Baldwin, K., Spector, M. D. and Lycan, D. E. (2006): Ltv1 is required for efficient nuclear export of the ribosomal small subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **174**, 679-91
- Seufert, W., McGrath, J. P. and Jentsch, S. (1990): UBC1 encodes a novel member of an essential subfamily of yeast ubiquitin-conjugating enzymes involved in protein degradation. *Embo J*, **9**, 4535-41
- Sherman, F. (1991): Getting started with yeast. p. 3-20, in: C.G.C. Fink (ed.), *Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, vol. **194**
- Shinmura, K., Tarapore, P., Tokuyama, Y., George, K. R. and Fukasawa, K. (2005): Characterization of centrosomal association of nucleophosmin/B23 linked to Crm1 activity. *FEBS Lett*, **579**, 6621-34
- Shulga, N., James, P., Craig, E. A. and Goldfarb, D. S. (1999): A nuclear export signal prevents *Saccharomyces cerevisiae* Hsp70 Ssb1p from stimulating nuclear localization signal-directed nuclear transport. *J Biol Chem*, **274**, 16501-7
- Sobel, S. G. and Snyder, M. (1995): A highly divergent gamma-tubulin gene is essential for cell growth and proper microtubule organization in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, **131**, 1775-88
- Solsbacher, J., Maurer, P., Bischoff, F. R. and Schlenstedt, G. (1998): Cse1p is involved in export of yeast importin alpha from the nucleus. *Mol Cell Biol*, **18**, 6805-15
- Song, J., Hirschman, J., Gunn, K., and Dohlman, H.G. (1996): Regulation of membrane and subunit interactions by N-myristoylation of a G protein alpha subunit in yeast. *J Biol Chem*, **271**, 20273-83
- Soues, S. and Adams, I. R. (1998): SPC72: a spindle pole component required for spindle orientation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*, **111**, 2809-18
- Spang, A., Geissler, S., Grein, K. and Schiebel, E. (1996): gamma-Tubulin-like Tub4p of *Saccharomyces cerevisiae* is associated with the spindle pole body substructures that organize microtubules and is required for mitotic spindle formation. *J Cell Biol*, **134**, 429-41
- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C. and Weis, K. (1997): Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell*, **90**, 1041-50
- Stade, K., Vogel, F., Schwienhorst, I., Meusser, B., Volkwein, C., Nentwig, B., Dohmen, R. J. and Sommer, T. (2002): A lack of SUMO conjugation affects cNLS-dependent nuclear protein import in yeast. *J Biol Chem*, **277**, 49554-61
- Stoffler, D., Fahrenkrog, B. and Aebi, U. (1999): The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr Opin Cell Biol*, **11**, 391-401
- Stutz, F., Neville, M. and Rosbash, M. (1995): Identification of a novel nuclear pore-associated protein as a functional target of the HIV-1 Rev protein in yeast. *Cell*, **82**, 495-506
- Taura, T., Krebber, H. and Silver, P. A. (1998): A member of the Ran-binding protein family, Yrb2p, is involved in nuclear protein export. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 7427-32

- Truant, R. and Cullen, B. R. (1999): The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol Cell Biol*, **19**, 1210-7
- Tsai, M. Y., Wiese, C., Cao, K., Martin, O., Donovan, P., Ruderman, J., Prigent, C. and Zheng, Y. (2003): A Ran signalling pathway mediated by the mitotic kinase Aurora A in spindle assembly. *Nat Cell Biol*, **5**, 242-8
- Uetz, P., Giot, L., Cagney, G., Mansfield, T. A., Judson, R. S., Knight, J. R., Lockshon, D., Narayan, V., Srinivasan, M., Pochart, P., Qureshi-Emili, A., Li, Y., Godwin, B., Conover, D., Kalbfleisch, T., Vijayadamodar, G., Yang, M., Johnston, M., Fields, S. and Rothberg, J. M. (2000): A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **403**, 623-7
- Usui, T., Maekawa, H., Pereira, G. and Schiebel, E. (2003): The XMAP215 homologue Stu2 at yeast spindle pole bodies regulates microtubule dynamics and anchorage. *Embo J*, **22**, 4779-93
- Vasu, S. K. and Forbes, D. J. (2001): Nuclear pores and nuclear assembly. *Curr Opin Cell Biol*, **13**, 363-75
- Vetter, I. R., Arndt, A., Kutay, U., Gorlich, D. and Wittinghofer, A. (1999): Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution. *Cell*, **97**, 635-46
- Vinh, D. B., Kern, J. W., Hancock, W. O., Howard, J. and Davis, T. N. (2002): Reconstitution and characterization of budding yeast gamma-tubulin complex. *Mol Biol Cell*, **13**, 1144-57
- Vogel, J., Drapkin, B., Oomen, J., Beach, D., Bloom, K. and Snyder, M. (2001): Phosphorylation of gamma-tubulin regulates microtubule organization in budding yeast. *Dev Cell*, **1**, 621-31
- Wang, W., Budhu, A., Forgues, M. and Wang, X. W. (2005): Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat Cell Biol*, **7**, 823-30
- Watanabe, M., Fukuda, M., Yoshida, M., Yanagida, M. and Nishida, E. (1999): Involvement of CRM1, a nuclear export receptor, in mRNA export in mammalian cells and fission yeast. *Genes Cells*, **4**, 291-7
- Weis, K. (2003): Regulating access to the genome: nucleocytoplasmic transport throughout the cell cycle. *Cell*, **112**, 441-51
- Weis, K. (2007): The nuclear pore complex: oily spaghetti or gummy bear? *Cell*, **130**, 405-7
- Weis, K., Dingwall, C. and Lamond, A. I. (1996): Characterization of the nuclear protein import mechanism using Ran mutants with altered nucleotide binding specificities. *Embo J*, **15**, 7120-8
- Wen, W., Meinkoth, J. L., Tsien, R. Y. and Taylor, S. S. (1995): Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell*, **82**, 463-73
- Wente, S. R., Rout, M. P. and Blobel, G. (1992): A new family of yeast nuclear pore complex proteins. *J Cell Biol*, **119**, 705-23
- Wiese, C., Wilde, A., Moore, M. S., Adam, S. A., Merdes, A. and Zheng, Y. (2001): Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly. *Science*, **291**, 653-6
- Wigge, P. A., Jensen, O. N., Holmes, S., Soues, S., Mann, M. and Kilmartin, J. V. (1998): Analysis of the *Saccharomyces* spindle pole by matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry. *J Cell Biol*, **141**, 967-77
- Wilde, A. and Zheng, Y. (1999): Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the

- small GTPase Ran. *Science*, **284**, 1359-62
- Wimmer, C., Doye, V., Grandi, P., Nehrbass, U. and Hurt, E. C. (1992): A new subclass of nucleoporins that functionally interact with nuclear pore protein NSP1. *Embo J*, **11**, 5051-61
- Winey, M. and O'Toole, E. T. (2001): The spindle cycle in budding yeast. *Nat Cell Biol*, **3**, E23-7
- Wittmann, T., Wilm, M., Karsenti, E. and Vernos, I. (2000): TPX2, A novel xenopus MAP involved in spindle pole organization. *J Cell Biol*, **149**, 1405-18
- Wolff, B., Sanglier, J. J. and Wang, Y. (1997): Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem Biol*, **4**, 139-47
- Yan, C., Lee, L. H. and Davis, L. I. (1998): Crm1p mediates regulated nuclear export of a yeast AP-1-like transcription factor. *Embo J*, **17**, 7416-29
- Yang, S., Cope, M. J. and Drubin, D. G. (1999): Sla2p is associated with the yeast cortical actin cytoskeleton via redundant localization signals. *Mol Biol Cell*, **10**, 2265-83
- Yoder, T. J., Pearson, C. G., Bloom, K. and Davis, T. N. (2003): The *Saccharomyces cerevisiae* spindle pole body is a dynamic structure. *Mol Biol Cell*, **14**, 3494-505
- Yow, G. Y., Uo, T., Yoshimura, T. and Esaki, N. (2004): D-amino acid N-acetyltransferase of *Saccharomyces cerevisiae*: a close homologue of histone acetyltransferase Hpa2p acting exclusively on free D-amino acids. *Arch Microbiol*, **182**, 396-403
- Zhang, C., Hughes, M. and Clarke, P. R. (1999): Ran-GTP stabilises microtubule asters and inhibits nuclear assembly in *Xenopus* egg extracts. *J Cell Sci*, **112**, 2453-61

6. Anhang

6.1 Abkürzungen

5'-FOA	<i>5'-fluorotic acid</i> , 5'-Fluororotsäure
AS	Aminosäure(n)
APA	<i>aster promoting activies</i> , Asteren-fördernde Faktoren
bp	Basenpaare
bZIP	<i>basic leucine zipper domain</i> , basische Leucin-Reißverschluss-Domäne
CCR	<i>central conserved region</i> , zentrale konservierte Region
COPI	<i>coat protein complex I</i> , Coat-Protein Komplex I
CRIME	Domäne mit Sequenzähnlichkeit zu Crm1, Importin β , etc.
C-/N-Terminus	Carboxy-/Amino-Terminus
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DIC	<i>digital interference contrast</i> , digitaler Interferenz-Kontrast
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
dT50	dig-markiertes Oligo-Desoxythymidin
Gal4-AD, Gal4-BD	Gal4-Aktivierungsdomäne, -Bindedomäne
GFP, YFP, CFP	<i>green / yellow / cyan fluorescence protein</i> , grün- / gelb- / cyan-fluoreszierendes Protein
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP, GDP	Guanosintriphosphat, Guanosindiphosphat
HEAT	Proteinfaltungsmotiv, das in den Proteinen Huntingtin, Elongationsfaktor 3 (EF3), α -regulatorische Untereinheit der Proteinphosphatase 2A (PP2A) und Hefe-PI3-Kinase TOR1 zuerst gefunden wurde
HI-Virus	<i>human immunodeficiency virus</i> , humanes Immundefizienz-Virus
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
LMB	Leptomycin B
MTOC	<i>microtubule organizing center</i> , Mikrotubuli-organisierendes Zentrum
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten-RNA
Mw	Molekulargewichts-Marker
NES, NLS	<i>nuclear export / import sequence</i> , Kernexport/import-Sequenz

Ni-NTA	<i>nickel-nitrilotriacetic acid</i> , Nickel-Nitrilotriessigsäure
OD ₆₀₀	optische Dichte bei 600 nm
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
ROI	<i>region of interest</i> , Auswahlbereich
SD	synthetisches Hefe-Minimalmedium mit Glukose
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulphate - polyacrylamid gel electrophoresis</i> , Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter Zugabe von Natrium-dodecylsulfat
snRNA	<i>small nuclear RNA</i> , kleine nukleäre RNA
SV40	Simian Virus 40
TCA	Trichloressigsäure
U snRNA	Uridin-reiche, kleine nukleäre RNA
WT	Wildtyp
YPD	<i>yeast extract peptone dextrose</i> , Hefe-Vollmedium

6.2 Übersicht der orthologen Proteine

<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Höhere Eukaryoten
Cse1 chromosome segregation	CAS cellular apoptosis susceptibilty
Gsp1, Gsp2 genetic suppressor of Prp20-1	Ran
Prp20 suppressor of the pheromone response pathway	RCC1 regulator of chromosome condensation
Rna1 Ran GTPase activating protein	RanGAP1 Ran-GTPase-aktivierendes Protein 1
Srp1 suppressor of Rpb1 (RNA-Polymerase)	Imp α Importin α
Xpo1 Exportin 1	Crm1 chromosome region maintenance
Yrb1 yeast ran binder 1	RanBP1 Ran-bindendes Protein 1
Yrb2 yeast ran binder 2	RanBP3 Ran-bindendes Protein 3
—	RanBP2 Ran-bindendes Protein 2

6.3 Veröffentlichungen

Pannek, A., and Stade, K. (2006): Nuclear import and export. *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*, **2**, 1320-24

Neuber, A., Franke, J., Wittstruck, A., Schlenstedt, G., Sommer, T., and Stade, K. (2008): The nuclear export receptor Xpo1/Crm1 is physically and functionally linked to the spindle pole body in budding yeast. *Mol Cell Biol*, angenommen zur Veröffentlichung am 13.06.2008

6.4 Danksagung

Ich danke zunächst Katrin Stade für die Betreuung dieser Arbeit und für viele kritische Diskussionen. Thomas Sommer war ein kompetenter Berater, wenn sich Spc72 allen Analyseversuchen zu widersetzen schien, und konnte in mir immer wieder die Begeisterung für dieses Projekt wecken. Bei Gabriel Schlenstedt durfte ich zwei wunderbare Wochen verbringen und alles über *in vitro*-Bindungsanalysen lernen. Ernst Jarosch half mir mit konstruktiver Kritik und dem Durchlesen des Manuskripts. Corinna Volkwein brachte den Sonnenschein in den Laboralltag. Ich danke ihr und Angelika Wittstruck sowie Kordelia Hummel für viele, viele Hilfen bei der Durchführung der Experimente. Jacqueline Franke bin ich nicht nur für die Überlassung der ungerichteten 2-Hybrid-Analyse dankbar. Frank Vogel hat für mich die elektronenmikroskopischen Untersuchungen durchgeführt.

Auch weitere Mitglieder des Sommer-Labors und anderer Arbeitsgruppen haben zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Insbesondere möchte ich mich bei Christian Hirsch, Beate Friedrich, Birgit Meußner, Ruth Geiß-Friedlander, Uwe Lenk, Robert Gauß, Christina Quensel, Gunnar Dittmar und Gunnar Rättsch für ihre Hilfe bedanken. Der Expertenrat von Anje Sporbert war bei der Quantifizierung der GFP-Signale sehr wertvoll. Nicht zuletzt danke ich Thomas Blankenstein und Udo Heinemann, die sich freundlicherweise bereit erklärten, diese Arbeit zu begutachten.

Meine Mutter drücke ich noch einmal für das mühsame Korrekturlesen des Manuskripts und ihr geduldiges Warten auf den Abschluss dieser Arbeit. Das schönste Experiment der Welt führen wir beide gerade durch, Oliver, und ich hoffe, dass es noch sehr lange dauert.