

Summary

During each cell division a cell needs to distribute the genetic material equally to two daughter cells. To segregate chromosomes the cell uses a macromolecular machine, the mitotic bipolar spindle. A bipolar spindle forms also *in vitro*, when chromosomes are added to *Xenopus* M-phase egg extract. The small GTPase Ran has been demonstrated to be necessary for chromatin induced microtubule (MT) assembly and sufficient to induce microtubule nucleation (Carazo-Salas *et al.*, 2001; Wilde *et al.*, 2001). The mechanistic details of Ran's function in microtubule assembly however were unknown. The aim of this study was to identify the targets of Ran in mitotic spindle assembly and to characterize their function and regulation.

It is shown here that the action of Ran in spindle formation requires the microtubule associated protein TPX2. TPX2 is necessary for chromatin to assemble microtubules and induces microtubule assembly in *Xenopus* M-phase extract. We show that TPX2 is directly regulated by importin β , first characterized as an adaptor molecule for protein nuclear import. The site for interaction of TPX2 with importin β is mapped. A TPX2 mutant that cannot bind importin β is shown to be constitutively active in the induction of microtubule-containing aster-like structures in *Xenopus* egg extract, demonstrating that no other importin β or RanGTPase target is required to mediate microtubule assembly in this system. Further, recombinant TPX2 is shown to induce the formation and bundling of microtubules in dilute solutions of pure tubulin. In this purified system, importin β prevents TPX2-induced microtubule formation, but not TPX2-tubulin interaction or microtubule bundling. This demonstrates that the critical early function in spindle formation regulated by importin β is TPX2-mediated microtubule nucleation.

Summary

It was shown that RanGTP also leads to an increase of microtubule nucleation by spermcentrosomes in mitotic egg extracts. We demonstrate that TPX2 is necessary for Ran-mediated activation of centrosomes and that this process is inhibited by importin .

Taken together the presented data reveal an additional function of components of the nucleocytoplasmic transport machinery, that of regulating components required specifically during mitosis. We postulate a general mechanism by which proteins that function in M phase can be inactivated during interphase by sequestering them from their target molecules by import into the nucleus. During mitosis, after the nuclear envelope has been disassembled, TPX2 is inhibited by the import adaptor molecule importin . In the vicinity of chromatin where the concentration of Ran GTP is high TPX2 will be active. In this way Ran will signal spatial information concerning where the DNA is located.

Zusammenfassung

Während jeder Zellteilung muß die Erbinformation gleichmäßig auf die beiden Tochterzellen verteilt werden. Um die Chromosomen akkurat zu verteilen, bedienen sich die Zellen einer komplexen molekularen Maschinerie, der Mitotischen Spindel.

Die Vorgänge der Zellteilung und Assemblierung einer Spindel können im Reagenzglas nachgebildet werden. Werden Chromosomen in einem *in vitro* System zu einem M-Phase *Xenopus* Extrakt gegeben bildet sich eine bipolare Spindel um die Chromosomen. Es wurde gezeigt, daß die kleine GTPase Ran notwendig für die Assemblierung einer Spindel um Chromosomen ist und außerdem hinreichend ist, um Mikrotubuli zu nukleieren. Die mechanistischen Details dieses Prozesses waren aber bislang unbekannt. Ziel dieser Arbeit ist es, die direkten Effektormoleküle von Ran bei der Bildung der Mitotischen Spindel zu identifizieren und die Mechanismen ihrer Funktion und Regulation genau zu charakterisieren.

In dieser Arbeit wird gezeigt, daß Ran für seine Funktion bei der Assemblierung der Mitotischen Spindel das Protein TPX2 benötigt. TPX2 ist notwendig für die Nukleation von Mikrotubuli um Chromatin und für die Induktion der Assemblierung asterartiger Strukturen in *Xenopus* M-Phase Extrakt. Wir zeigen hier, daß TPX2 direkt von Importin β , einem Adaptormolekül für den Import von Proteinen in den Zellkern, reguliert ist. Die Bindungsstelle des TPX2 Moleküls an Importin β ist identifiziert worden und ein mutantes TPX2 Molekül hergestellt worden, welches nicht mehr an Importin β binden kann. Diese TPX2 Mutante ist konstitutiv aktiv bezüglich der Induktion von mikrotubuli-haltigen, asterartigen Strukturen in *Xenopus* M-Phase Extrakten. Dies beweist, daß TPX2 und kein anderes Zielmolekül von Importin β oder Ran außer TPX2 notwendig für die Assemblierung von Mikrotubuli in diesem System ist. Weiterhin wird gezeigt, daß

TPX2 in einem minimalen System mit Puffer, TPX2 und Tubulin in der Lage ist, Mikrotubuli zu assemblieren und zu bündeln. In diesem gereinigten System verhindert Importin die Nukleation von Mikrotubuli durch TPX2 aber nicht die Bindung von TPX2 an Mikrotubuli oder das Bündeln von Mikrotubuli. Diese Daten belegen, daß der kritische von Importin regulierte Schritt während der Spindelassamblierung die Nukleation von Mikrotubuli durch TPX2 ist. In früheren Arbeiten ist gezeigt worden, daß Ran GTP zu einer vermehrten Nukleation von Mikrotubuli durch Zentrosomen führt. Wir zeigen hier, daß TPX2 notwendig für die Ran vermittelte Aktivierung von Zentrosomen ist und daß Importin diesen Prozeß inhibiert.

Zusammengefaßt zeigen die hier präsentierten Daten, daß die Moleküle, die den Transport in und aus dem Zellkern ausführen ebenfalls eine Rolle bei der Zellteilung während der Mitose spielen. Wir schlagen einen allgemeinen Mechanismus vor nach dem Proteine, die eine Funktion während der Mitose haben, während der Interphase durch Transport in den Zellkern inaktiviert werden können. Während der Mitose, nachdem sich der Zellkern aufgelöst hat, wird TPX2 von dem Adaptormolekül für den Kernimport, Importin, inaktiviert. In der unmittelbaren Umgebung des Chromatins, wo die Konzentration von Ran GTP hoch ist, ist TPX2 nicht an Importin gebunden und dadurch aktiv. Auf diesem Wege vermittelt das Protein Ran anderen Zellbausteinen eine Information über den Aufenthaltsort der DNA.