

**Partnerproteine des Hitzestressproteins 90 (Hsp90) in der Kernmembran  
- Einfluss von Hsp90 auf den Kernexport von 60S ribosomalen  
Untereinheiten -**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
in Frankfurt am Main

von  
Frank Jacobsen  
aus Wesel am Niederrhein

Frankfurt am Main 2001

DF1

vom Fachbereich Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
als Dissertation angenommen.

Dekan: Prof. Dr. Joachim Engels

Gutachter: Prof. Dr. Dr. H. Fasold  
Prof. Dr. B. Ludwig

Datum der Disputation:

Wohl dem, der gelernt hat, zu ertragen, was er nicht ändern kann,  
und preiszugeben mit Würde, was er nicht retten kann.

Friedrich Schiller

denn

Überall geht ein frühes Ahnen dem späteren Wissen voraus

Alexander von Humboldt

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungsverzeichnis	III
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Der Zellkern	1
1.2 Der Kernporenkomplex	3
1.3 Kerntransportprozesse	6
1.3.1 Transportsubstrate erkennen und gezielt passagieren: Transportsignale	6
1.3.2 Kernlokalisierungssignal	7
1.3.3 Kernexportsignale	8
1.3.4 Nuclear shuttling signals	8
1.3.5 Terminierung des Transportprozesses: Der Ran - Zyklus	9
1.3.6 Transportrezeptoren: Die Importin $\beta$ Familie	10
1.3.7 Export von tRNA	14
1.3.8 Export von mRNA	15
1.3.9 Export von ribosomalen Untereinheiten	19
1.4 Hitzestressproteine und ihre zelluläre Funktion	20
1.4.1 Das Hitzestressprotein 90 (Hsp90)	21
1.5 Zielsetzung	24
<b>2. Ergebnisse</b>	<b>25</b>
2.1 Isolierung von Zellkernen aus Rattenhepatocyten	25
2.2 Darstellung von Kernhüllenvesikel aus Rattenleberzellkernen	25
2.3 Isolierung von 60S rUE aus Rattenhepatocyten	26
2.4 Isolierung von Hsp90 aus Rattenhepatocyten	27
2.5 Exportmessung mit 60S rUE aus wiederversiegelten Kernhüllen	29
2.6 Der Einfluss von CKII auf die exportfördernde Aktivität von Hsp90	30
2.7 Einfluss von Radicol auf die exportfördernde Aktivität von Hsp90	31
2.8 Einfluss von Hsp90-Inhibitoren auf den <i>in vivo</i> Export von 60 S rUE	33
2.9 Mikroinjektion und Exportmessung von 60S rUE in Oocyten von <i>Xenopus laevis</i>	33
2.10 Darstellung einer Messreihe	35
2.11 Einfluss von Novobiocin auf den Export von 60S rUE <i>in vivo</i>	35
2.12 Einfluss von Radicol auf den Export von 60S rUE <i>in vivo</i>	36
2.13 Phosphorylierung von Hsp90	38
2.14 Charakterisierung unterschiedlicher Quervernetzungsreagenzien	43
2.15 Herstellung und Verwendung des heterobifunktionalen Quervernetzers APAI	44
2.16 Analyse und Isolierung quervernetzter Proteine aus der Kernmembran	45
2.17 Markierung von Proteinen	46
2.17.1 Biotinylierung von Hsp90	46
2.17.2 Radioaktive Markierung von Proteinen mit dem Radioisotop $^{125}\text{J}$	46
2.18 Quervernetzungsversuche mit Hsp90 aus Rattenhepatocyten	47
2.19 Quervernetzungsversuche mit Fragmenten von hHsp90	48
2.20 Identifizierung von quervernetzten Proteinen	48
2.21 Ergebnisse der Proteinsequenzierungen	52
2.22 Erstellung eines mit koloidalem-Gold markierten Antikörpers	54

---

2.23	Elektronenmikroskopische Lokalisation von endogenem Hsp90 $\alpha$	55
2.24	Untersuchung von Wechselwirkung zwischen Hsp90 und 60S rUE	60
<b>3</b>	<b>Diskussion</b>	<b>64</b>
3.1	Warum ausgerechnet Hsp90?!	64
3.2	Die Phosphorylierung von Hsp90 und ihr Einfluss auf die Aktivität	66
3.3	Der Transport von 60S rUE	68
3.4	Einfluss von Hsp90 auf den Transport von 60S rUE	71
3.5	Elektronenmikroskopische Detektion von endogenem Hsp90	73
3.6	Quervernetzung von Hsp90 mit Proteinen der Kernmembran	75
3.7	Die Sequenzen CKESW und NRGLPP	78
3.8	Ein Bestandteil des Kernporenkomplexes der Hefe <i>S.cerevisiae</i> : Nup57p	80
3.9	Ausblick	82
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>84</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil</b>	<b>86</b>
5.1	Isolierung von Zellkernen aus Rattenhepatocyten	86
5.2	Darstellung von Kernhüllenvesikeln	86
5.3	Isolierung von 60S rUE aus Rattenhepatocyten	87
5.4	Isolierung von Hsp90 aus Rattenhepatocyten	88
5.5	Proteinbestimmung	89
5.6	Expression rekombinanter Proteine	89
5.7	Endpunktbestimmung mit wiederversiegelten Kernhüllen	90
5.8	Flüssigkeitsszintillationszählung	90
5.9	Gelelektrophorese	91
5.10	Western-Blotting	92
5.11	<i>In vivo</i> Messungen in Oocyten von <i>Xenopus laevis</i>	93
5.11.1	Isolation und Aufbewahrung von Oocyten	93
5.11.2	Mikroinjektion in Oocyten	94
5.11.3	Darstellung einer Messreihe	95
5.12	Synthese der Quervernetzungsreagenz APAI	95
5.13	Proteinmarkierung	96
5.13.1	Radioaktive Markierung mit <sup>125</sup> J	96
5.13.2	Biotinylierung von Proteinen	97
5.14	Quervernetzung von Proteinen	97
5.15	Darstellung eines Kernextraktes	98
5.16	Proteinrückelution	98
5.17	Bromcyan-Spaltung membrangebundener Proteine	98
5.18	Affinitätschromatographie mit Heparin-HiTrap	99
5.19	Phosphorylierung und radioaktive Exposition	99
5.20	Herstellung eines Hsp90-Agarose Gels	100
5.21	Darstellung eines Gels mit immobilisiertem Novobiocin	100
5.22	Darstellung eines kolloidalen Gold-Protein Komplexes	101
5.23	Transmissionselektronenmikroskopie	101
<b>6</b>	<b>Puffer und Lösungen</b>	<b>103</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>108</b>

**Abkürzungsverzeichnis**

ADP	Adenosindiphosphat
AS	Aminosäuren
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CBC	Kappenbindender Komplex (cap binding complex)
cpm	Impulse pro Minute (counts per minute)
Da	Dalton
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EM	Elektronen Mikroskopie
ER	endoplasmatisches Retikulum
FPLC	fast protein liquid chromatographie
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
g	Erdbeschleunigung ( $9,81 \text{ m / s}^2$ )
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	menschlicher Immundefizienzvirus
hnRNP	heterogener nuklearer RNP
Hsp	Hitzestressprotein
KNS	nukleares Pendelsignal des hnRNPK
mRNA	Boten-RNA
NES	nukleares Exportsignal
NLS	nukleares Lokalisationssignal
NPC	nuklearer Porenkomplex
Nup	Nukleoporin
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Poly-A	Polyadenylsäure
PVDF	Polyvenyldifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale RNA
RNP	Ribonukleopartikel
RT	Raumtemperatur
rUE	ribosomale Untereinheiten
SDS	Natrium(Sodium-)dodecylsulfat
snRNP	kleines nukleares RNP
snoRNA	kleine nukleolare RNA
SRP	Signalerkennungspartikel
SV40	Simian Virus 40
TCA	Trichloressigsäure
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer RNA
UV	Ultraviolett

---

WGA      Weizenkeimagglutinin  
w/v      Gewichtsprozent

**Eibuchstabencode für Aminosäuren**

A	Alanin	N	Asparagin
C	Cystein	P	Prolin
D	Asparaginsäure	Q	Glutamin
E	Glutaminsäure	R	Arginin
F	Phenylalanin	S	Serin
G	Glycin	T	Threonin
H	Histidin	V	Valin
I	Isoleucin	W	Tryptophan
K	Lysin	Y	Tyrosin
L	Leucin	X	beliebige oder unbekannte AS
M	Methionin		

## 1. Einleitung

### 1.1 Der Zellkern

Ein herausragender Vorteil der eukaryotischen Zelle gegenüber einem Prokaryoten liegt in ihrer Möglichkeit, alle Stoffwechselprozesse auf den Moment zu regulieren. Dies ermöglicht es der Zelle auch im Verband mit genauer Aufgabenverteilung zu koexistieren.

Um Stoffwechselprozesse dezidiert und unabhängig von einander kontrollieren zu können, ist es unabdingbar diese räumlich voneinander zu trennen.

Eine solche Kompartimentierung stellt auch der Zellkern dar, welcher die Stoffwechselprozesse, die unmittelbar die DNA betreffen, von allen anderen separiert.

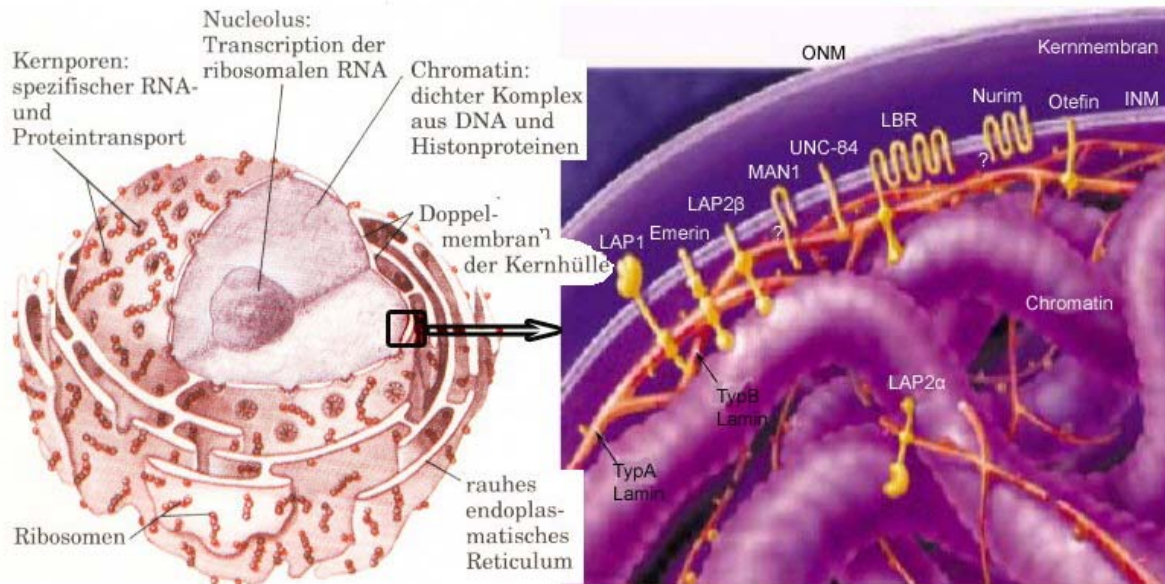
Als begrenzende Einheit dient die Kernmembran, welche sich als Doppelmembran generiert und somit in eine innere (INM, von inner nuclear membrane) und eine äußere Membran (ONM, von outer nuclear membrane) differenziert werden kann. Die äußere Membran bildet eine funktionelle Einheit mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER). Darüber wird deutlich, dass auch das von ONM und INM inkorporierte Periplasma mit dem Lumen des ER ebenfalls eine Einheit bilden muss, dem beispielsweise die Funktion eines Calcium-Speichers zukommt.

Da der inneren Membran in erster Linie stabilisierende und strukturgebende Aufgaben zukommen, ist diese mit einem rigiden Netzwerk aus Laminen, der sogenannten Kernlamina, über laminbindende Proteine (LAP, von lamine associated proteines) assoziiert. Aus der Wirbeltierlamina sind die Lamine A, B1 + B2 und C, bei höheren Säugetieren zudem die Lamine D und E identifiziert und charakterisiert worden. Hierbei ließen sich zweierlei LAPs nachweisen, bei denen LAP1 sowohl an Lamin A und B bindet, während LAP2 neben Lamin B auch mit dem Chromatin interagiert. Weitere in letzter Zeit identifizierte aber bisher noch wenig charakterisierte proteinäre Bestandteile sind die Proteine Emerin, Otefin, LBR (von Lamin binding receptor), Nutrim, MAN1 und UNC-84 (Übersicht in Cohen et al. 2001).

Während der Prometaphase höherer Eukaryoten werden die Lamine in hohem Maße phosphoryliert, was zu deren Dissoziation führt. Während die Kernmembran mitsamt der LAPs und dem daran gebundenem Lamin B vesikularisiert, liegen die Lamine A und C frei im Cytosol vor. In der Anaphase können die Lamine A und C durch einsetzende Dephosphorylierung wieder an das Chromatin und im weiteren an die ebenfalls dephosphorylierten LAPs und Lamin B reassoziieren und somit den Wiederaufbau der



Kernhülle einleiten (Foisner & Gerace 1993; Hutchinson et al. 1994; Nikolakaki et al. 1996; Pyrapasopoulou et al. 1996).



**Abbildung 1.1:**

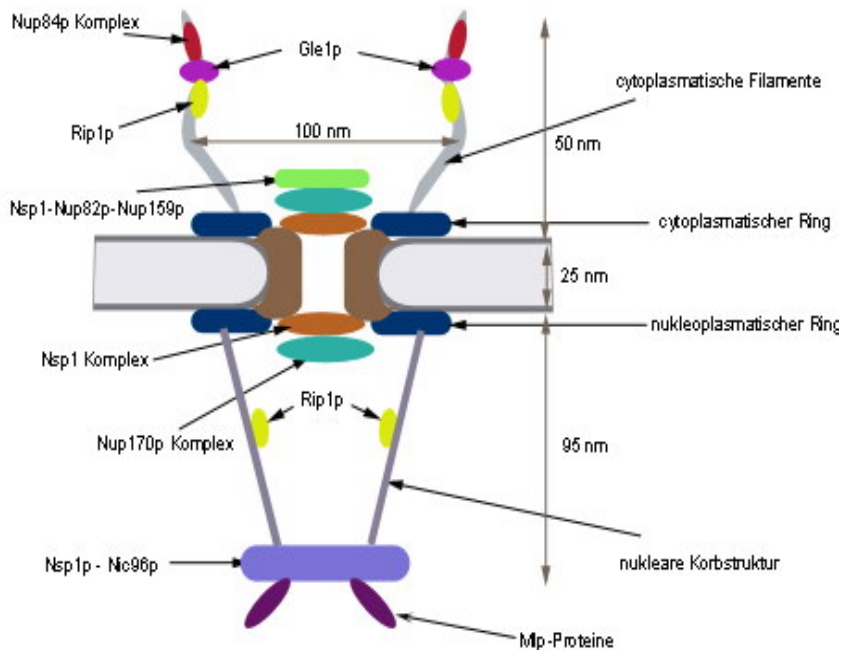
Die Abbildung zeigt eine schematische Darstellung des Zellkerns und daraus vergrößert dargestellt einen Abschnitt der INM. Hier wird gezeigt, wie man sich die Verknüpfung zwischen der Kernmembran und dem Nukleoplasma, dabei insbesondere mit dem Chromatin, heute vorstellt. Deutlich wird dabei, dass es sich bei der Kernlamina keineswegs um ein rein zweidimensionales, die INM auskleidendes Proteinnetzwerk handelt, sondern, dass sie eng mit der Strukturgebung des Chromatins und des Nukleoplasmas verbunden ist. (nach Lehninger et al. 1994 und Cohen et al. 2001)

Auch das Chromatin, also die mit Proteinen assoziierte DNA, liegt im Zellkern an dessen Lamina gebunden vor. Hierbei wird mehr und mehr darüber diskutiert, dass LAPs auch im Nukleoplasma strukturgebend wirken (Cohen et al. 2001; Gruenbaum et al. 1999; Wilson 2000). Diese strikte räumliche und strukturelle Ordnung des Chromatins setzt sich im Nukleoplasma fort, wodurch in diesem chromatinfreie Bereiche gebildet werden, welche dem Transport aller für den Stoffwechsel des Zellkerns benötigten Bestandteile vorbehalten sind. Inzwischen geht man davon aus, dass innerhalb dieser chromatinfreien Bereiche des Nukleoplasmas der Stofftransport nicht über freie Diffusion, sondern ähnlich wie im Cytoplasma, sich an proteinären Strukturen orientierend, gerichtet verläuft. In der Hefe übernehmen diese Funktion sogenannte Mlps (von Myosin like proteines), bei denen man jedoch noch spekuliert, ob sie kabelähnliche Strukturen in den chromatinfreien Bereichen bilden oder diese einer Röhre gleich gänzlich auszukleiden vermögen (Strambio de Castillia et al. 1999). Bei den Vertebraten ist mit den Tpr-Proteinen (von translocated promoter region) bisher ein Proteintyp identifiziert, welcher diese Aufgabe übernehmen könnte. Diese Proteine stellen in jedem Fall ein Bindeglied zwischen Nukleoplasma und den, die Kernporen

auskleidenden, Kernporenkomplexen (NPC, von nuclear pore complex) dar (Gerace & Burke 1988; Goldberg & Allen 1995).

## 1.2 Der Kernporenkomplex

Der NPC ist der einzige bisher identifizierte Transportweg zwischen Nukleo- und Cytoplasma. Entsprechend vielseitig sind seine Aufgaben. Neben der Funktion die Stabilität einer Membranpore zu gewährleisten, um eine ununterbrochene Kommunikation zwischen den Kompartimenten zu erreichen, muss der Kommunikationsfluß einer gewissen Reglementierung unterliegen, um in dieser Größenordnung überhaupt von statten gehen zu können. Je höher der Entwicklungsgrad des Organismus ist, um so präziser muss der Stoffwechsel und mit ihm die Genexpression reguliert werden, und um so umfangreicher stellt sich auch der NPC in seiner Komplexität dar. Während man bei der Hefe (*Saccharomyces Cerevisiae*) von ca. 50 verschiedenen Proteinen, von denen bis dato 30 identifiziert werden konnten mit einer Gesamtmasse von in etwa 66 MDa ausgeht, generiert sich der Vertebraten NPC aus etwa doppelt so vielen Proteinen. Erst 16 sind bisher identifiziert, mit einer Gesamtmasse von ca. 125 MDa. Rein strukturell ist der Unterschied jedoch nicht so gravierend (Reichelt et al. 1990; Doye & Hurt 1997). Lediglich die Maße beider NPC-Typen divergieren leicht (Fahrenkrog et al. 1998) (siehe Abb. 1.2). Einzig bei der Mitose unterscheiden sich beide NPC-Typen deutlich voneinander. Während der Hefe NPC in der Kernmembran erhalten bleibt, werden diese bei höheren Eukaryoten während der Prometaphase mitsamt der Kernmembran (s.o.) abgebaut. Im Folgenden wird daher, wenn nicht anders erwähnt, auf die allgemeinen Merkmale des eukaryotischen Kernporenkomplexes eingegangen. Die proteinären Bestandteile des Kernporenkomplexes werden als Nucleoporine (Nups) bezeichnet. Charakteristisch für diese Art von Proteinen sind Sequenzmotive, welche sich bisher nur in Bestandteilen des NPC nachweisen ließen. Zu diesen Sequenzen gehören Abfolgen von FXFG, GLFG und FG, welche sich mit spezifischen Zwischensequenzen zahlreich wiederholen können (Imamoto et al. 1995; Radu et al. 1995a+b; Rout & Wente 1994; Doye & Hurt 1997). Diese Motive könnten, indem sie sich entlang der Gesamtstrecke des NPC häufen, über Assoziation und Dissoziation der Transportsubstrate die Richtung des Transportprozesses vorgeben (Görllich & Mattaj 1996; Ohno et al. 1998; Talcott & Moore 1999).

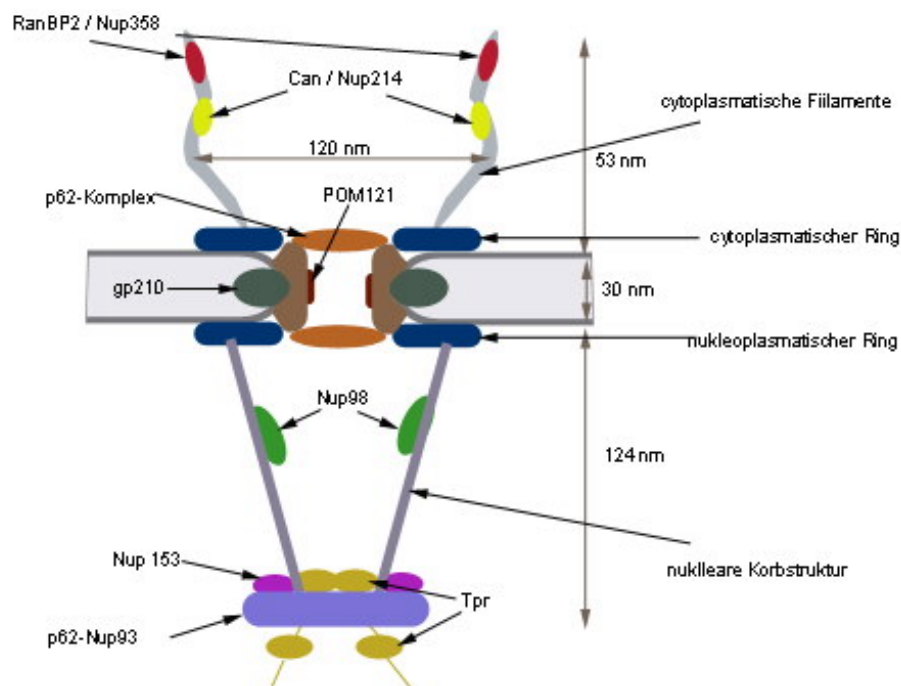


**Abbildung 1.2:** Gezeigt wird die schematische Darstellung eines NPC aus der Hefe *S. Cerevisiae*. Dargestellt sind die Maße des Komplexes sowie die Lokalisation einiger bereits bekannter Proteine. Darunter fallen auch einige heterologe Proteinkomplexe, deren einzelne Bestandteile im Folgenden aufgeführt werden.

Nsp1 Komplex: Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Nic96p  
 Nup170p Komplex: Nup188p-Nup170p-Nup157p-Nup59p-Nup53p  
 Nup84p Komplex: Nup145p-Nup120p-Nup85p-Nup84p-Sec13p-Seh1p  
 (Stoffler et al. 1999a)

Teilweise scheinen diese Nups nicht starr in das Gesamtgefüge des NPC integriert zu sein, sondern besitzen die Fähigkeit sich über die Gesamtlänge des NPC hinweg zu bewegen (Fahrenkrog 1998). Etwa 25 Prozent des Gesamtproteinanteils eines Kernporenkomplexes bilden Proteine die solche Sequenzmotive nicht vorweisen können, jedoch als eindeutig zum Kernporenkomplex gehörend identifiziert wurden. Diesen Nups werden daher in erster Linie strukturgebende und stabilisierende Aufgaben zugewiesen (Greber et al. 1990; Doye & Hurt 1997). Viele Nups sind zudem O-glykosidisch mit N-Acetylglukosaminen verknüpft. Diese Glukosilierungen scheinen eine nicht unerhebliche Bedeutung für die Funktion des NPC zu haben, da sich diverse Transportprozesse über das Lektin Weizenkeimagglutinin (WGA, von wheat germ agglutinin) inhibieren lassen (Finlay et al. 1987; Finlay & Forbes 1990; Hu et al. 1996). Die eigentliche Pore wird von zwei Ringsystemen je eins auf der cytoplasmatischen und eins auf der nukleoplasmatischen Seite, welche über acht radiäre Speichen miteinander verbunden sind, gebildet. Die Speichen sind wiederum über membranständige Proteine an der Schnittstelle zwischen ONM und INM in der Kernmembran verankert. Zwei integrale Vertebratenproteine konnten hierfür identifiziert werden nämlich Pom121 und gp210 (Panté & Aebi 1996; Söderqvist et al. 1997). Diese Strukturproteine sind zudem dafür verantwortlich, dass sich im Zentrum zwei unterschiedliche Transportwege eröffnen. Ein eher peripher angeordneter diffusionsgetriebener Weg für Ionen und kleinere Moleküle, und ein

zentraler Weg für alle anderen Transportsubstrate, deren Diffusion dann jedoch stark gerichtet ist. Mit dem Zentrum des NPC wird auch stets über einen Zentralkörper (central plug oder auch Transporter genannt) diskutiert. Dieser ca. 12 MDa großer Komplex tritt jedoch je nach Präparationsart mehr oder weniger häufig auf, was demnach eher für ein im Transport befindliches Substrat, als für einen festen Bestandteil des Kernporenkomplexes spricht (Panté & Aebi 1994; Stoffler et al. 1999).



**Abbildung 1.3:**

Hier ist zum Vergleich zur Abbildung 1.2 ein Vertebraten NPC dargestellt. Im Vertebraten NPC konnte bisher lediglich ein Unterkomplex detektiert und charakterisiert werden. Dabei handelt es sich um den p62 Komplex (p62-p58-p54-p45), welcher dem Nsp1p Komplex des Hefe NPC homolog ist (Stoffler et al. 1999a).

Auf dem cytoplasmatischen Ring sind acht sogenannte Filamente aufgesetzt, welche ca. 50 nm weit in das Cytoplasma hineinreichen. Die cytoplasmatischen Filamente des NPC sind sehr flexibel, und da man das Ende der Filamente schon des öfteren im Bereich der inneren Pore beobachten konnte, wird eine aktive Beteiligung der Filamente am Heran- und Wegdirigieren von Transportsubstraten an die eigentliche Pore diskutiert (Panté & Aebi 1996). Ein weiterer Hinweis dafür bildet die Lokalisation von RanBP2 (von Ran binding protein 2, siehe auch 1.3.5) an den Enden der cytoplasmatischen Filamente.

Auch das Nukleoplasma wird von acht, jedoch mit dem nuklearen Ring in Verbindung stehenden, Filamenten penetriert. Diese enden in einem terminalen Ring, was der nukleoplasmatischen Seite des NPC eine korbähnliche Struktur verleiht (nuclear basket).

Der terminale Ring lässt sich einer Irisblende ähnlich öffnen und schließen, jedoch ist weiterhin völlig unklar, was diesen Mechanismus auslöst und reguliert. Es gibt Hinweise dafür, dass die lokale Calcium-Konzentration dabei eine Rolle spielt (Stoffler et al. 1999). Für die Beweglichkeit des Ringes könnten sich die vier Zink-Finger-Domänen von Nup153 verantwortlich zeigen, welche unmittelbar im Bereich des Übergangs von den nukleoplasmatischen Filamenten in den terminalen Ring lokalisiert wurden (Sukegawa & Blobel 1993; Kiseleva et al. 1996; Stoffler et al. 1999).

### 1.3 Kerntransportprozesse

Der Kernporenkomplex bildet einen wässrigen Kanal, welcher für die meisten Moleküle, die Grenze liegt bei ca. 40-60 kD oder 9 nm, über Diffusion frei passiert werden kann (Paine et al. 1975; Peters 1986; Keminer & Peters 1999).

Dennoch werden auch Moleküle die sich weit unter diesem Größenniveau befinden, wie beispielsweise die t-RNAs, über Transportrezeptoren befördert, um den Prozess schlichtweg zu beschleunigen. Messungen mit Goldpartikeln haben ergeben, dass der maximale Durchmesser dieses Kanals etwa 26 nm beträgt, was in etwa dem Durchmesser der 60S rUE entspräche (Feldherr & Akin 1991). Dennoch werden durch die Kernporen von *Chironomas tentans* die sogenannten Balbani-Ring-RNPs transportiert, die mit 50 nm Durchmesser das bisher größte Transportsubstrat der Kernpore darstellen (Daneholt 1997; Kiseleva 1998). Die Vielfalt und Spezifikation dieser doch sehr unterschiedlichen Transportsubstrate erfordern erst einmal eine sehr präzise Selektion, um bei aller Vielfältigkeit die Geschwindigkeit des Prozesses möglichst hoch zu halten.

#### 1.3.1 Transportsubstrate erkennen und gezielt passagieren: Transportsignale

Proteine werden im Cytoplasma synthetisiert und anschließend an ihren Zielort transportiert. Alle bekannten Signale, die ein Protein in das rER in die Mitochondrien oder auch Chloroplasten dirigieren, werden nach Erreichen des entsprechenden Zielortes durch Abspaltung ungültig. Bei allen Transportsignalen, welche mit dem Zellkern in Verbindung

stehen, bleiben die Signale auch bei Proteinen, welche den NPC lediglich einmal durchkreuzen müssen, erhalten. Doch wenn man bedenkt, dass höhere Eukaryoten eine offene Mitose durchführen, wird klar warum dies der Fall sei muss, nämlich um die während der Mitose vermischten nukleären und cytoplasmatischen Proteine nach Reassemblierung des Zellkerns schnell wieder voneinander trennen zu können. Folgende Signale, die den Transport durch die Kernpore betreffen, sind bisher bekannt:

### 1.3.2 Kernlokalisierungssignal

Da die Proteinbiosynthese im Cytoplasma stattfindet, müssen Proteine deren Wirkungsstätten im Nukleoplasma anzusiedeln sind, als kernständige Proteine erkannt werden. Eine bisher bekannte Adressierungsart bietet das Vorhandensein einer NLS.

Die NLS (von nuclear localization signal) ist ein häufig vorkommendes Erkennungssignal beim Kernimport und wurde im Simian Virus 40 (SV40) großen T-Antigen erstmals entdeckt. Allen bekannten NLS gemein ist, dass es sich um kurze Aminosäureabfolgen handelt, in denen der Anteil an basischen Aminosäuren überwiegt (NLS des SV40 T-Antigens: <sup>126</sup>PKKKRKV<sup>132</sup>) (Kalderon et al. 1984). Die NLS kann auch durch unterschiedlich große Zwischensequenzen zweigeteilt sein, wie es beim Nucleoplasmin (Robbins et al. 1991) (<sup>150</sup>PPKAVKRPAATKAGQAKKKKLDKE<sup>174</sup>) der Fall ist. Versuche mit NLS gekoppelten nicht kernständigen Substraten zeigen, dass eine einzelne NLS ausreicht, um die Substrate in den Nukleus zu leiten.

Bei den ohnehin stark basischen Proteinen, wie beispielsweise das ribosomale Protein L25, existieren ganze Proteinbereiche (in diesem Fall 41 AS), welche für den Transport unentbehrlich sind.

Neben diesen Peptidsignalen wurden bisher auch andere Erkennungsmerkmale beschrieben, welche den Eintritt in den Nukleus ermöglichen können.

Die Uridin-reichen kleinen nukleären RNAs (U snRNA von uridine-rich small nuclear RNA) der Spleisosomen werden für ihre Reifung in das Cytosol exportiert, um nachher in den Kern reimportiert zu werden. Dabei ist ein modifiziertes Guanodin, nämlich 2,2,7-Trimethylguanodin als sogenannte (m<sub>3</sub>G)-Cap-Struktur unerlässlich. In Oocyten konnte beobachtet werden, dass die 5S rRNA für ihre Prozessierung und Lagerung erst in das Cytosol exportiert wird, um danach wieder reimportiert zu werden.

Das Signal für den Import wird auf dem ribosomalen Protein L5 vermutet, da dies für den Import unentbehrlich ist (Michael & Dreyfuss 1996).

Zu guter letzt wurden auch Glykosilierungen als entscheidendes Importsignal beschrieben (Duverger et al. 1996).

### 1.3.3 Kernexportsignale

Entsprechend der NLS gibt es für Proteine, welche den Kern verlassen müssen, spezielle Erkennungsmotive, welche eine Translokation ermöglichen. Das am besten untersuchte Signal bildet hierbei eine, synonym zur NLS, als NES ( von nuclear export signal) bezeichnete Leucin reiche Aminosäuredomäne. Entdeckt wurde diese Art von Signal anhand des HIV-Proteins Rev, welches die Sequenz  $^{73}$ LQLPPLERLTL $^{84}$  aufweist, und damit das Bindeglied darstellt, welches nötig ist, um die HIV-RNA über den CRM1 Exportweg in das Cytosol zu transportieren (Fischer et al 1995) (siehe dazu auch 1.3.8). Inzwischen wurden zahlreiche NES für weitere Proteinen identifiziert, worüber sich  $L(X)_{1-3}L(X)_{2-3}LXL$  als Konsensussequenz herausmitteln lässt (Bogerd et al 1996, Henderson & Eleftheriou 2000). Jedoch muss eine Sequenzübereinstimmung nicht gleichbedeutend mit einer funktionellen NES sein (Nakielny & Dreyfuss 1999). Desweiteren wurden einige Exportsignale ermittelt, welche beispielsweise für den Export von t-RNA oder den U snRNPs verantwortlich sind, und entsprechend ribonukleare Strukturen aufweisen (siehe dazu 1.3.6 und Abb.: 1.5).

### 1.3.4 Nuclear shuttling signals

Proteine, welche den Kernporenkomplex in beide Richtungen passieren müssen, können dies auf unterschiedliche Art und Weise gewährleisten. Zum einen besteht die Möglichkeit das Protein sowohl mit einer NLS als auch mit einer NES auszustatten, um diese Bewegungen zu ermöglichen. Hierbei wäre es jedoch in beide Richtungen von den entsprechenden Transportfaktoren abhängig. Die andere Möglichkeit wurde als erstes bei den hnRNP-Proteinen entdeckt und als NS-Signal (von Nuclear shuttling signal) bezeichnet. Das NS-Signal des hnRNP A1 besteht aus einer 38 AS langen Glycin und Aromaten reichen Sequenz und wird als M9-Domäne bezeichnet (Michael 1995). Der Transportvorgang unterscheidet sich entsprechend seiner absoluten Bidirektionalität dergestalt von den reinen Import- und

Export Prozessen, dass unter den gegebenen Umständen keine gerichtete Translokation mit Start- und Zielpunkt zu beobachten ist (Michael 2000).

### 1.3.5 Terminierung des Transportprozess: Der Ran - Zyklus

Das zur Familie der kleinen GTPasen zählende Ran (von Ras related nuclear protein) ist ein GTP bzw. GDP bindendes Protein mit einer ausgesprochen schwachen GTPase Funktion (Bischoff et al. 1994, 1995; Corbett et al. 1995; Richards et al. 1995). Der Wechsel von der GTP in die GDP bindenden Form und umgekehrt erfolgt daher durch unterschiedliche proteinäre Faktoren, welche zudem räumlich strikt voneinander getrennt vorliegen. Die  $\gamma$ -Phosphathydrolyse des GTP erfolgt im Cytoplasma, katalysiert über RanGAP (von Ran GTPase activating protein) und RanBP1 (von Ran binding protein 1), welche die an sich geringe GTP-Hydrolyse um das  $10^5$ fache erhöhen (Wu et al. 1995; Bischoff & Görlich 1997; Mahajan et al. 1997; Yokohama et al. 1995; Singh et al. 1999). Ran liegt somit im Cytoplasma in GDP gebundenen Form vor. Der Nukleotidaustausch erfolgt jedoch über RCC1 (von regulator of chromosome condensation 1), ein an Chromatin gebundenes und somit im Nukleoplasma lokalisiertes Protein. Auch in diesem Fall ist der Prozess erst durch den Aktivator um den Faktor 10.000 erhöht (Ohtsubo et al. 1987, 1989; Bischoff & Ponstingl 1991a+b; Klebe et al. 1995). Ran muss demnach um einen Zyklus zu durchlaufen den NPC zweimal durchqueren. Dadurch entsteht eine Art Gradient zwischen der GDP-Form von Ran im cytoplasmatischen Bereich des NPC und der GTP-Form im Nukleoplasma. Über diesen Gradienten orientieren sich etliche Import- bzw. Exportprozesse, wobei Ran GTP je nach Richtung die Assoziation bzw. Dissoziation von Transportsubstraten unterstützt (siehe Abb.: 1.4).

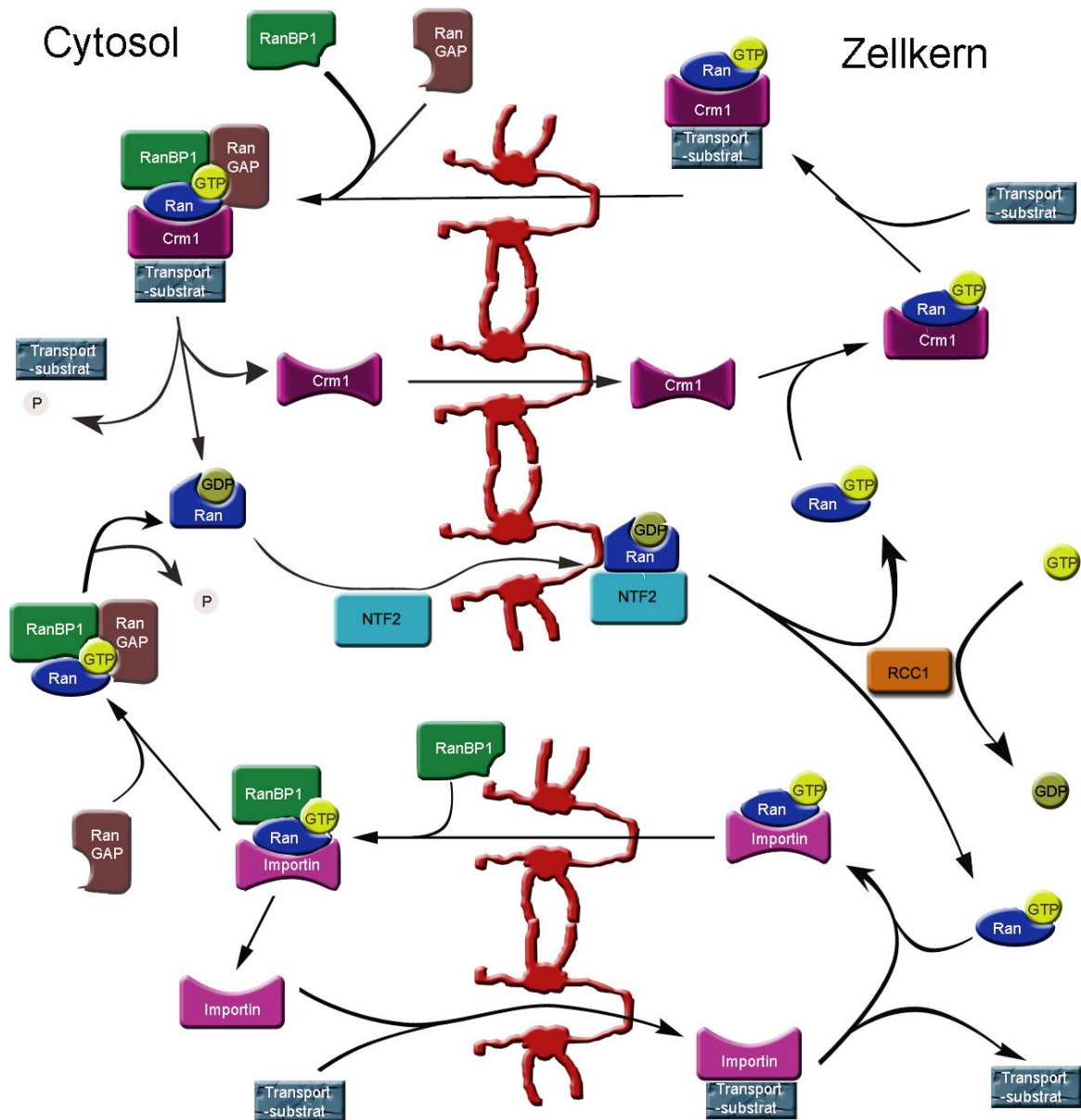
Bei Importprozessen sorgt die Bindung von RanGTP an den Transportrezeptor für dessen Dissoziation vom zu transportierenden Substrat und zu dessen Freigabe in das Nukleoplasma (Rexach & Blobel 1995; Ribbeck et al. 1999; Seedorf et al. 1999). Umgekehrt wird bei Exportrezeptoren die Assoziation zum entsprechenden Substrat über RanGTP ermöglicht, und erst dessen GTP-Hydrolyse über RanGAP/RanBP1 an den cytoplasmatischen Filamenten des NPC und der Dissoziation von RanGDP vom Exportrezeptor gibt das Transportsubstrat im Cytoplasma wieder frei (Fornerod et al. 1997; Cole & Hammell 1998). Damit dies nicht insgesamt zu einem Netto Export von RanGTP führt, was einen Zusammenbruch des angesprochenen Gradienten zur Folge hätte, wird Ran GDP über einen spezialisierten



Importfaktor NTF2 (von nuclear transport factor 1), einem Vertreter der FXFG-Motiv bindenden Proteine, vom Cytoplasma in das Nukleoplasma transportiert (Ribbeck et al. 1998; Smith et al. 1998; Bayliss et al. 1999). Hier erfolgt der Austausch von GDP zu GTP an Ran über RCC1, womit sich der Kreislauf letztlich schließt. Dieser Zyklus stellt eine Möglichkeit dar, wie sich der Transport über die Kernmembran terminieren lässt.

### 1.3.6 Transportrezeptoren: Die Importin $\beta$ Familie

Als Transportrezeptoren werden Proteine bezeichnet, welche auf der einen Seite unmittelbar mit der Kernpore in Kontakt stehen und auf der anderen Seite in der Lage sind, Transportsubstrate bzw. deren Mediatoren zu binden, um anschließend die Translokation zu gewährleisten. Je nachdem welche Richtung dabei eingeschlagen wird spricht man von Importinen oder Exportinen. Den meisten Transportrezeptoren ist zudem gemein, dass sie an ihrem N-Terminus ein RanGTP Bindemotiv und einen Isoelektrischen Punkt im Bereich von 4,6-5,9 aufweisen. Kristallstrukturen von Transportin und Importin  $\beta$  konnten zeigen, dass diese Proteine fast rein aus  $\alpha$ -Helices bestehen, welche mit sich wiederholenden, den HEAT oder Armadillo Wiederholungen ähnelnden, Motiven bestückt sind. Aufgrund der Vielzahl an Rezeptoren, in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden bisher 14 (Adam et al. 1999, Görlich & Kutay 1999, Wozniak et al. 1998) beim Menschen sogar schon 21 (Görlich & Kutay 1999) Vertreter der Importin  $\beta$  Familie identifiziert, unterscheiden sich auch die einzelnen Transportwege voneinander. Den Klassiker unter den Transportwegen stellt der Weg eines NLS haltigen Proteins vom SV40 T-Antigen Typ, vermittelt über das Importin  $\alpha/\beta$  Heterodimer, vom Cytosol in das Nukleoplasma dar. Hierbei dient das Importin  $\alpha$  über seine beiden funktionellen Domänen als Bindeglied zwischen dem zu transportierenden NLS haltigen Substrat und dem eigentlichen Transportrezeptor dem Importin  $\beta$ . Importin  $\alpha$  bildet mit dem NLS-Protein und Importin  $\beta$  einen relativ inerten Transportkomplex, welcher erst im Nukleus über die Bindung von RanGTP an Importin  $\beta$  dissoziiert (Chi et al. 1996, Görlich 1996c, Rexach & Blobel 1995). Die Bindung dieses Komplexes an Importin  $\beta$  erfolgt über eine Domäne des Importin  $\alpha$ , welche als IBB (von importin beta-binding) bezeichnet wird. Diverse Untersuchungen mit dieser IBB ergaben, dass es allein über ihre Assoziation an Importin  $\beta$  zu einer Translokation in den Nukleus kommen kann (Görlich et al. 1996a, Weis et al. 1996a). Dies impliziert zum einen, dass Importin  $\beta$  der für die Passage verantwortliche Faktor ist und zum anderen, dass Proteine, welche eine IBB-Domäne besitzen, direkt über Importin  $\beta$  in den Zellkern importiert werden können.



**Abbildung 1.4:** In dieser Darstellung ist der Ran-Zyklus explizit aufgeführt, um seine Bedeutung sowohl für den Import als auch den Export von entsprechenden Transportsubstraten zu veranschaulichen. Nähere Erläuterungen ergeben sich aus dem Text.

Als Proteine dieses Typs identifizierte man im Laufe der Zeit das HIV-Rev Protein (Henderson & Percipalle 1997, Truant & Cullen 1999), HIV-Tat Protein (Truant & Cullen 1999), das Protein Rex vom menschlichen T-Zell Leukämie Virus (Palmeri & Malim 1999), die ribosomalen Proteine L23a, L7 und S5 (Jäckel & Görlich 1998) und das Parathormon verwandte Protein (Lam et al. 1999). Die relative Vielfalt an Imports substraten, welche über Importin  $\beta$  in den Zellkern transportiert werden, wird noch deutlicher, wenn man in Betracht zieht, dass inzwischen sechs verschiedene Importin  $\alpha$  Subtypen und zudem die Proteine Snurportin 1, XRIP  $\alpha$ , Importin 7 und RanBP8 als potentielle Bindungspartner bekannt sind.

Die Importin  $\alpha$  Subtypen weisen starke Sequenzhomologien auf, und sind sich in ihrer Funktion absolut ähnlich. Sie binden über einen Arm, welcher mehrere NLS-Erkennungsmotive aufweist, sowohl die NLS vom Typ des SV40-Typ als auch die zweigeteilte NLS des Nukleoplasmin-Typs. Unterschiede unter den einzelnen Importin  $\alpha$  Vertretern existieren lediglich in der Affinität zu ihren speziellen Substraten und damit verbunden in ihrer Transporteffizienz (Köhler et al. 1999). Der Export in das Cytosol aller Importin  $\alpha$  Vertreter erfolgt über CAS (Kutay et al. 1997a?, Köhler et al. 1999b). Hierbei bindet Importin  $\alpha$  über eine relativ große Domäne (ca. 137 AS) hinweg an CAS (Herold et al. 1998), was eine erhebliche Spezifität der Bindung voraussetzt. Mutationen an dem Hefe Homolog Cse1p (Hood & Silver 1998, Kunzler & Hurt 1998) konnten zeigen, dass dieses Exportsystem für die Zelle absolut essentiell ist (Xiao et al. 1993).

Die bereits erwähnten U snRNAs (U1, U2, U4 und U5) der Splicisomen, werden im Nukleus über die Polymerase II gebildet und anschließend als Monomethylguanosin markierte ( $m^7G$ -capped) U snRNA in das Cytosol exportiert. Nach erfolgter Reifung im Cytoplasma, was neben der Assoziation mit den entsprechenden Sm-Proteinen auch die weitere Methylierung der Cap-Struktur zur  $m_3G$ -Struktur beinhaltet, werden die snRNPs in das Nukleoplasma reimportiert. Dieser Transportvorgang wird über Snurportin 1, welches anschließend an Importin  $\beta$  bindet, vermittelt (Huber et al. 1998). Das Protein XRIP  $\alpha$  dient als Adapter für RPA ( von replication protein A) an Importin  $\beta$  (Jullien et al. 1999).

Die Faktoren Importin 7, welches eigenständig für den Import von ribosomalen Proteinen verantwortlich ist (Jäkel & Görlich 1998), und RanBP8 bilden mit Importin  $\beta$  Heterodimere aus. Während man für den Importin 7/ Importin  $\beta$  Komplex das Histon H1 als Transportsubstrat ausmachen konnte (Görlich et al. 1997), bleibt die Funktion des RanBP8/ Importin  $\beta$  Heterodimers bisher völlig unklar.

Das Protein Transportin wurde als Importrezeptor für hnRNP-Proteine identifiziert (Polland et al. 1996, siehe auch 1.3.8). Das Signal, über welches die hnRNP-Proteine an Transportin binden ist bei hnRNP A1 eine ca. 38 AS lange glycinreiche als M9 bezeichnete Domäne, die lediglich eine, dafür aber essentielle basische AS beinhaltet (Bogert et al. 1999, Siomi & Dreyfuss 1995, Weighardt et al. 1995). Diese M9 Domäne scheint sowohl bei Import- als auch bei Exportprozessen eine Rolle zu spielen. Ebenfalls über Transportin erfolgt der Import des ribosomalen Proteins L23a, welches über eine stark basische Domäne, BIB genannt, an einen von der M9 Bindungsstelle entfernt liegenden Bereich des Transportins binden kann (Jäkel et al. 1999).

Ein für den Export von Proteinen erforderlicher Rezeptor der Importin  $\beta$  Familie stellt das CRM1 (von chromosome region maintenance) dar. Man fand heraus, dass dieses Protein eine gewisse Homologie zu Importin  $\beta$  aufweist, über CAN/Nup214 an den NPC bindet und sich über eine RanGTP Bindedomäne als Transportrezeptor zwischen Cyto- und Nukleoplasma pendelnd bewegt (Fornerod et al. 1997b, Görlich et al. 1997). Des Weiteren wurde gezeigt, dass als Erkennungsmerkmal für den Export eine NES (siehe 1.3.3) dient (Wolff et al. 1997), da sich der Export von HIV-Rev mit Leptomycin B, welches zuvor als CRM1 bindendes Antimycoticum identifiziert wurde (Nishi et al. 1994), hemmen ließ. Das Leptomycin B bindet kovalent an Cystein Reste von Crm1p und verhindert dadurch sowohl die Bindung von Ran als auch des Exportsubstrates (Kudo et al 1998 und 1999, Fornerod et al. 1997a, Fukuda et al. 1997). Da die Bindung von RanGTP und des Exportsubstrates einen stark kooperativen Prozess darstellen, wird die Funktion von CRM1 über Leptomycin B vollständig eliminiert. Die NES des Exportsubstrates sorgt nicht alleine sondern nur im proteinären Kontext für eine ausreichende Bindungsaffinität zu CRM1 und kann sogar, wie im Falle von Snurportin 1 völlig fehlen (Paraskeva et al. 1999). Diese Variabilität an Erkennungsmerkmalen ermöglicht es CRM1 den Export für eine Vielzahl von Substraten zu vermitteln.

Zum einen ist CRM1 dafür verantwortlich, dass die Asymmetrie des Ran Gradienten erhalten bleibt, indem es RanGAP und RanBP1 aus dem Nukleoplasma fernhält, zum anderen sorgt es dafür, den Zellkern von Aktin frei zu halten (Wada et al. 1998). Des Weiteren sorgt es dafür, dass für die Einleitung der Mitose mitverantwortliche Protein Cyclin B stetig in das Cytosol zurückzubefördern (Hagting et al. 1998, Toyoshima et al. 1998, Yang et al 1998). Erst in der Prophase wird dieser Export von Cyclin B gestoppt, was zu einer Akkumulation von Cyclin B/cdk2 Komplexen im Nukleus folgend zur Phosphorylierung von Chromatin gebundenen Proteinen und der Kernlamina und schließlich zur Auflösung der Kernmembran und zur Chromatinkondensation führt. Weitere Kandidaten deren Aufenthaltsort über CRM1 Export gesteuert wird, sind die Kinasen MAPK (Ferrigno et al. 1998) und MAPKAP Kinase 2 (Engel et al. 1998), die Transkriptionsfaktoren NFAT (Kehlenbach et al. 1998) und AP-1 (Kuge et al. 1998, Yan et al. 1998) und der Tumorsuppressor p53, welcher über den verstärkten Export und cytosolischen Abbau in seiner Wirkung kontrolliert wird (Freedman & Levine 1998, Strommel et al. 1999). Die U snRNA müssen bevor sie im Cytoplasma weiter prozessiert erst in dieses transportiert werden. Die m<sup>7</sup>G-Cap Struktur der RNAs wird von den Proteinen CBP20 (von cap binding protein 20 kD) und CBP80 erkannt, welche sich dort zu einem Komplex anlagern (CBC, von cap binding complex).

Dieser Komplex wiederum bindet auf bisher unbekannte Weise an CRM 1 und wird dann darüber exportiert (Fischer et al 1991, 1993, 1995, Fischer & Lührmann 1990, Fornerod et al. 1997a, Hamm & Mattaj 1990).

### 1.3.7 Export von tRNA

Die Synthetisierung und weitest gehend auch die Modifizierung der tRNA, wie die Veränderungen am 3' und 5' Ende der RNA oder an einzelnen Nukleotiden, der post-transkriptionalen Addition der 3' Endsequenz CCA und die Eliminierung kleiner Introns (Wolin & Matera 1999), findet im Nukleus statt (Clark & Abelson 1987, Peebles et al. 1983, Wolin & Matera 1999). Auch hier stellt die vollständige Reifung der tRNA ein Kriterium für deren späteren Transport in das Cytoplasma dar (De Robertis et al. 1981, Melton et al. 1980, Tobian et al 1985). Die Untersuchungen des tRNA Exports haben viel zum allgemeinen Verständnis anderer Exportarten beigetragen. So war der tRNA Export der erste, der sich über das Angebot an spezifischen Transportsubstraten sättigen ließ (Zasloff et al 1983, Jarmolowski et al 1994). Weitere Untersuchungen konnten zeigen, dass der Export von tRNA auch von einem funktionierendem RanGTP-Zyklus abhängig ist (Izaurrealde et al 1997). Dies legte die Vermutung nahe, dass es sich bei dem gesuchten Rezeptor um einen Vertreter der Importin  $\beta$  Familie wie CAS oder CRM1 handeln könnte. Schließlich identifizierte man den Rezeptor Exportin-t (Kutay et al 1998), welcher zum entsprechenden Rezeptor in der Hefe *S.Cerevisiae* Los1p homolog ist (Arts et al 1998 a). Exportin-t ist zudem der einzige bekannte Rezeptor, der die zu transportierende RNA direkt zu binden vermag (Arts et al 1998 a + b, Kutay et al 1998, Lipowsky et al 1999). Der Mechanismus verläuft dabei genauso wie unter 1.3.5 in Verbindung mit dem Ran-Zyklus gezeigt (Kutay et al 1998). Die Bindung der tRNA an Exportin-t erfolgt über den T $\psi$ C-Bogen und über den Akzeptorarm (Arts et al 1998b). Neben der sekundär und tertiär Struktur der tRNA sind auch alle bereits angesprochenen Modifikationen bis auf das Splicing für die Bindung an den Rezeptor relevant (Arts et al 1998b, Kutay et al 1998, Lipowsky et al 1999, Lund & Dahlberg 1998). Der Transportprozess bildet auch hier den entscheidenden Kontrollpunkt für die Entlassung funktionsfähiger tRNAs in das Cytoplasma. Wie aber wird das korrekte Splicing der tRNA kontrolliert, um zu vermeiden, dass unvollständig oder gar ungesplice tRNA im Cytoplasma akkumuliert? Eine Möglichkeit der Erklärung bietet eine Entdeckung in *Xenopus* Oocyten, bei denen die 5' Modifizierung erst nach erfolgreichem Splicing erfolgt. Und da die 5' Modifizierung wiederum zu den benötigten Kriterien für die Bindung an den Exportin-t Rezeptor gehört, ist

das korrekte Splicing in dieser Erkennung gewissermaßen mit inbegriffen (Lund & Dahlberg 1998).

Die Tatsache das Los1p (von loss of suppression (Hopper et al 1980)) die gleichen Auswirkungen zeigt wie Exportin-t spricht dafür, dass es sich in der Tat um das entsprechende Homolog aus *S.cerevisiae* handelt. Das Fehlen von Los1p ist für Hefen jedoch nicht letal, was entweder darauf schließen lässt, dass es einen weiteren Transportweg gibt, oder das die reine Diffusion durch die Kernpore, denn die tRNA liegt größtmäßig unter der Diffusionsbeschränkung, ein Überleben der Hefezelle sicher stellen kann (Hurt et al 1987).

### 1.3.8 Export von mRNA

Die mRNA wird in Form eines Protein-RNA-Komplexes den sogenannten hnRNPs (von heterogenous nuclear ribonucleo particle) aus dem Zellkern exportiert. Der Größe und Komplexität dieser Gebilde, gegenüber zuvor diskutierten Substraten der Importin  $\beta$ -Familie, wird mit entsprechender Komplexität beim Transportsystem Rechnung getragen. Entsprechend wenig weiß man bisher auch über diesen Prozess.

Die hnRNP Proteine stellen die größte Fraktion der hnRNA bindenden Proteine dar, wobei man zwischen den großen hnRNP Proteinvertretern, die als hnRNP A-U klassifiziert sind, und etlichen kleineren hnRNP Proteinen unterscheidet (Dreyfuss et al. 1993). Inzwischen unumstritten ist, dass diese Proteine entscheidenden Einfluss auf die Reifung und den Export der mRNA haben. Da die proteinäre Zusammensetzung der hnRNPs je nach mRNA, und zudem auch während des Reifeprozesses variiert, ist es äußerst schwierig genaue Angaben über die Beteiligung einzelner hnRNP Proteine beim Export zu machen. Einige hnRNP Proteine, so zum Beispiel das hnRNP C, müssen vom RNP entfernt werden, bevor der Export stattfinden kann (Nakielny & Dreyfuss 1996). Andere wiederum, wie hnRNP A1, E oder K, begleiten den Komplex auf seinem Weg ins Cytoplasma (Pinol-Roma & Dreyfuss 1992, Daneholt 1997) und müssen anschließend in den Nukleus reimportiert werden. In jedem Fall sollte die mRNA vor ihrem Übertritt in das Cytosol komplett ausgereift sein. In erster Linie kommt dafür wohl der Splicingapparat in Frage, der die mRNA solange zurückhält, bis keine Introns mehr in ihr vorzufinden sind (Grüter et al. 1998). Diese Tatsache stellt die Retroviren vor ein Problem, da sie ihre RNA als Genom für den Zusammenbau des Virus ungespliced in das Cytosol retten müssen. Das HI-Virus umgeht diese Gefahr, indem es über RRE (von Rev response element), eine cis-agierende RNA, das eigene REV-Protein bindet, und darüber

das CRM1-System nutzt, um unbeschadet ins Cytoplasma zu gelangen (Fornerod et al. 1997, Fukuda et al. 1997). Andere Retroviren, wie MPMV (mason-pfizer monkey virus), bedienen sich des CTE (von constitutive transport element), um darüber zelleigene Exportsubstrate zu binden, um in das Cytosol zu gelangen (Ernst et al. 1997, Bray et al. 1994). Interessant dabei ist auch, dass sich über CTE die zelleigene mRNA Exportrate deutlich reduzieren lässt, was dazu führt, dass man dieses RNA-Element als mögliches Exportelement für die zelleigene mRNA diskutiert (Pasquinelli et al. 1997, Saavedra et al. 1997). Als humanes CTE bindendes Protein wurde TAP, ein homologes Protein zu Mex67p aus der Hefe, identifiziert. Dieses Protein bindet CTE beinhaltende RNA direkt, wird zusammen mit der RNA exportiert und nachher über Transportin wieder reimportiert (Braun et al. 1999, Cullen et al. 1999). Der Transportvorgang ist dabei jedoch weiter unklar.

Erst seit einiger Zeit konnte man Proteine des NPC identifizieren, die unmittelbar mit dem mRNA Transport in Verbindung stehen. Diese Proteine wurden erkannt, da spezielle Antikörper gegen sie einen direkten Effekt auf den mRNA Export zeigten. In der Hefe *S. cerevisiae* sind dies Rat7p/Nup159p (Belgareh et al. 1998), Rat3p/Nup133p (Doye et al. 1994, Li et al. 1995, Pemberton et al. 1995), Rat2p/Nup122p (Aitchison et al. 1995, Heath et al. 1995), Nup116p (Bailer et al. 1998, Wentz & Blobel 1993), Rat9p/Nup85p (Goldstein et al. 1996, Siniosoglou et al. 1996), und Nup145p (Fabre et al. 1994, Teixeira et al. 1997, Wentz & Blobel 1994).

In höheren Eukaryoten identifizierte man Nup98 (Powers et al. 1997, Pritchard et al. 1999), Nup153 (Bastoe et al. 1996, Ullman et al. 1999) und TPR (Bangs et al. 1998).

Im Gegensatz zu RRE haltigen RNAs steht der Transport von mRNA auch in Verbindung zu Transportrezeptoren der Importin  $\beta$  Familie. Da zudem ein intaktes RanGTPase System für den Export der meisten mRNAs von Nöten ist, spricht vieles dafür, dass der Transport über Ran regulierte Exportine gewährleistet wird (Amberg et al. 1992 und 1993, Cheng et al. 1995, Forrester et al. 1992, Izauralde et al. 1997, Kadowaki et al. 1992 und 1993, Schlenstedt et al. 1995 a+b). In der Hefe *S. cerevisiae* konnten bisher fünf Vertreter der Importin  $\beta$  Familie herausgestellt werden, denen ein mittel- oder unmittelbarer Einfluss auf den mRNA Export zugesprochen werden konnte.

Dies sind im einzelnen Mtr10p (Kadowaki et al. 1994) Crm1p (Stade et al. 1997), Pse1p, Yrb4p/Kap123p und Sxm1p (Seedorf & Silver 1997).

In allen Fällen liefert die Literatur bis dato kein eindeutiges Bild über ihre genauen Aufgaben bei der Translokation der mRNA über die Kernmembran.

Dafür gibt es andere Komponenten deren Einfluss sich deutlicher abzeichnet. Mex67p ist ein in der Hefe *S.cerevisiae* gefundener Faktor (Segref et al 1997), der unmittelbar mit dem polyA-Schwanz der gereiften mRNA und einigen RNA bindenden Proteinen interagiert. Ein weiterer Faktor ist das Mtr2p ein ebenso essentielles Protein, welches mit Mex67p einen Komplex bildet (Santos-Rosa et al 1998, Kadowaki et al 1994). Ein möglicher Bindungspartner für diesen Komplex im NPC ist das Nup85p (Santos-Rosa et al 1998). Auch für das humane Homolog zu Mex67p TAP interagiert mit Bestandteilen des NPC etwa mit CAN/Nup214, Nup153p oder Nup98p (Katahira et al). Außerdem konnte die Bindung von p15 an TAP nachgewiesen werden (Katahira et al 1999), welches sich in der Aufgabe mit dem Hefe Mtr2p vergleichen ließe.

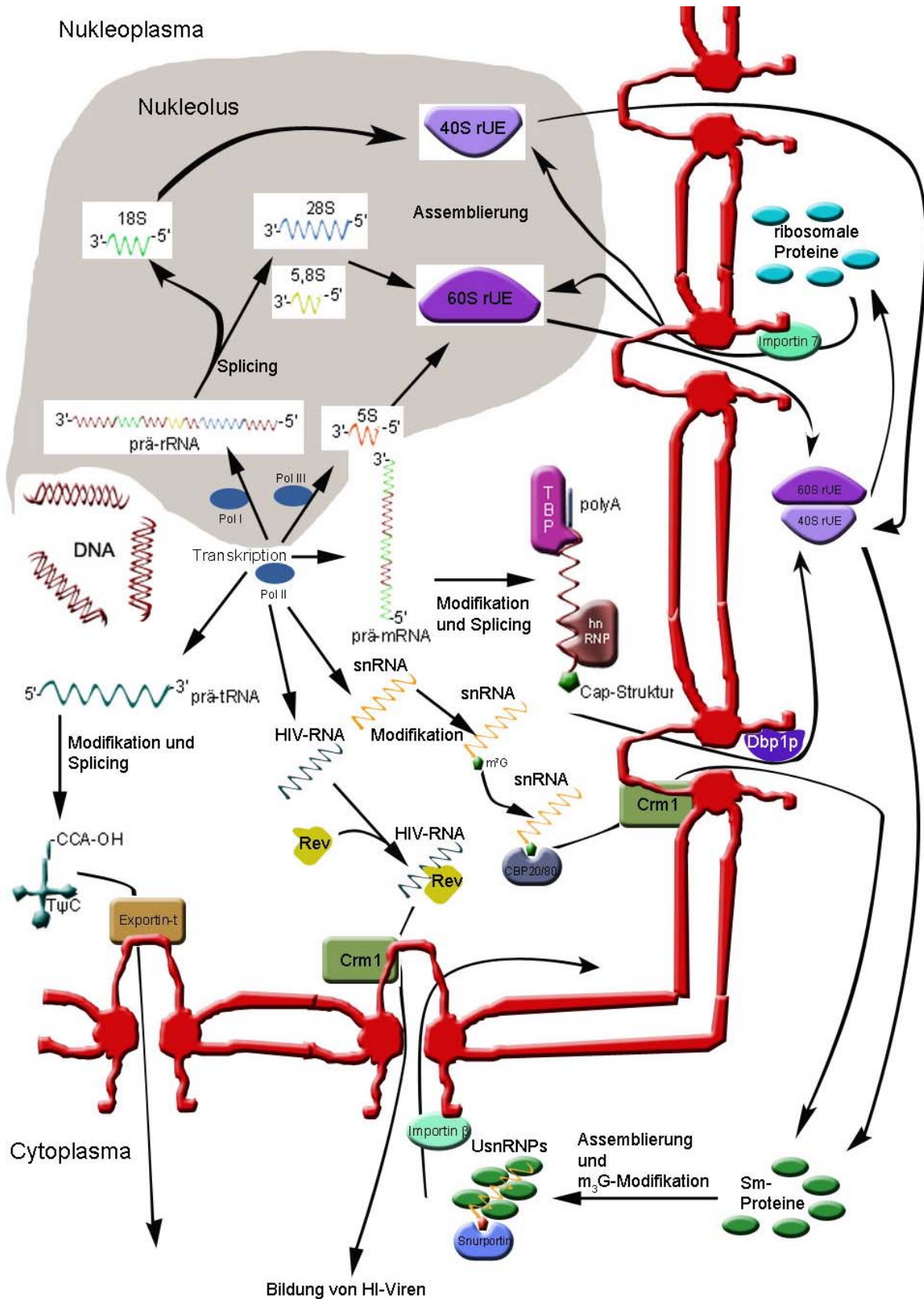
Das ebenfalls in der Hefe entdeckte Gle2p ist am Transport von polyA mRNA direkt beteiligt, ohne für die Zelle essentiell zu sein (Murphy et al 1996). Gle2p bindet über ein sogenanntes GLEB-Motiv direkt an Nup116p oder das Vertebraten Nup98p (Bailer et al 1998). Das humane Homolog Rae1p bindet ebenfalls an poly(A) RNA (Kramer & Blobel 1997) und pendelt zwischen Nukleo- und Cytoplasma (Pritchard et al 1999).

Ein weiterer Vertreter ist das Rss1p oder Gle1p, welches am NPC assoziiert und lokalisiert werden konnte. Zudem konnte der Export von mRNA durch spezifische Antikörper gegen das Protein gehemmt werden (Watkins et al 1998).

Desweiteren konnten hnRNP Proteine identifiziert werden, die direkt mit Komponenten des NPC in Kontakt treten können. Dies ist zum einen hnRNP A1, welches über eine M9 Domäne interagiert und hnRNP K, das über die KNS Domäne mit dem NPC in Kontakt tritt (Michael et al 1995 und 1997).

Letztlich lässt sich noch Dbp5p/Rat8p, eine DEAD-box, ATP abhängige RNA-Helikase anführen. Dbp5p ist verstärkt am NPC lokalisiert (Snay-Hodge et al 1998) und bindet dort an Nup159p/Rat7p bei der Hefe oder an CAN/Nup214 in Vertebraten (Schmitt et al 1999). Mutationen von Dbp5p führen zur Akkumulation von poly(A) RNA im Nukleus, zudem ist die ATP-Hydrolyse für das Protein essentiell (Schmitt et al 1999).





**Abbildung 1.5:** In dieser Grafik sind alle auch im Text erwähnten RNA-Transportprozesse gesammelt aufgeführt, um auch das Zusammenspiel der Komponenten erkennen zu können. Es wird dabei deutlich, dass bei allen RNA-Typen der Beginn des Transports immer mit dem Abschluss der vorangegangenen Modifikationen einhergeht. Für den Export der ribosomalen Untereinheiten wird zurzeit ebenfalls über Crm1 als möglicher Mediator diskutiert. In der Hefe soll das Protein Nmd3p für die Kontaktherstellung zwischen Crm1 und den 60S rUE verantwortlich sein (Ho et al. 2000). Weitere Erklärungen erfolgen im Context.

### 1.3.9 Export von ribosomalen Untereinheiten

Die Ribosomen der eukaryotischen Zelle bestehen aus einer 40S- und einer 60S-Untereinheit. Die kleiner 40S rUE besteht aus einer 18S rRNA, welche, mit 33 Proteinen assoziiert, eine Gesamtmasse von 1400 kD aufweist. Die 60S rUE besteht hingegen aus drei verschiedenen rRNAs, der großen 28S rRNA, welche mit der kleineren 5,8S rRNA direkt verbunden ist und der 5S rRNA. Zusammen mit den 49 Proteinen ergibt sich eine Gesamtmasse für diese Untereinheit von 2820 kD. An der Biosynthese der Untereinheiten sind alle bekannten RNA Polymerasen beteiligt. So werden die 28S, die 18S und die 5,8S rRNA von der RNA Polymerase I als ein Transkriptionsprodukt synthetisiert, welches nachher in die einzelnen RNAs gesplittet wird. Die RNA Polymerase II transkribiert die mRNA für die ribosomalen Proteine, während die Polymerase III die 5S rRNA herstellt. Während die Proteine nach ihrer Biosynthese im Cytosol in den Nukleus importiert werden müssen, werden die RNA Bestandteile im Nukleolus prozessiert (siehe Abb.: 1.5).

Dort werden die ribosomalen Untereinheiten dann zu funktionalen Komplexen assembliert (Scheer und Hock 1999, Venema und Tollervey 1999, Warner 1990). Dieser Vorgang ist bisher noch kaum verstanden. Fest steht jedoch, dass der Transport der Untereinheiten in das Cytosol erst nach ihrer kompletten Genese erfolgt (Rosmus 2000). Der Weg von den Nukleoli an die Kernporenkomplexe erfolgt über klar definierte Wege durch das Nukleoplasma (Leger-Silvestre 1997 & 1999).

Vom Transport durch die Kernpore selber ist bisher nur allzu wenig bekannt. Definitiv ist die Tatsache, dass der Transport sowohl temperatur- als auch energieabhängig ist und über Transportmediatoren bewerkstelligt wird (Bataille et al 1990). Die Biogenese der rUE benötigt ein funktionierendes Ran System. Experimente die beispielsweise den Nukleidaustausch von Ran unterbinden, konnten zeigen, dass die rRNAs nach ihrer Synthese nicht weiter prozessiert werden (Cheng et al 1995 Hopper & Banks 1978, Kadowaki et al 1993, Petersen & Nierlich 1978). Dieser Effekt ist wohl darauf zurückzuführen, dass die benötigten Proteine, welche die Prozessierung gewährleisten, nicht importiert werden können. Daher sind auch alle bisher ermittelten NPC Bestandteile, welche aus einem in vivo System heraus resultieren, wie zum Beispiel Nup82 für den Transport von 40S rUE (Moy & Silver 1999) oder Nup49p und Nsp1p für die 60S rUE (Hurt et al. 1999), mit Vorsicht zu genießen. Man muss auch hier stets vermuten, dass diese Mutanten eher über den Proteinimport einen Einfluss auf die Ribosomenbiogenese nehmen, da sich beide Prozesse in einem in vivo System, wie es die Hefe darstellt, nicht voneinander entkoppeln lassen.

Bisher gibt es daher kaum einen Hinweis auf irgendeinen Mediator der den Export der 60S ribosomalen Untereinheiten auf die eine oder andere Weise zu beeinflussen versteht. Als relativ gesichert gilt die Annahme, dass CRM1 als möglicher direkter Exportfaktor ausscheidet, da weder ein Überangebot an CRM1 spezifischen Exportsubstraten (Fischer et al 1995) oder die Komplexierung des Rezeptors mit dem spezifischen Inhibitor Leptomycin B (Rosmus 2000) noch eine CRM1 Mangelmutante (Hurt et al 1999) einen Einfluss auf den Ribosomen Export aufzeigen. Das Lektin WGA (wheat germ aglutinin) kann den Exportprozess komplett lahm legen (Bataille et al 1990).

Der Transport von 40S und 60S rUE läuft nicht unabhängig von einander (Khana-Gupta & Ware 1989). Coinjektionen von 40S rUE, aber auch von tRNA reduzieren die Exportrate von 60S rUE, was dafür spricht, dass zumindest teilweise die gleichen Bindungsstellen auf dem Transportweg benötigt werden. Zudem konnte gezeigt werden, dass sich die Exportrate von 60S rUE in Oocyten über die Verfügbarkeit freier cytosolischer 40S rUE beeinflussen lässt (Rosmus 2000). Diese Effekte zeigen zumindest, dass ein Einfluss auf den Export der 60S rUE von der cytosolischen Seite durchaus besteht.

Auf dieser Basis wurden in den letzten Jahren einige Details erörtert, die sich irgendwann zu einem Ganzen zusammensetzen könnten. So konnte gezeigt werden, dass sich die Exportrate über das Vorhandensein cytosolischer Faktoren steuern lässt (Hassel et al 1996). Eine genauere Fraktionierung des Cytosols und die Beschränkung auf wenige Proteine pro Fraktion ergaben, dass sich der größte Effekt bei der Fraktion einstellte, deren Hauptbestandteil sich nachher als Hsp90 herausstellte (Schlatter 1997).

#### **1.4 Hitzestressproteine und ihre zelluläre Funktion**

Hitzestressproteine können in vier Klassen unterteilt werden. Kriterien für diese Klassifizierung sind zum einen die molekulare Größe und zum anderen die sequenziellen Homologien. Die erste Klasse machen die kleinen Hsps (entsprechend sHsps von small heatshock proteins) mit einem Molekulargewicht von 15-32 kDa. Die zweite Klasse umfasst die Hsp70 Familie die dritte die der Hsp60 Verwandten und schließlich noch die Vertreter der Hsp90 Familie, welche homologe Proteine in den Bereichen von 69 kDa (HtpG bei *E.coli*) und 90 kDa (menschliches Hsp90) umfasst. Alle vier Klassen funktionieren als molekulare Chaperone. In dieser Funktion sind sie für die Darstellung und Erhaltung der korrekten Proteinfaltung verantwortlich und sollen die Bildung von Proteinaggregaten bei Zellstress verhindern. Über die bevorzugte Bindung an exponierte eher hydrophobe Seitenketten werden

partielle proteinäre Denaturierungen erkannt und dadurch der zellulären Schädigung bei unphysiologischen Bedingungen entgegengewirkt (Hendrick & Hartel 1993; Netzer & Hartel 1998; Feldman & Frydman 2000).

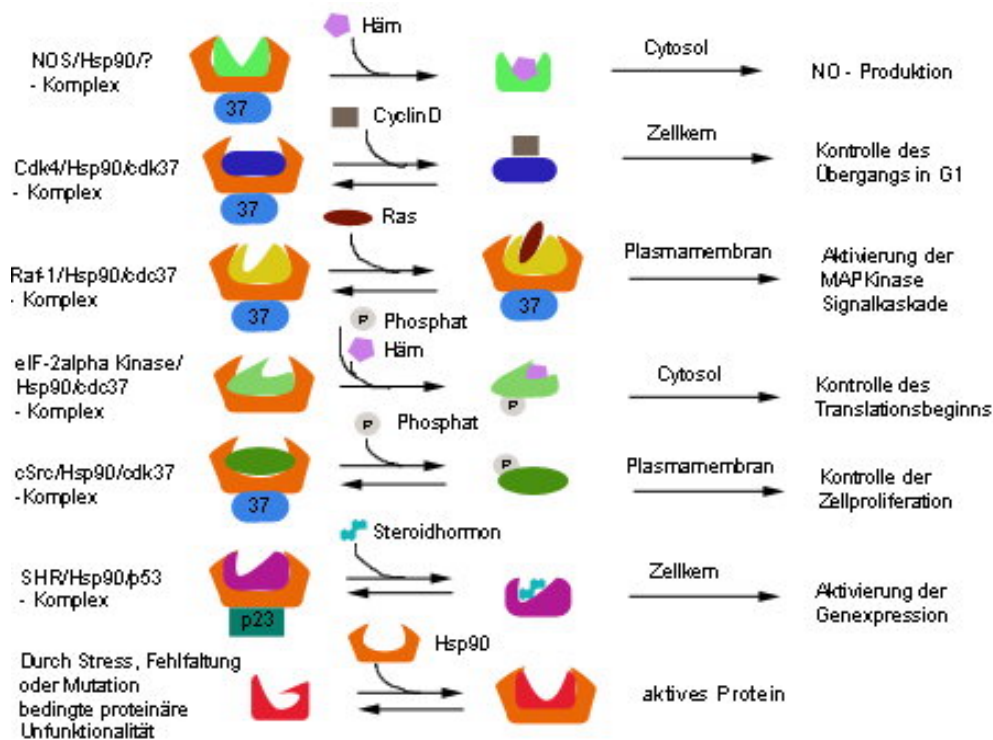
Auch Transportvorgänge sind für die betroffenen Proteine Stresssituationen, da man von leichten Schädigungen bis hin zur völligen Denaturierung der Proteine, z.B. bei der Translokation über die Mitochondrienmembran, alle Eventualitäten, bei denen die Unterstützung der Hitzestressproteine gefordert ist, antrifft. Im Kerntransport ist der Einfluss der Hitzestressproteine bisher noch nicht so bewusst in Erscheinung getreten. Lediglich von Hsp/Hsc70, Hsc70 stellt die konstitutive während Hsp70 eine unter Stressbedingungen exprimierte Variante darstellt, ließ sich zeigen, dass deren Überexpression in der Hefe *S.cerevisiae* Defekte im NLS bindenden zu Importin  $\alpha$  homologen Hefeprotein scSRP1 auszugleichen vermag (Shulga et al. 1996). Zudem ließ sich der NLS abhängige Proteinimport über anti Hsc70 Antikörper, welche in Oocyten koinjiziert wurden, inhibieren (Imamoto et al. 1992). Hsp/Hsc70 wurde des weiteren bei Hitzestress verstärkt im Zellkern detektiert (Welsch & Feramisco 1984). Letztlich wird Hsp/Hsc70 nach überstandener Stresssituation wieder in das Cytoplasma transportiert (Velaquez & Lindquist 1984; Welsch & Mitzen 1988). Ein definierter Einfluss auf Kerntransportvorgänge konnte dem Protein bisher jedoch nicht zugeschrieben werden. Analog dazu konnte jedoch eine direkte Beteiligung von Hsp/Hsc70 an Transportprozessen der mitochondrialen Membran und der Membran des ER nachgewiesen werden (Chirico et al. 1988). Anderes lässt sich im Zusammenhang mit dem Kerntransport von einem anderen Vertreter der Hitzestressproteine dem Hsp90 behaupten.

#### **1.4.1 Das Hitzestressprotein 90 (Hsp90)**

Hsp90 stellt ein für die Eukaryoten absolut essentielles Protein dar, während *E.coli* HtpG Mangelmutanten unter normalen Bedingungen überleben können (Mayer & Bukau 1999). Hsp90 lässt sich in drei Teilabschnitte differenzieren. Vom N-Terminus, der ca. die ersten 200 AS umfasst und dessen Kristallstruktur bekannt ist besitzt eine Bindungsstelle für ATP und Geldanamycin (Prodromou et al. 1997; Pearl & Prodroumou 2000). Hsp90 verfügt über einen in etwa doppelt so großen C-Terminus, von dem bisher lediglich bekannt ist, dass er neben der Dimerisierungssequenz auch eine Sequenz für die Interaktion mit weiteren Proteinen, in erster Linie weiteren Chaperonen, eine 34 AS große TPR-Domäne (von tetratricopeptide repeat-domain) besitzt. Eine Strukturanalyse vom C-Terminus steht bisher

noch aus. Zwischen beiden Termini ist eine geladene Zwischendomäne eingeschoben, welche je nach Spezies unterschiedlich lang ausfallen kann. Dieses Zwischensegment scheint maßgeblich für die hohe Flexibilität des Proteins verantwortlich zu sein.

Hsp90 ist bis zu einer Temperatur von 50°C stabil und auch eine partielle Denaturierung durch Guanidiniumchlorid ist reversibel (Jacob et al. 1995). Die Oligomerisierung ist nicht essentiell, wird durch die Anwesenheit zweiwertiger Kationen im milimolaren Bereich ausgelöst, und stellt einen schnellen Verlauf dar. Durch Zugabe von  $Mg^{2+}$  und  $Mn^{2+}$ -Ionen konnte eine deutliche Veränderung in der quartären Struktur von Hsp90-Komplexen festgestellt werden. Bei einer  $Ca^{2+}$  Konzentration von 5 mM wird die Dimer- bzw. Oligomerbildung deutlich präferiert (Langer 2001). Die physiologisch aktive Einheit von Hsp90 bildet dessen Dimer. Das Funktionsprinzip folgt einer Klammer bei der die beiden C-Termini der Hsp90-Moleküle über die Dimerisierungssequenz miteinander assoziieren, und die beiden N-Termini in Abhängigkeit von ATP zueinander in Kontakt treten können, um ein gebundenes Proteinmolekül regelrecht zu umfassen. Sowohl Bindung als auch Hydrolyse von ATP sind für die Funktion von Hsp90 essentiell (Mayer & Bukau 1999).



**Abbildung 1.6:** Aufgeführt sind einige der bisher bekannten und gut charakterisierten Aufgaben von Hsp90. Hier zeigt sich, dass auf der einen Seite die Varianz an potentiellen Substraten zwar recht groß, das Schema der jeweiligen Assoziation aber recht ähnlich ist, und meistens über Mediatoren wie p23 und cdk37 ermöglicht wird.

Die Vertreter der Hsp90 Familie sind mit einem Anteil von 2% an der Gesamtproteinmenge mit die am häufigsten exprimierten Proteine in eukaryotischen Zellen. Zudem lässt sich Hsp90 in beinahe allen Bereichen der Zelle nachweisen, ohne dass sich bisher eine Erklärung sowohl für die Expressionsrate als auch für das ubiquitäre Auftreten finden ließ. Hsp90 bildet mit einer ganzen Reihe von Proteinen Komplexe, welche in vielen Bereichen der Zelle eine Rolle spielen. Eine zentrale Rolle spielt Hsp90 bei der Bewahrung der funktionalen Eigenschaften ligandenfreier Steroidrezeptoren im Cytosol. An diesem Komplex sind mit Hsp70 und Hsp40, der Prolyl-Isomerase FKBP52, die Proteine Hip und Hop weitere Proteine beteiligt. Die Affinität der Rezeptoren zu den Steroidhormonen wird durch Hsp90 deutlich erhöht. Nach Bindung des Liganden begleitet Hsp90 den Rezeptor-Liganden-Komplex entlang des Cytoskeletts in den Zellkern, wo der Komplex als Transkriptionsfaktor fungiert (Yang & DeFranco 1996; Mijata & Yahara 1991; Pratt 1993). Auch an der Dissoziation des Hormonrezeptors von der DNA scheint Hsp90 involviert zu sein.

Eine ähnliche Rolle spielt Hsp90 auch in der Signaltransduktion. Auch hierbei werden Proteine in diesem Fall Kinasen gebunden, um ihre Funktionalität zu stabilisieren. Zu diesen Kinasen zählen die Tyrosinkinase Src und Wee1, die Serin/Threonin-Kinasen Raf1 und Mek die Cyclin abhängige Serin/Threonin-Kinase Cdk4 (von cyclin deependent kinase) und die Häm abhängige eIF-2 $\alpha$ -Kinase (Pratt 1997; Mayer & Bukau 1999). Für die Rückfaltung denaturierter Proteine benötigt Hsp90 die Proteine Hsp70 und dessen Cochaperon Hsp40 (Mayer & Bukau 1999). Auch für die Aktivität der NO-Synthase zeigt sich Hsp90 verantwortlich (Garcia-Cardena et al. 1998). Trotz der Vielfalt möglicher Bindungspartner ist die jeweilige Bindung hochgradig spezifisch. So bindet die celluläre Kinase-Variante cSrc der Src-Familie Hsp90 in stärkerem Maße als der virale Vertreter vSrc.

In vielen Fällen geht Hsp90 über Mediatoren, um den Kontakt zu den Bindungspartnern herzustellen, etwa über p23 bei Steroidrezeptoren oder über Cdc37/p50 bei den Kinasen.

Ein weiterer sehr interessanter Aspekt von Hsp90 wurde von Rutherford und Lindquist (Rutherford & Lindquist 1998) beschrieben, die feststellten, dass die homozygote Mutation von Hsp90 zu einer Vielzahl von leichten Abnormalitäten bei *Drosophila melanogaster* führt. Dies macht die Multifunktionalität von Hsp90 insbesondere in der Strukturhaltung von Proteinen besonders deutlich, und verleiht der genetischen Entstehung und der daraus resultierenden phenotypische Ausprägung von Mutationen eine ganz neue Dimension (McLaren 1999).

Vor einiger Zeit konnte für Hsp90 eine völlig neue Funktion beschrieben werden. Auf der Suche nach cytosolischen Faktoren in Bezug auf den Export von 60S rUE, kristallisierte sich ein Protein als besonders wirkungsvoll heraus, welches später als Hsp90 identifiziert wurde (Schlatter 1997). Inzwischen sind einige Indizien an das Tageslicht getreten, welche diesen Effekt näher zu charakterisieren versuchen.

## **1.5 Zielsetzung**

Diese Arbeit soll den Einfluss von Hsp90 auf den Kerntransport weiter verifizieren und über Quervernetzungsstudien eventuelle Bindungspartner von Hsp90 im Bereich des Kernporenkomplexes identifizieren.

## **2. Ergebnisse**

### **2.1 Isolierung von Zellkernen aus Rattenhepatocyten**

Die Isolierung erfolgte nach einer von Riedel und Fasold (Riedel und Fasold 1987) modifizierten Methode von Blobel und Potter (Blobel & Potter 1966). Hierzu wurde den frisch geschlachteten Sprague-Dawley-Ratten die Leber entnommen und diese mechanisch zerkleinert und aufgeschlossen. Das Homogenisat wurde durch Gaze filtriert, um Restgewebe zu entfernen. Durch eine sachte Zentrifugation werden die Zellorganellen, Zelltrümmer und andere schwer löslichen Bestandteile gegenüber den cytosolischen und interstitialen Bestandteilen sedimentiert. Der Überstand kann der Isolierung von Hsp90 zugeführt werden (siehe 2.4). Das resuspendierte Pellet wird auf ein Saccharosekissen gegeben, welches die Zellkerne mittels Ultrazentrifugation aufgrund ihrer wesentlich höheren Dichte von allen weiteren Bestandteilen trennt. Die Kerne wurden anschließend mehrmals gewaschen und die Ausbeute schließlich über eine OD<sub>260</sub> bestimmt. Im Schnitt ergaben die Lebern von vier Ratten 700-800 OD Kerne. Eine OD<sub>260</sub> entspricht einer Kernproteinmenge von 66 µg (Langer 1996). Zusätzlich wurde die Qualität der Kerne unter dem Lichtmikroskop routinemäßig überprüft.

### **2.2 Darstellung von Kernhüllenvesikel aus Rattenleberzellkernen**

Auch diese Präparation folgte einer von Riedel und Fasold (Riedel & Fasold 1987) modifizierten Methode, welche wiederum auf der Arbeit von Bornens und Courvalin (Bornens & Courvalin 1978) basiert.

Die Kerne werden in calciumfreiem, leicht hypotonem Medium aufgeschlossen und die DNA durch Zugabe von Heparin oder DNase aus diesen verdrängt bzw. abgebaut. Die Membranhüllen werden über eine sich anschließende Zentrifugation vom Medium getrennt. Das Pellet wird in möglichst wenig hypotonem Puffer resuspendiert und die so erhaltene Suspension mit radioaktiv markierten Ribosomen versetzt. Nach kurzer Inkubationszeit erfolgt die Wiederversiegelung der Kernhülle durch Zugabe von Saccharose und Calcium. Die Vesikel werden bei 4°C mehrmals gewaschen, um nicht eingeschlossene 60S rUE zu entfernen.



Es konnte gezeigt werden, dass die so erstellten Vesikel nach der Präparation dicht, von der Membran aus richtig herum orientiert und über einen längeren Zeitraum hinweg stabil sind (Schlatter 1997, Riedel et al. 1987).

### **2.3 Isolierung von 60S rUE aus Rattenhepatocyten**

Der mechanische Aufschluss des Lebergewebes erfolgte in einem Puffer, welchem das Detergens Triton X-100 und das Polyanion Heparin zugesetzt wurde. Hierüber wird die Ablösung der Ribosomen von den Membranen und der freien mRNA forciert. Über einen Zentrifugationsschritt werden alle nicht löslichen Bestandteile aus dem Homogenisat entfernt und beim Überstand anschließend die Magnesium-Ionen Konzentration von 5 auf 105 mM erhöht, um die Ribosomen aus dem Lösungsmittel zu verdrängen. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde bei 4°C sind die Ribosomen quantitativ gefällt und wurden dann mittels Ultrazentrifugation aus der Lösung über ein 40%iges Saccharosekissen isoliert. Das Pellet wurde erneut in Saccharose haltigem Puffer aufgenommen, von der Lösung eine OD<sub>260</sub>-Bestimmung (eine OD<sub>260</sub> entspricht, nach Wool 1979, 83 µg Ribosomen), und die Polysomen schließlich über eine erneute Ultrazentrifugation pelletiert und gewaschen. Die Pellets wurden vereinigt, schockgefroren und bei -80°C gelagert. Bei einer Präparation ausgehend von 10 Ratten lag die Ausbeute im Schnitt bei 11.000 OD Ribosomen.

Die Polysomen konnten nun sukzessive zur Gewinnung von 60S rUE eingesetzt werden. Hierzu wurden etwa 5000 OD Polysomen in Puffer gelöst und über eine kurze Zentrifugation alles unlösliche aus der Lösung entfernt. Anschließend wurde die Polysomensuspension mit dem Antibiotikum Puromycin versetzt, welches bei der Translation zu einem Kettenabbruch und darüber zur Trennung der ribosomalen Untereinheiten führt. Der Ansatz wird für 40 Minuten bei 36°C inkubiert. Anschließend wurden die rUE in einem Dichtegradienten von 0-40% Saccharose von einander getrennt. Alle Fraktionen, welche lediglich 60S rUE enthielten, wurden vereinigt und die Lösung dann mit 1 M MgCl<sub>2</sub> Lösung auf 25 mM Magnesiumionenkonzentration eingestellt. Bei dieser Magnesiumionenkonzentration wurden die 60S rUE gefällt und in einem abschließenden Ultrazentrifugationsschritt pelletiert. Die Pellets wurden in Puffer gelöst einer OD<sub>260</sub>-Bestimmung zugeführt und schließlich bei -80°C gelagert. Im Durchschnitt ergaben die eingesetzten 5000 OD Polysomen ein Ausbeute von 2000 OD 60S rUE.

## 2.4 Isolierung von Hsp90 aus Rattenhepatocyten

Die Isolierung erfolgt nach einer modifizierten Vorschrift von Schlatter (Schlatter 1997).

Der nach der ersten Zentrifugation unter 2.1 gewonnene Überstand wurde innerhalb einer einstündigen Ultrazentrifugation von allen nichtlöslichen und größeren Aggregaten gereinigt. Danach wurde die Lösung einer mehrstündigen Dialyse gegen HEPES-Puffer unterzogen, um der Lösung die Saccharose weitest gehend zu entziehen. In einer sich anschließenden weiteren Ultrazentrifugation wurden über Nacht alle durch die Dialyse unlöslich gewordenen Bestandteile aus der Lösung entfernt und diese zusätzlich von allem Fett befreit. Das Fett konnte nach der Zentrifugation abgesaugt und der Überstand als Rohcytosol entweder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert oder der zur weiteren Aufreinigung der Anionenaustauscherchromatographie zugeführt werden.

Die Anionenaustauschersäule wurde mit 250 mM NaCl-HEPES-Puffer equilibriert. Das Rohcytosol konnte mit einem maximalen Gesamtvolumen von 150 ml (Superloop 150, Pharmacia) aufgetragen werden. Anschließend wurde die Säule solange weiter mit 250 mM NaCl-HEPES-Puffer gewaschen bis über die UV-Küvette kein Protein mehr detektiert werden konnte. Anschließend wurde mit 450 mM NaCl-HEPES-Puffer eluiert, das Eluat fraktioniert und die Fraktionen einzeln über eine 12,5% SDS-PAGE-Gelelektrophorese analysiert (Siehe Abbildung 2.1).

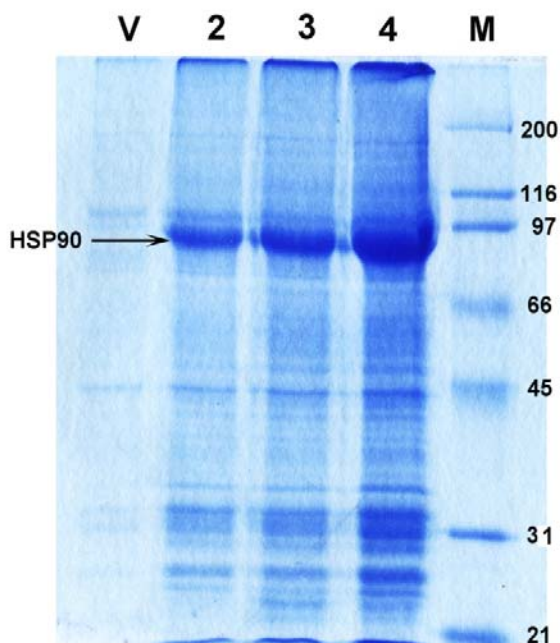
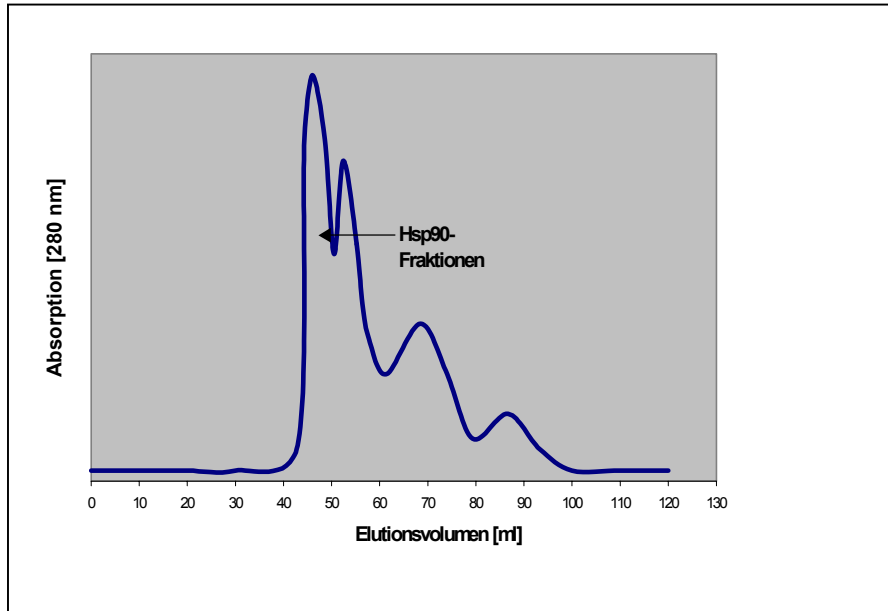


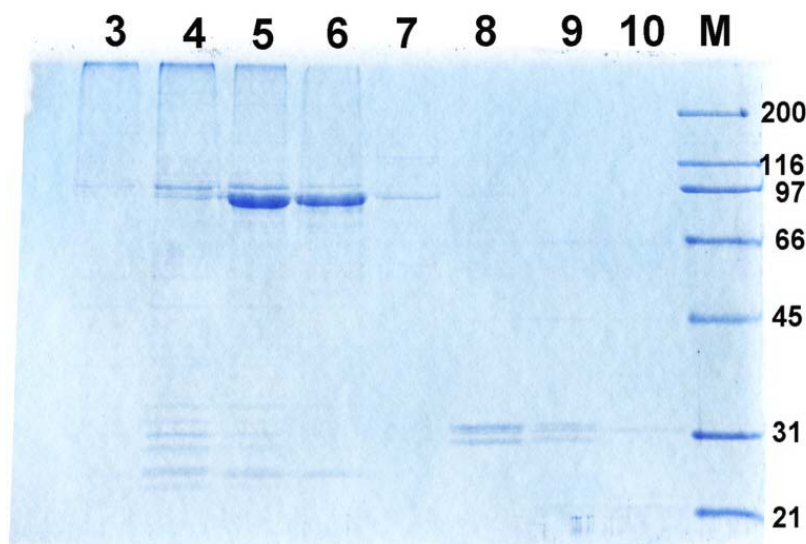
Abbildung 2.1: Gezeigt ist der Ausschnitt einer 12,5 %igen SDS-PAGE zur Analyse der Proteinfractionen eines Q-Sepharose Laufes.

Es zeigt sich deutlich, dass Hsp90 das dominierende Protein dieser Fraktionen darstellt. Nach Beginn der Elution wurden 10 Fraktionen je 9 ml gesammelt, von denen die Fraktionen 2-6 in verwertbarem Maße Hsp90 enthielten. Mit V ist hier der Vorlauf inklusive der Fraktion 1 gekennzeichnet

Die Fraktionen, welche Hsp90 enthielten wurden entweder bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert oder mittels Gelfiltration weiter gereinigt. Die Proteinkonzentration variierte je nach Menge und Konzentration des eingesetzten Rohcytosols zwischen 2 und 6 mg/ml.



**Abbildung 2.2:** Es wurden 10 Fraktionen von je 6 ml ab einem Elutionsvolumen von 35 ml gesammelt. Die proteinäre Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen können der SDS-PAGE in Abbildung 2.3 entnommen werden.



**Abbildung 2.2:** Das Elutionsprofil der Superdex-200 16/60. Gesammelt wurde 10 Fraktionen je 6 ml ab einem Elutionsvolumen von 35 ml. Die Fraktionen sind in der Reihenfolge ihres Elutionsvolumens nummeriert und aufgetragen. Man erkennt, dass die Fraktionen 5 und 6 verhältnismäßig sauberes Hsp90 enthalten. Eine bessere Aufreinigung war für die Quervernetzungs- und Funktionsanalysen nicht praktikabel.

Für die Gelfiltration (Superdex 200 HiLoad 16/60 prepgrade, Pharmacia) wurde ein maximales Auftragsvolumen von 2 ml nicht überschritten, um eine gute Trennung der Proteine zu gewährleisten. Die Gelfiltrationssäule wurde mit HEPES-Puffer equilibriert und die Proteine mit dem selben Puffer eluiert und fraktioniert.

Hsp90 eluiert bereits ab 40 ml. Die Fraktionen wurden erneut in einer 12,5% SDS-PAGE-Gelelektrophorese analysiert. Alle Fraktionen, welche Hsp90 beinhalten werden auf Ihre Proteinkonzentration hin untersucht (siehe Abbildung 2.3).

In den meisten Fällen lag die Proteinkonzentration der Fraktionen nach der Gelfiltration zwischen 0,3-0,5 mg/ml. Bei Bedarf konnten diese mittels Ultrafiltration (Centriprep50, Amicon) aufkonzentriert werden. Die Hsp90-Konzentration sollte 2 mg/ml aber nicht überschreiten, da es sonst zur verstärkten Aggregation und auch verstärktem Abbau des Proteins kommt. Die Hsp90-Fraktionen können anschließend bei -80°C gelagert oder am besten direkt weiterverwendet werden.

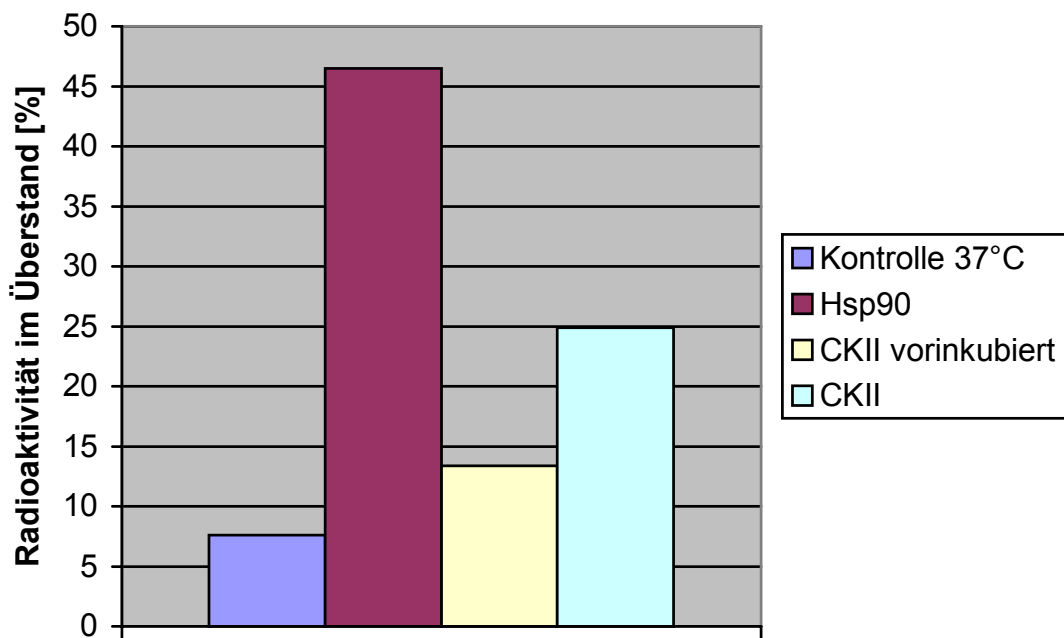
## **2.5 Exportmessung mit 60S rUE aus wiederversiegelten Kernhüllen**

Die Messungen erfolgten nach einer Methode von Kondor-Koch (Kondor-Koch 1980). In 400µl Mikrofugenröhrchen werden 10 µl Perchlorsäure mit 40 µl Siliconöl überschichtet. Der Inkubationsansatz wird bis auf die gemäß 2.2 erstellten Vesikel zusammengestellt und bei 37°C vorinkubiert. Durch Zugabe der Vesikel startet die Messung. Von den Inkubationsansätzen werden jeweils 150 µl auf sechs bei 37°C vorinkubierten Mikrofugenröhrchen überführt und die Inkubation fortgesetzt.

Nach der entsprechenden Inkubationszeit von 20 Minuten werden die Proben scharf zentrifugiert, so dass die Vesikel, welche eine höhere Dichte als das Siliconöl und die Perchlorsäure aufweisen, sedimentieren und in der Perchlorsäure zusätzlich denaturieren. Vom Überstand werden jeweils 100 µl entnommen und über die Flüssigkeitszintilationsmessung auf den Gehalt an Radioaktivität hin untersucht. Die Mittelwerte der jeweiligen Ansätze wurden zueinander in Bezug gesetzt. Für die Darstellung wurde anschließend die Probe bei 4°C mit null Prozent und die Probe mit der höchsten Exportrate mit 100 Prozent gleichgesetzt.

## 2.6 Der Einfluss von CKII auf die exportfördernde Aktivität von Hsp90

Phosphorylierung können ein Protein in seiner Aktivität stark beeinflussen. Hsp90 besitzt gemäß seiner Aminosäuresequenz eine Vielzahl potentieller Phosphorylierungsstellen, von denen die meisten auf die Caseinkinase II entfallen. Nun war es sinnvoll zu überprüfen, inwiefern sich eine Phosphorylierung von Hsp90 durch die Caseinkinase II auf die von Hsp90 beeinflusste Exportrate von 60S rUE aus wiederversiegelten Kernhüllen auswirkt. Alle Ansätze wurden mit einer Vesikelmenge versehen, welches einer Menge von 50 OD an isolierten Zellkernen entsprach. Neben den Kontrollansätzen bei 4°C und 37°C, welche lediglich Puffer enthielten, um die Dichtheit der Vesikel zu bestätigen, wurde ein Ansatz nur mit Hsp90 (0,5 mg/ml), einer mit Hsp90 (0,5 mg/ml), welches mit CKII (10 mU) und 1 mM ATP vorinkubiert wurde und ein Ansatz, bei dem Hsp90 (0,5 mg/ml) und CKII (10 mU) erst zum Inkubationsbeginn beigelegt wurden, bestückt. Zu allen Ansätzen auch den Kontrollen wurde zudem 4 mM ATP (aus 10fach Stammlösung) und 2 mM DTT (aus 100fach Stammlösung) zugegeben und die Ansätze mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 ml ergänzt.



**Abbildung 2.4:**

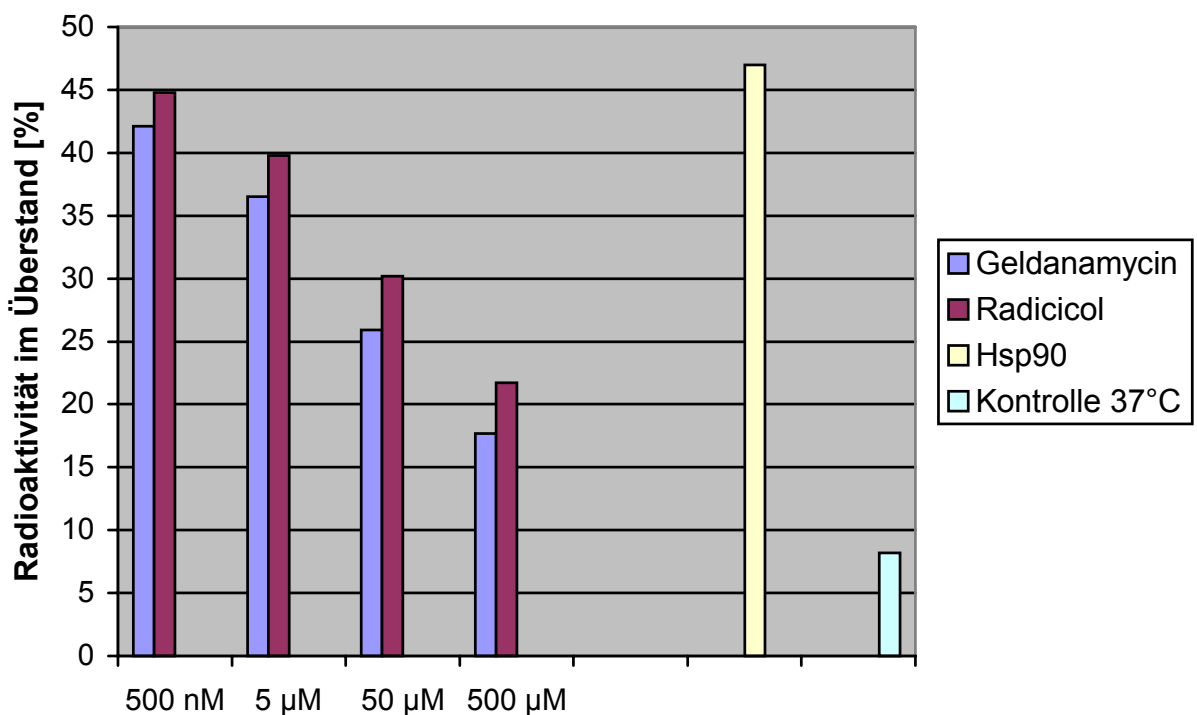
Die Abbildung lässt erkennen, dass sich der Hsp90 Effekt in Bezug auf den Export von 60S rUE aus wiederversiegelten Kernhüllen über die Einwirkung mit CKII dramatisch reduzieren lässt. Der 4°C-Wert wurde als Hintergrund von allen Werten abgezogen.

Die Inkubationsansätze wurden zu je 150 µl auf sechs Mikrofugenröhrchen verteilt und bei entsprechender Temperatur für insgesamt 20 Minuten inkubiert (siehe dazu 2.5).

Die Grafik in Abbildung 2.4 macht deutlich, dass die Inkubation mit CKII den Exportrate von Hsp90 deutlich nach unten korrigiert, wobei dieser Effekt bei dem vorinkubierten Ansatz erwartungsgemäß deutlicher ausfällt. Die Kontrollen zeigen gewohnte Werte, womit die Aussagekraft dieser Messung untermauert wurde.

## 2.7 Einfluss von Radicol auf die exportfördernde Aktivität von Hsp90

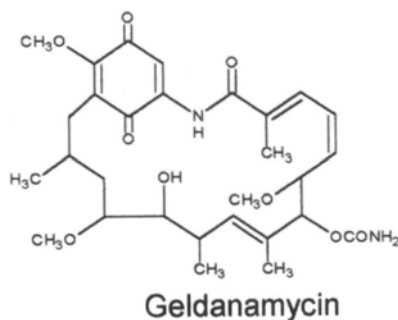
In *in vitro* Versuchen konnte bisher gezeigt werden, dass sich die über Hsp90 erzielte Steigerung der Exportrate von 60S rUE aus wiederversiegelten Kernhüllen, durch Zugabe Hsp90 spezifischer Inhibitoren wieder deutlich reduzieren lässt. Für Geldanamycin und Novobiocin konnte dieser Effekt bisher verdeutlicht werden (Langer 2001). Mit Radicol trat ein weiterer Inhibitor auf den Plan, welcher ebenfalls wie Geldanamycin im Bereich der N-terminalen ATP Bindungsstelle zu binden vermag und diese dadurch blockiert.



**Abbildung 2.5:**

Es zeigt sich eine konzentrationsabhängige Reduzierung des Hsp90 Effektes durch die Inkubation mit Radicol. Der 4°C Wert wurde auch hier als Hintergrund von allen Werten abgezogen. 100 µl Gesamtansatz ergaben 100 %. Die Kontrollwerte unter Einfluss von DMSO und Ethanol zeigten keinen Unterschied zum 37°C-Wert und wurden daher nicht aufgeführt.

Dementsprechend sollte sich das Ergebnis für den Radicol Einfluß dem gezeigten von Geldanamycin zumindest annähern. Daher wurde der Geldanamycin Einfluss zum Vergleich erneut geprüft. Hierfür wurden Vesikel wie unter 2.2 gezeigt hergestellt und mit  $^{125}\text{J}$  markierten 60S rUE gefüllt. Für die Endpunktbestimmung wurden fünf Ansätze erstellt. Allen Ansätzen war gemein, dass sie Vesikel enthielten, welche einer Menge von 50 OD Kernen entsprach. Zudem wurde den Ansätzen 4 mM ATP und 2 mM DTT zugeführt. Als Positivkontrolle wurde eine Endpunktbestimmung mit 500  $\mu\text{g}$  Hsp90 (Ratte) durchgeführt. Weitere Kontrollen umfassten die Zugabe der beiden Lösungsmittel Ethanol und DMSO, um einen Effekt ihrerseits ausschließen zu können. Die letzte Kontrolle enthielt den 4°C Wert, um die Dichtheit der Vesikel zu bestätigen. Schließlich wurden in weiteren Ansätzen, welche 500 mg Hsp90 enthielten, die Antibiotika Geldanamycin und Radicol in den Konzentrationen von 500 nM bis 0,5 mM eingesetzt. Alle Ansätze wurden mit Wasser auf ein Gesamtvolumen von 1 ml ergänzt und schließlich zu je 150  $\mu\text{l}$  auf sechs Mikrofugenröhrchen verteilt und bei 37°C bzw. bei 4°C für 20 Minuten inkubiert (siehe 2.5).

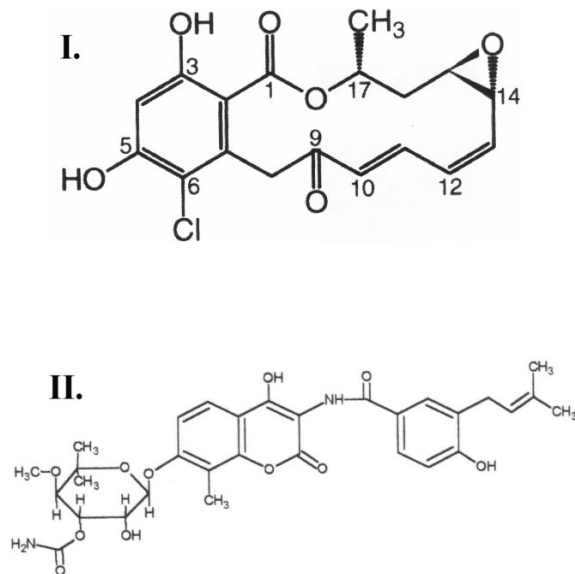


In der Tat zeigte sich in beiden Fällen eine konzentrationsabhängige Inhibierung von Hsp90. Jedoch fällt der reduzierende Effekt bei Radicol etwas geringer aus. Die beiden Lösungsmittel zeigten keinen Effekt. Hsp90 als Positivkontrolle zeigte wie erwartet die höchste Exportrate aller Ansätze.

**Abbildung 2.6:**  
Struktur von Geldanamycin

## 2.8 Einfluss von Hsp90-Inhibitoren auf den *in vivo* Export von 60S rUE

Diese Messreihen wurden durchgeführt, um den Einfluss von Hsp90 auf den Transport von 60S rUE auch *in vivo* weiter zu konkretisieren.



**Abbildung 2.7:**  
Strukturen von Radicol (I.) und Novobiocin (II.)

werden, ob die Ergebnisse der *in vitro* Studien sich auch im Falle der Substanzen Novobiocin und Radicol im *in vivo* System bestätigen.

Bisherige Arbeiten diesbezüglich konnten unter anderem zeigen, dass Geldanamycin ein benzochinoides Ansamycin, welches spezifisch die N-terminale ATP-Bindungsstelle von Hsp90 blockiert und darüber dessen Funktion herabsetzt, die Exportrate in den Zellkern von Oocyten injizierter 60S rUE, deutlich reduziert (Rosmus 2000). Desweiteren wurde gezeigt, dass Geldanamycin, Novobiocin und Radicol den Hsp90 Einfluss auf den 60S rUE Export im *in vitro* System deutlich zu reduzieren vermögen. Daher sollte geprüft

## 2.9 Mikroinjektion und Exportmessung von 60S rUE

### in Oocyten von *Xenopus laevis*

Die Mikroinjektion in Oocyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* stellt ein ideales *in vivo* System zur Überprüfung *in vitro* gewonnener Ergebnisse dar. Jedoch muss man dabei stets in Betracht ziehen, dass sich die erzielten Ergebnisse stets in einem schmalen Fenster physiologischer Relevanz bewegen.

Das heißt im Falle des zu messenden Exports von 60S rUE, dass hierbei in Oocyten keine Steigerung der Exportrate zu erzielen ist, da sich die Rate ohnehin schon am oberen Limit bewegt. Auf der anderen Seite lässt sich die Exportrate auch nicht auf nahezu Null reduzieren, da hierdurch alle anderen in der Zelle stattfindenden Stoffwechselprozesse derart beeinflusst werden, dass die Zelle apoptotisch wird.



Demnach lässt sich die Exportrate zwar drosseln aber niemals lahm legen, was einen scheinbar geringen Effekt im Kurvenverlauf zu vergleichender Messungen ergibt.

Der Zellkern einer im Durchmesser ca. 1mm großen Oocyte des Entwicklungsstadiums V-VI besitzt ein Volumen von nicht ganz 100  $\mu\text{l}$ , was in etwa einem Zehntel des Gesamtvolumens einer Oocyte entspricht. Der Zellkern ist zwar von außen her nicht erkennbar, da er jedoch direkt unter dem animalen Pol der Oocyte lokalisiert ist, kann man, sich daran orientierend, mit relativ hoher Trefferquote in diesen injizieren. Injiziert wurde stets ein Volumen von 18,4 nl zum einen weil der Gehalt an Radioaktivität die Mindestmenge von 300 cpm pro Injektion nicht unterschreiten sollte, zum anderen, um eine zu hohe Ribosomenkonzentration zu vermeiden, welche sonst zu Aggregaten führen, die weder transportiert, noch vernünftig injiziert werden können, da sich die Nadel dadurch häufig verstopft.

In das Cytosol wurden stets 50 nl in den Bereich des Übergangs vom vegetativen in den animalen Pol injiziert.

Die Oocyten entstammen dem operativ entnommenen Ovar von *Xenopus laevis*.

Das Ovar wurde einer Kollagenasebehandlung unterzogen, um das Bindegewebe zu lysieren, in welches die Oocyten eingebettet sind. Anschließend werden die Oocyten in calciumfreiem Medium inkubiert, um sie von den Folikelzellen zu befreien, welche den Kontakt zwischen Oocyte und der Basallamina gewährleisten. Sobald sich die Folikelzellen gelöst haben, werden die Oocyten wieder in normales ORI-Medium überführt und können dort bei RT über mehrere Tage hinweg gelagert werden. Dem Medium wurde gelegentlich und wechselnd Antibiotika zugegeben, um das Wachstum von Bakterien im Medium während der Lagerung zu minimieren.

Die mit  $^{125}\text{J}$  radioaktiv markierten 60S rUE wurden wie oben beschrieben in den Zellkern der Oocyten injiziert. Zur Kontrolle der Trefferquote konnte dem Injektat vorgelöstes Hämoglobin zugegeben werden. Bei erfolgreicher Kerninjektion färbt dieses den Kern leicht rötlich an, da das Hämoglobin nicht aus dem Kern exportiert werden kann. Im Schnitt wurde der Kern bei  $\frac{3}{4}$  aller durchgeführten Injektionen getroffen.

Die Menge an 60S rUE, welche pro Oocyte injiziert wurden lag bei ca. 500 ng. Dazu proportional lag auch die Menge an Radioaktivität, welche je nach Güte oder Alter der Markierung zwischen dem absoluten Minimum von 200 und weit über 1000 cpm pro Oocyte liegen konnte. Nach erfolgter Injektion wurden die Oocyten solange bei 4°C inkubiert, bis alle Injektionen abgeschlossen und mit der Überführung der Oocyten in Medium bei RT die

Messreihe begann. Pro Messwert wurden folgend mindestens 10 Oocyten dem Ansatz entnommen und in 1% TCA/Ori-Medium bei 4°C fixiert.

Nach 30 minütiger Fixierung wurden der Zellkern aus der Oocyte präpariert und beides Zellkern und der Oocytenrest separat voneinander über die Flüssigkeitszintillationszählung auf ihren Gehalt an Radioaktivität hin ausgewertet. Die Werte zueinander ins Verhältnis gesetzt, ergaben die prozentuale Menge der im Zellkern befindlichen Radioaktivität.

## 2.10 Darstellung einer Messreihe

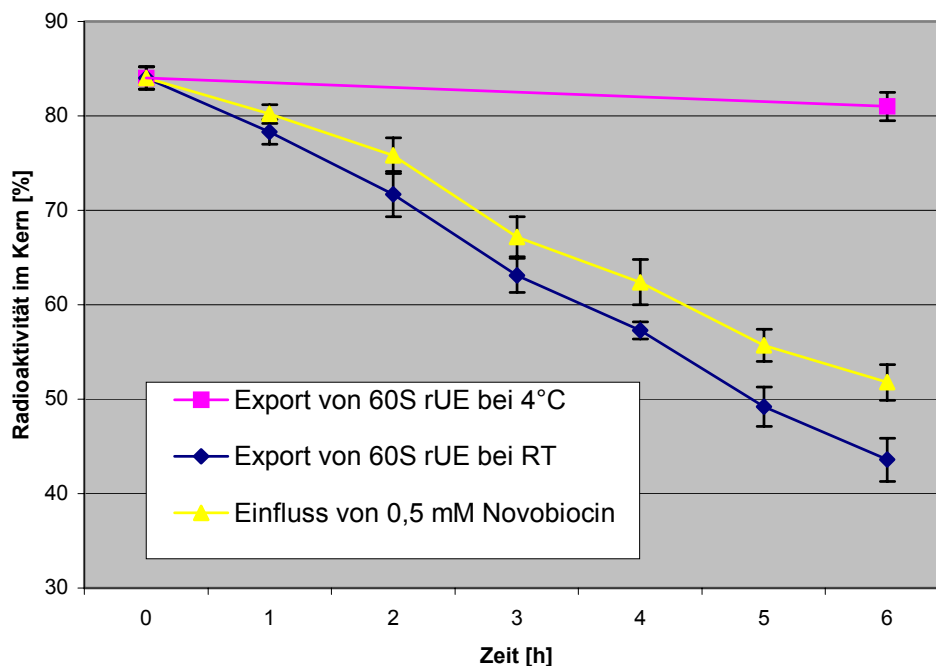
Um zu ermitteln mit welcher Dosis an Hsp90 Inhibitoren man am besten arbeiten konnte, wurden entsprechende Vorversuche unternommen. Hierbei wurde die Bildung apoptotischer Zellen in Abhängigkeit zur eingesetzten Konzentration der entsprechenden Inhibitoren betrachtet. Dabei sollten nach der sechs Stunden umfassenden Messung keine apoptotischen Zellen entstanden sein. Die höchste Konzentration, welche diese Voraussetzung erfüllte, wurde später für die Messungen eingesetzt. Es stellte sich hierbei heraus, dass man bei Novobiocin mit einer maximalen Endkonzentration von 0,5 mM und bei Radicicol mit einer maximalen Endkonzentration von 0,2 mM pro Oocyte arbeiten konnte.

Die Oocyten wurden mit radioaktivmarkierten 60S rUE vorinjiziert und auf Eis bei 4°C aufbewahrt. Anschließend wurden in 50% der vorinjizierten Oocyten die Inhibitoren in das Cytosol coinjiziert und die Messung durch Überführung der Oocyten in Inkubationsmedium bei RT gestartet.

Zur Kontrolle wurden stets auch jeweils 10 Oocyten bei 4°C auf Eis belassen.

## 2.11 Einfluss von Novobiocin auf den Export von 60S rUE *in vivo*

Die Oocyten wurden mit jeweils etwa 500 ng <sup>125</sup>J markierten 60S rUE vorinjiziert. Anschließend wurden in das Cytosol 50 nl einer 10 mM Novobiocin/Ori-Lösung bzw. reine Ori-Lösung coinjiziert. Daraus resultiert eine cytosolische Endkonzentration von 0,5 mM Novobiocin pro Oocyte.



**Abbildung 2.8:**

Der Unterschied im Kurvenverlauf ist deutlich erkennbar. Die Aktivität von Hsp90 wird in der Oozyte durch Novobiocin entscheidend reduziert. Der Effekt liegt sogar über dem von Geldanamycin (Rosmus 2000), was jedoch auch der geringeren Spezifität von Novobiocin zugeschrieben werden kann, da die *in vitro* Studien ein genau gegensätzliches Ergebnis erbringen. Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung wieder.

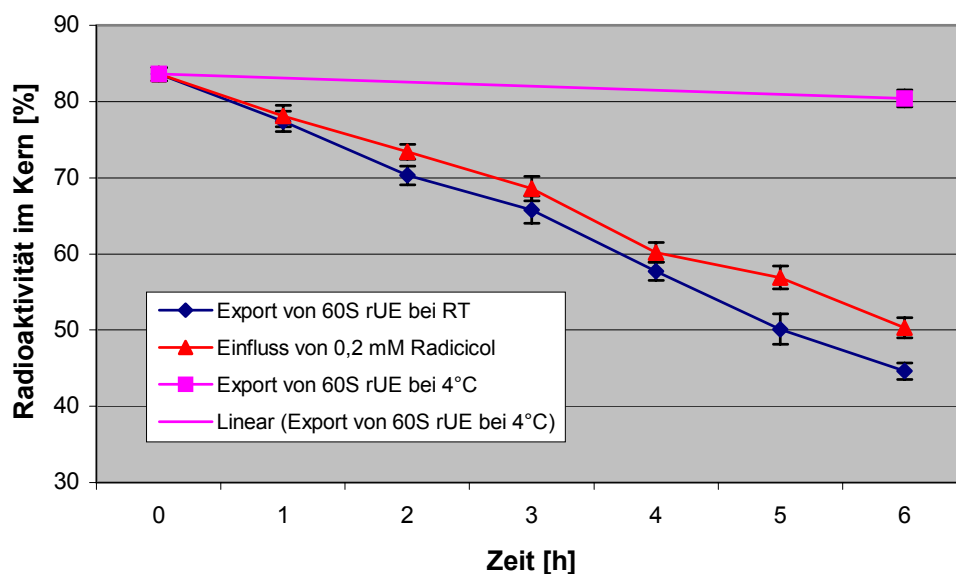
Über einen Zeitraum von sechs Stunden wurde den Inkubationsansätzen jeweils zehn Oocyten pro Stunde zur Fixierung und Auswertung entnommen, je zehn Oocyten pro Ansatz verblieben über den gesamten Messzeitraum bei 4°C auf Eis (siehe Abbildung 2.8).

Die Zugabe von Novobiocin inhibiert den Export von 60S rUE aus dem Zellkern von Oocyten. Über den gesamten Zeitverlauf verbleibt die Novobiocinkurve über der des Normalexportes und erreicht mit 51% kernständiger Radioaktivität nach den sechs Stunden auch einen deutlich höheren Endwert.

## 2.12 Einfluss von Radicol auf den Export von 60S rUE *in vivo*

*In vitro* im Vesikelmesssystem konnte bereits gezeigt werden, dass Radicol den von Hsp90 verursachten Exporteffekt deutlich zu reduzieren vermag. Dieser Effekt sollte nun *in vivo*

überprüft werden. Hierzu wurden die Oocyten wieder mit  $^{125}\text{J}$  markierten 60S rUE in den Kern vorinjiziert. Das in Ethanol gelöste Radicol (Konzentration 10 mM) wird in Ori-Medium auf 4 mM Endkonzentration verdünnt, so dass bei einer cytosolischen Injektion von 50 nl eine Gesamtkonzentration von 0,2 mM Radicol pro Oocyte erreicht wird. Die Messreihe wurde dann wie oben beschrieben angelegt. Jedoch musste hier der Kontrollinjektion ein entsprechendes Äquivalent Ethanol beigegeben werden, um einen möglichen Einfluss von Ethanol auf den Transport von vornherein ausschließen zu können. Die Ergebnisse ergeben den Kurvenverlauf von Abbildung 2.9 .



**Abbildung 2.9:**

Auch hier ist der Einfluss von Radicol deutlich sichtbar. Die Exportkurve unter Einfluss des Inhibitors bleibt während des gesamten Zeitverlaufs über der normalen Exportkurve. Die Differenz auch im Endpunkt ist zwar nicht groß, aber aufgrund der angegebenen Fehlertoleranz (Fehlerbalken, Standardabweichung) durchaus signifikant.

Hier bestätigt sich zum einen das Ergebnis der Endpunktbestimmung (siehe 2.6), wo sich der Hsp90 Effekt ebenfalls reduzieren ließ, zum anderen zeigt es erneut das ein in vivo eingesetzter Inhibitor von Hsp90 auch Auswirkungen auf den Export von 60S rUE aus dem Zellkern der Oocyten nach sich zieht.

## 2.13 Phosphorylierung von Hsp90

In der Literatur wird beschrieben, dass Hsp90 zusammen mit der Serin/Threonin-Kinase Caseinkinase II (im Folgenden CKII genannt), ein Heterotetramer bestehend aus zwei katalytischen  $\alpha$ - und zwei regulatorischen  $\beta$ -Untereinheiten, komplexiert, um wie bei vielen anderen Kinasen auch deren Funktionalität zu stabilisieren (Mijata & Yahara 1992, 1995).

Gleichzeitig kann Hsp90 von der CKII phosphoryliert und somit beeinflusst werden. Insgesamt besitzt Hsp90 $\alpha$  17 und Hsp90 $\beta$  15 potentielle Motive, um von der CKII phosphoryliert werden zu können, wenn man die Konsensussequenz von S/T-X-X-D/E (Pearson & Kemp 1991) als Erkennungssequenz zu Grunde legt. Natürlich sind nicht alle potentiellen Phosphorylierungsstellen gleichsam physiologisch bedeutend. Bisher konnten lediglich drei der fünf Threonine beim hHsp90 $\alpha$  sowie ein von zwölf Serinen und zwei von drei Threoninen beim hHsp90 $\beta$  als mögliche Phosphorylierungsstelle ausgeschlossen werden.

Insgesamt verbleiben demnach noch folgende Reste als potentielle Phosphorylierungsstellen:

### 1.) für hHsp90 $\alpha$

die Serinreste: 39, 63, 68, 72, 231, 263, 470, 476, 641, 658, 677 und 726

die Threoninreste: 90 und 566

### 2.) für hHsp90 $\beta$

die Serinreste: 34, 58, 63, 67, 225, 255, 261, 462, 468, 669 und 718

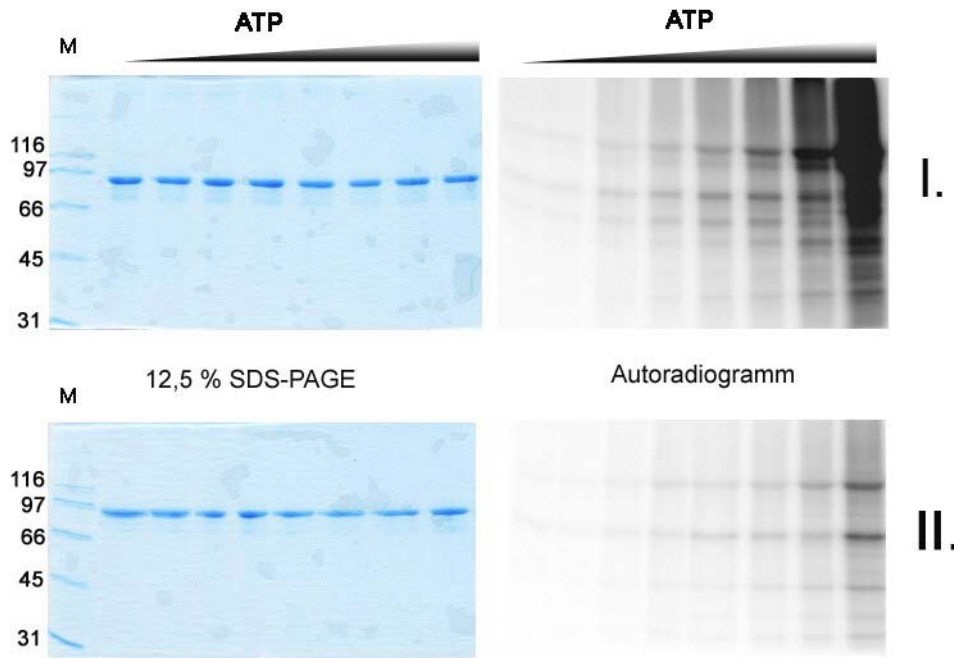
der Threoninrest: 85

Da man bisher zudem über die dreidimensionale Struktur von Hsp90 nur sehr wenig weiß, kann man auch die Bedeutung der Phosphorylierungsstellen bisher nur vage erörtern.

Stets wird auch das Potential von Hsp90 zur Autophosphorylierung diskutiert. Bisher konnte eine Kinase Beteiligung an diesem Phänomen nie ganz ausgeschlossen werden. Aufgrund des Proteinspektrums im SDS-Gel lässt sich nicht ausschließen, dass beispielsweise die CKII mit der Hsp90-fraktion eluiert.

Daher wurde die Hälfte einer nach der Gelfiltration erhaltenen Hsp90 Probe zusätzlich über eine Heparinsäule gegeben, um die CKII, welche über ihre  $\alpha$ -Untereinheit sehr affin an Heparin zu binden vermag, aus der Präparation zu verdrängen. Die auf diese Weise erhaltenen

zwei Hsp90 Proben wurden anschließend auf Unterschiede im Grad ihrer Eigenphosphorylierung hin untersucht (siehe Abbildung 2.10).

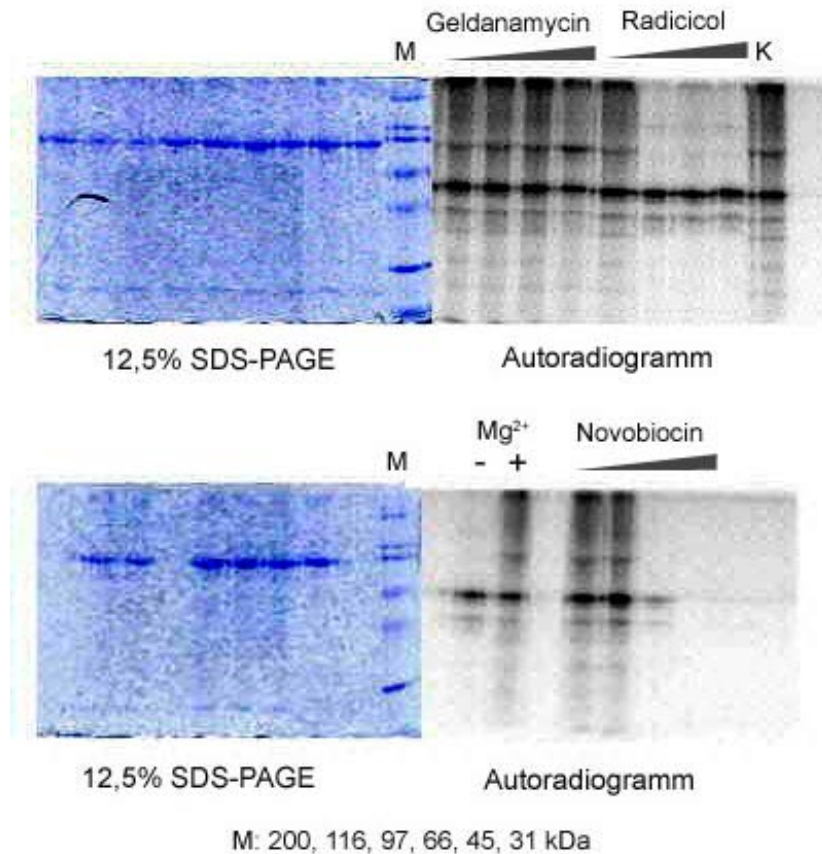


**Abbildung 2.10:** Die ATP $\gamma$ <sup>32</sup>P-Konzentrationen der einzelnen Proben lagen bei 0; 35  $\mu$ M; 175 $\mu$ M; 350  $\mu$ M; 1,75 mM; 3,5 mM; 17,7 mM; und 35 mM. Unter I. sind die Hsp90-Proben nach der Gelfiltrations säule gezeigt. II. gibt die Hsp90-Proben nach der zusätzlichen Heparinsäule wieder. Sowohl die Intensität als auch das Signalmuster differieren deutlich voneinander.

Der Grad an Autophosphorylierung wird tatsächlich erheblich reduziert, aber nicht komplett aufgehoben. Im Zuge dessen scheint eine Beteiligung der CKII an der Hsp90 Phosphorylierung der Gelfiltrations-Probe als sehr wahrscheinlich.

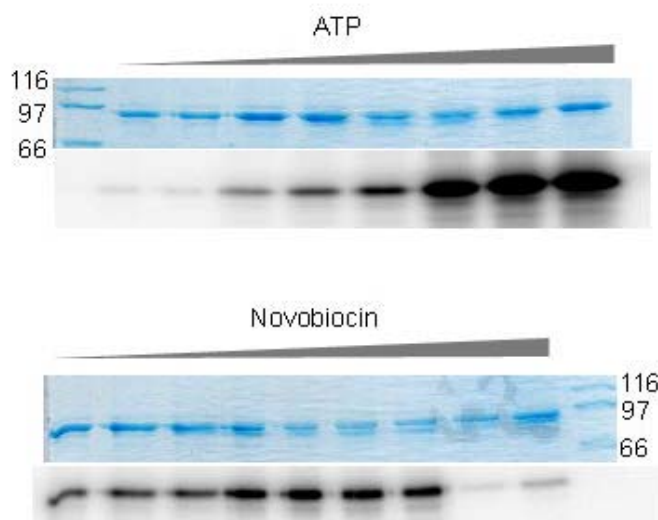
Es zeigte sich, dass sowohl die Phosphorylierung als auch die Zugabe spezifischer Inhibitoren den Einfluss von Hsp90 auf die Exportrate von 60S rUE zu reduzieren vermögen. Diese funktionellen Verlagerungen könnten durch vergleichbare strukturelle bzw. konformelle Veränderungen im Protein provoziert werden. Daher könnte es möglich sein das sich die eine oder andere Phosphorylierungsstelle durch die Bindung von Geldanamycin, Novobiocin oder Radicol maskieren lässt, so dass sie von der CKII eventuell nicht mehr zu erkennen und zu phosphorylieren ist.

Die Abbildung 2.11 zeigt die Abhängigkeit des Phosphorylierungsgrades durch die CKII unter Einsatz der drei Hsp90 spezifische Inhibitoren.



**Abbildung 2.11:** Die Inkubationsansätze wurden größtmäßig so gewählt, dass die daraus resultierenden Gelproben ein Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l hatten, um für zwei Gele auszureichen. Zu jedem Ansatz wurden 40  $\mu$ U der  $\alpha$ -Untereinheit der CKII zugegeben. Die Konzentration an  $\gamma$ <sup>32</sup>P-ATP betrug in allen Proben 3,5 mM. Die Inhibitoren wurden jeweils in Konzentrationen von 50; 100; 500 und 1000  $\mu$ M eingesetzt. Die Menge an Hsp90 entsprach in etwa 30  $\mu$ g pro Probe. Lediglich in einer Probe wurde auf den Zusatz von Magnesium verzichtet (Mg<sup>2+</sup> -). Bei allen anderen Proben lag die Magnesiumionen Konzentration bei 5 mM. Interessanter Weise ähnelt das Bandenmuster der Probe ohne Magnesium denen durch Zusatz von Radicol und Novobiocin beeinflussten.

Man kann erkennen, dass sich die Phosphorylierungsrate von Hsp90 durch die CKII nach Zusatz von lediglich 100  $\mu$ M Radicol deutlich reduzieren lässt. Auch Novobiocin unterbindet die Phosphorylierung, jedoch auf andere Art und Weise als Radicol, was sich im Bandenmuster niederschlägt. Geldanamycin scheint in diesem Bezug keine Wirkung zu haben.

**Abbildung 2.12:**

In den Proben des oberen Gels wurde  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP in den Konzentrationen 1  $\mu\text{M}$ ; 35  $\mu\text{M}$ ; 100  $\mu\text{M}$ ; 350  $\mu\text{M}$ ; 1 mM; 3,5 mM und 10 mM eingesetzt. Für die Proben des unteren Gels wurden dann jeweils 3,5 mM gewählt. Novobiocin wurde dort in den Konzentrationen 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250 und 500  $\mu\text{M}$  zugesetzt. Alles andere entspricht den Werten wie in Abbildung 2.11.

Eine genauere Konzentrationsabhängigkeit zwischen Novobiocin und dem Phosphorylierungsgrad zeigt, dass die Phosphorylierung bei niedrigen Novobiocin Konzentration gegenüber der normalen Phosphorylierung deutlich reduziert ist, dass aber erst ab einer Novobiocin Konzentration von 250  $\mu\text{M}$  die Phosphorylierung insgesamt unterbunden wird (siehe Abbildung 2.12).

Im folgenden war es interessant zu erfahren, ob sich eine derartige Wirkung auch bei den Fragmenten von Hsp90 (N-Terminus AS 1-237; C-Terminus AS 238-732) zeigt.

Die Inhibierung der Phosphorylierung macht sich demnach erst bei recht hohen Konzentrationen von Radicol bemerkbar, während eine Wirkung von Geldanamycin auch hier ausbleibt. Vergleichbare Studien mit dem C-terminalen Fragment (AS 238-732) und Novobiocin sollten das bestätigen, was Novobiocin im Gesamtprotein bereits an Wirkung zeigen konnte. Hierbei zeigte sich jedoch lediglich, dass sich das Fragment bei einer sehr hohen Konzentration an ATP in einem sehr geringem Maße autophosphorylieren kann (siehe Abbildung 2.14). Eine Auswirkung von Novobiocin auf die Phosphorylierung des Fragments durch die CKII konnte jedoch nicht festgestellt werden.



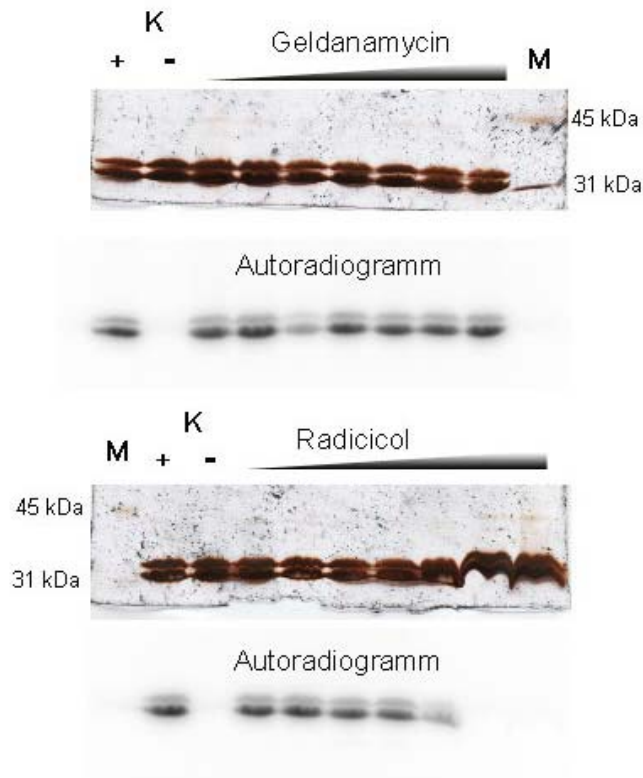


Abbildung 2.13:  
 Hier wurde der Einfluss von Geldanamycin und Radicicol auf die durch die CKII katalysierte Phosphorylierung von Hsp90 untersucht. Geldanamycin und Radicicol wurden jeweils in den Konzentrationen 10; 25; 50; 100; 250; 500 und 1000  $\mu\text{M}$  zugegeben. Die  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP Konzentration lag jeweils bei 3,5 mM. Als Positiv- und Negativkontrolle dienten normale Ansätze mit bzw. ohne  $\text{Mg}^{2+}$ -Ionen. Auch bei den Kontrollen lag die  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP Konzentration bei 3,5 mM. Weiteres siehe Abbildung 2.11.

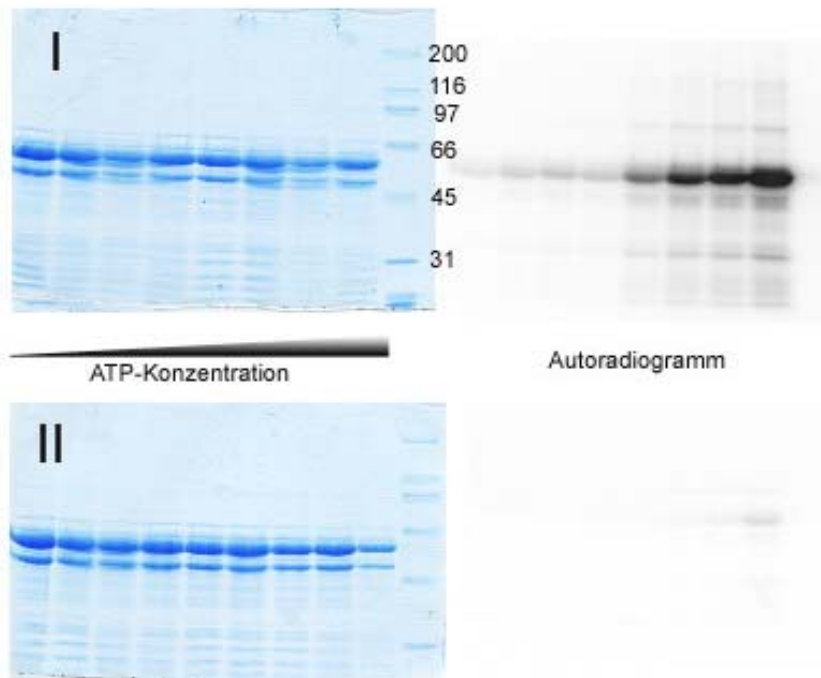
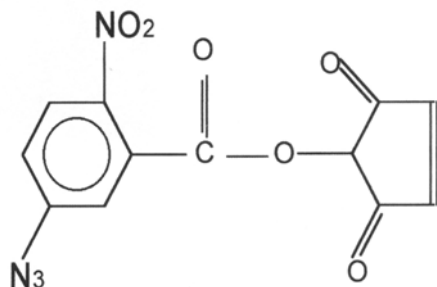


Abbildung 2.14:  
 $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP wurde in den Konzentrationen von 1; 3,5; 10; 35; 100; 350; 500; 1000; 3500 und 10000  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Unter I. wurde den Proben jeweils 40  $\mu\text{U}$  CKII ( $\alpha$ -Untereinheit) zugegeben, was unter II. weggelassen wurde. Alles andere verblieb wie unter Abbildung 2.11 erklärt.

## 2.14 Charakterisierung unterschiedlicher Quervernetzungsreagenzien

Ein Quervernetzer, welcher für derartige Studien Verwendung findet, sollte heterobifunktional sein, was soviel heißt, als dass er über zwei unterschiedliche reaktive Gruppen unter unterschiedlichen Bedingungen mit Proteinen kovalente Bindungen eingehen



**Abbildung 2.15:**  
Struktur von (N-(5-Azido-2-Nitrobenzoyloxy)succinimid; ANS

kann. In den meisten Fällen handelt es sich bei der ersten reaktiven Gruppe um einen Ester, welcher je nach Gestaltung mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen der Aminosäureseitenketten unter pH neutralen Bedingungen kovalent reagieren kann, während es sich bei der anderen Gruppe meist um

eine Azidogruppe handelt, welche unter Bestrahlung mit UV-Licht entsprechender Wellenlänge mit benachbarten Gruppen ebenfalls kovalente

Bindungen eingeht. Entscheidend für die spätere Ausbeute ist jedoch meistens die Länge des zwischen den beiden Gruppen befindlichen Molekülrestes. Des weiteren sollte darauf geachtet werden, dass sich der Quervernetzer möglichst gut im wässrigen Milieu löst, bzw. ein Lösungsmittel zum vorlösen gewählt werden kann, welches das System, in welchem später gearbeitet werden soll, nicht allzu sehr beeinflusst.

Schließlich wurden drei verschiedene Quervernetzer getestet, um zu eruieren mit welchem man am ehesten brauchbare Quervernetzungen erzielen könnte.

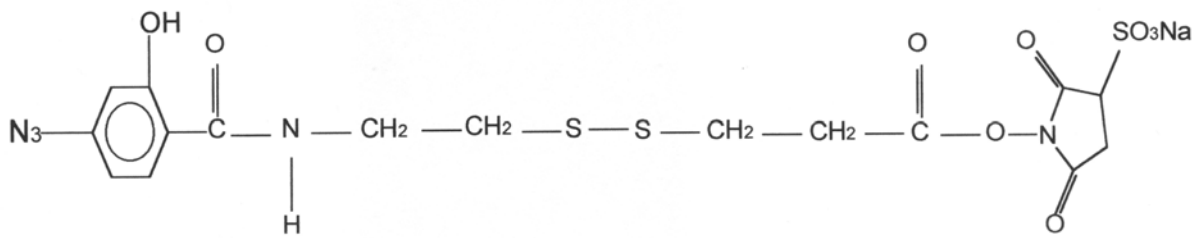
Verwendet wurden hierbei die Crosslinker:

SASD ( Sulfosuccinimidyl-2-(p-azidosalizylamido)ethyl-1,3'-dithiopropionat , Pierce),

APAI (p-Azidophenylacetylimidoester) und

ANS ( N-(5-Azido-2-Nitrobenzoyloxy)succinimid, Sigma-Aldrich) (siehe Abbildung 2.15).

SASD stellt sicherlich für die Verwendung innerhalb eines solch komplexen Systems einen idealen Quervernetzer dar (siehe Abbildung 2.16). Denn er kann sowohl über  $^{125}\text{J}$  markiert als auch reduktiv gespalten werden, was eine Identifikation von Quervernetzten Proteinen extrem erleichtern würde.

**Abbildung 2.16:**

Struktur von Sulfosuccinimidyl-2-(p-azidosalicylamido)ethyl-1,3'-dithiopropionat ; SASD

So ließe sich das unbekannte Protein über den jodierten Rest radioaktiv markieren und nach erfolgter Abspaltung vom bekannten Protein dieses separat der Sequenzanalyse zuführen. Es zeigte sich jedoch, dass die beiden kürzeren Quervernetzer APAI und ASN wesentlich effektiver waren als der mit über 18 nm doch recht lange SASD. Zudem birgt ein langer Spacerarm stets die Gefahr einer unspezifischen Verknüpfung, gerade im Bereich des Kernporenkomplexes, welcher an sich ja nur knapp 30 nm im Durchmesser misst.

Die beiden kurzen Quervernetzer zeigten im Versuch ähnliche Resultate. ASN ist zwar der etwas kürzere Quervernetzer, da ihm eine Acetylgruppe zwischen den reaktiven Gruppen fehlt, dennoch bot das APAI zwei wesentliche Vorteile. Erstens stand es in größerer Menge zur Verfügung und konnte jederzeit nachsynthetisiert werden, zweitens wies es als Hydrochlorid bessere Lösungseigenschaften auf als das ASN. Dadurch wurde im weiteren das APAI als Quervernetzungsreagenz eingesetzt.

## 2.15 Darstellung und Verwendung des heterobifunktionalen

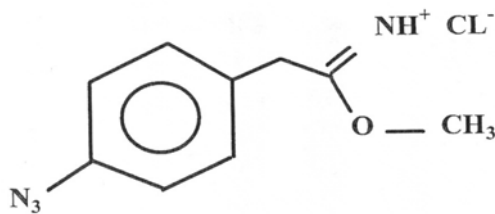
### Quervernetzers APAI

Die Synthese von APAI erfolgt nach einer Anleitung von Fink, Fasold und Rommel (Fink et al. 1980). Das Edukt p-Aminobenzylcyanid wird diazotiert und anschließend in para-Stellung in die Azidoverbindung umgesetzt. Die Azidogruppe konnte im Infrarotspektrum bei  $2124\text{ cm}^{-1}$  mit einer Transmission von 7% gegenüber dem Leerwert (Luft) nachgewiesen werden. Anschließend wird die Nitril-Gruppe unter Chlorwasserstoffsättigung mit Methanol in den Imidoester umgesetzt.

APAI lässt sich hochkonzentriert in Methanol vorlösen und vor der Zugabe zum Protein in 1M  $\text{NaPO}_4$  entsprechend verdünnen und abpuffern.

Den Imidoester lässt man dann mit freien Aminogruppen des ersten quervernetzenden Proteins (Hsp90) unter Lichtausschluss reagieren, um eine frühzeitige Reaktion der Azidogruppe und damit interne Quervernetzungen zu vermeiden.

Die Reaktion läuft innerhalb von 30 min bei RT oder 90 min bei 4°C ab. Es erwies sich als erfolgreich, den Quervernetzer gegenüber dem Protein im molaren Verhältnis von 5 : 1 gegenüber dem zu vernetzenden Protein einzusetzen.



**Abbildung 2.17:**  
Struktur von p-Azidophenylacetyl imidoester; APAI

Überschüssiger Quervernetzer wurde durch Zugabe von 1M Tris/HCl pH 7,4 abgefangen. Die Proteinlösung wurde danach mit frisch isolierten Zellkernen inkubiert und schließlich mit UV-Licht bei 254 nm bestrahlt, um die zweite Verknüpfung zu erzeugen. In der Hoffnung auf diese Weise unbekannte Proteine markiert zu haben, konnten diese in der folgenden Analyse herausisoliert werden.

## 2.16 Analyse und Isolierung quervernetzter Proteine aus der Kernmembran

Die Zellkerne wurden nach erfolgter Quervernetzung mehrmals in HEPES-Puffer gewaschen, um nicht vernetztes Protein zu entfernen. Anschließend wurden von den Kernen Vesikel erstellt, indem die Zellkerne in einem hypotonem Medium gelöst und mit DNaseI behandelt wurden. Durch das hypotone Medium werden die Zellkerne geöffnet, was die DNase an die kernständige DNA bringt und diese vor Ort abbaut. Anschließend wurde die Vesikelsuspension zentrifugiert. Die pelletierten Vesikel wurden in sehr wenig Puffer resuspendiert auf 1M NaCl und 1% Triton X-100 eingestellt und für eine halbe Stunde inkubiert. Durch verdünnen der Suspension unterschreitet man die kritische Micellenbildungskonzentration von Triton X-100 und bringt so alle solubilisierten Bestandteile der Kernmembran in Lösung. Hierdurch wurden alle peripheren und ein gewisser Teil membranständiger Proteine aus den Vesikeln herausgelöst und ein Kernextrakt erstellt.

Durch Zentrifugation entfernt man alle nicht löslichen Bestandteile der Suspension und konzentriert den Überstand anschließend mittels Ultrafiltration wieder auf.

Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und konnten anschließend im Phosphorimager oder über Westernblot-Analyse auf Markierungen hin untersucht werden.

## **2.17 Markierung von Proteinen**

Die für die Quervernetzungsversuche verwendeten Proteine wurden unterschiedlich markiert. Hsp90, welches aus Rattenleberzellen isoliert wurde, konnte entweder radioaktiv mit  $^{125}\text{J}$  oder durch Biotinylierung markiert werden. Alle in *E.coli* expremierten Proteine, wie die Hsp90 Fragmente der AS 1-237 und AS 238-732, trugen ein endständiges His-tag und konnten über einen speziellen Antikörper (Anti-(His)<sub>5</sub> IgG aus der Maus; Quiagen) im WesternBlot Verfahren spezifisch nachgewiesen werden.

### **2.17.1 Biotinylierung von Hsp90**

Hsp90 wurde zur späteren Detektion sowohl in den Quervernetzungsversuchen als auch in elektronenmikroskopischen Aufnahmen mit Biotin markiert. Für die Arbeiten mit Quervernetzungsreagenzien wurde das Biotin über einen Maleinimidester an Hsp90 gekoppelt, da dieser spezifisch mit endständigen Sulfhydrylgruppen kovalent bindet und somit nicht mit dem Quervernetzungsreagenz in Konkurrenz tritt, welches freie Aminogruppen zur Kopplung benötigt. Für die späteren EM-Aufnahmen wurde das Biotin auch durch einen Succinimidester an Aminogruppen gekoppelt. Die Biotinylierungen lassen sich nach der Proteinauftrennung in einem 12,5% SDS-PAGE im Western-Blot über ein Peroxidase gekoppeltes Avidin nachweisen.

### **2.17.2 Radioaktive Markierung von Proteinen mit dem Radioisotop $^{125}\text{J}$**

Hsp90 und die Proteine der 60S rUE wurden auf zweierlei Weise radioaktiv markiert. Das eine Verfahren folgt der Vorschrift nach Hunter und Greenwood (Hunter & Greenwood 1962). Über das Reduktionsmittel Chloramin-T wird in einer  $\text{Na}^{125}\text{J}$  Lösung Jodid freigesetzt. Nach Zugabe zu einer Proteinlösung reagiert das freie Jodid kovalent mit den Tyrosinseitenketten und markiert hierüber das gesamte Protein radioaktiv. Durch Zugabe von Ascorbat als Oxidationsmittel wird die Reaktion schließlich gestoppt. Überschüssiges

Radioisotop konnte über eine mehrmalige Dialyse gegen HEPES-Puffer aus der Proteinlösung entfernt werden. In einer leichten Abwandlung dieses Verfahrens fand später eine Methode der Firma Pierce (IodoBeads) Verwendung, bei der das Reduktionsmittel durch Bindung an Sepharosekügelchen immobilisiert wurde. Hierzu wurden zwei Sepharosekügelchen für 5 min mit der Na<sup>125</sup>J Lösung vorinkubiert, anschließend die Proteinlösung hinzupipetiert und nach weiteren 15 min die Reaktion durch Trennung der Sepharosekügelchen von der Lösung gestoppt. Anschließend wurde die Proteinlösung wie oben dialysiert. Hierdurch wird die ganze Prozedur ein wenig einfacher und besser kontrollierbarer. Zudem erwies sich diese methodische Abwandlung als schonenderes Verfahren für die Proteine, da das Jodid nicht auf einen Schlag sondern kontinuierlich freigesetzt wurde.

Die Aktivität der Markierung wurde durch Auszählung im Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. Die durchschnittliche Aktivität der Proteinproben lag bei ca. 6 Bq/μg.

## **2.18 Quervernetzungsversuche mit Hsp90 aus Rattenhepatocyten**

Das isolierte Hsp90 wurde wie beschrieben markiert und mit APAI für die Ausbildung einer kovalenten Verknüpfung über den Imidoester unter Lichtausschluss inkubiert. Überschüssiges APAI wurde durch die Zugabe von Tris/HCl pH 7,4 abgefangen. Dann wurde ein Reaktionsansatz erstellt, welcher neben HEPES-Puffer pH 7,4, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM DTT und 4 mM ATP eine entsprechende Menge isolierter Zellkerne enthielt. Die Menge der eingesetzten Kerne richtete sich nach der Menge an verfügbarem Hsp90. Es erwies sich als günstig Hsp90 in einem Verhältnis von 1:1 im Bezug die Menge an Kernmembranprotein einzusetzen. Die Menge an Kernmembranprotein errechnet sich wie oben unter 2.1 beschrieben. Das ergibt bei einer Menge von 1 mg einsetzbarem Hsp90 die Menge von 20 OD isolierter Zellkerne. Der Reaktionsansatz wurde für 20 min unter Lichtausschluss und unter leichtem Rühren bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 10-15 min bestrahlt.

Die Kerne wurden pelletiert und mehrmals gewaschen. Danach wurde ein Kernextrakt erstellt, die Proteine davon aufkonzentriert, in einer SDS-PAGE und über den Phosphoimager, bzw. über Western-Blot analysiert.

## 2.19 Quervernetzungsversuche mit Fragmenten von hHsp90 $\alpha$

Mit den Fragmenten zum einen des N-Terminus mit den Aminosäuren 1-237 (ca. 33 kDa) und zum anderen mit dem C-Terminus mit den Aminosäuren 238-732 (ca. 60 kDa) wurde ähnlich, wie unter 2.18 für das Hsp90 aus der Ratte bereits beschrieben, verfahren.

Einzigster Unterschied bestand darin, dass für diese Versuche das Verhältnis zwischen eingesetzten Kernen und eingesetztem Fragmentprotein ein anderes war, da die Fragmente nicht die gleiche Spezifität aufwiesen wie das isolierte Hsp90. Dies hängt sicherlich zum einen damit zusammen, dass man bei dem Einsatz der Fragmente organismusübergreifend arbeitet, während man beim isolierten Hsp90 innerhalb des Organismus bleibt. Desweiteren spielt sicherlich auch die unterschiedliche Biosynthese der Proteine eine Rolle, da ja inzwischen hinreichend bekannt ist, dass in *E.coli* exprimierte eukaryontische Proteine nicht in allen Details den natürlich exprimierten Proteinen entsprechen. Daher wurde das Mengenverhältnis zwischen Fragmentprotein und Zellkernproteinen auf 2:1 erhöht.

## 2.20 Identifizierung von quervernetzten Proteinen

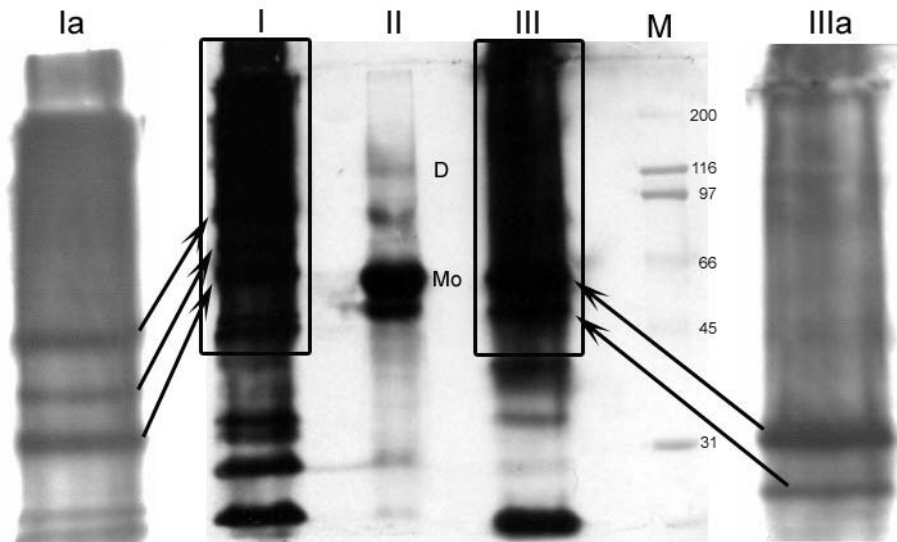
Sowohl in den Autoradiogrammen als auch in den Western-Blots zeigten sich sowohl für das isolierte Hsp90 als auch für die Fragmente Markierungen in unterschiedlicher Größenlage. Eine präzise Zuordnung gestaltete sich jedoch äußerst schwierig, da die Signale in den meisten Fällen unterhalb der Proteindetektionsgrenze lagen, so dass man zwar ein leichtes Signal im Autoradiogramm und im Western-Blot erkennen konnte, dieses jedoch nicht auf Proteinbanden im zugehörigen Gel bzw. auf der Membran projizieren konnte (siehe Abbildungen 2.18-2.21).

In der Abbildung 2.18 können im Kernextrakt zwei Banden im Größenbereich von 75 und 90 kDa klar zugeordnet werden. weitere Banden in oberen Molekularbereichen ließen sich lediglich erahnen.

In weiteren Versuchen konnte sich eine weitere Bande herauskristallisieren, welche sich in Abbildung 2.18 lediglich andeuten ließ (siehe Abbildung 2.19). Diese Bande ließ sich auch über die Quervernetzung des kleineren N-terminalen Fragmentes (AS 1-237) nachweisen, wobei zusätzlich noch eine weitere Bande im Kernextrakt auftrat (siehe Abbildung 2.20). Um ausschließen zu können, dass die Markierung im Western-Blot auf eine unspezifische Kreuzreaktion der Antikörper zurückzuführen ist, wurde stets eine Negativ- und Positivkontrolle mitgeführt. Hierbei wurde stets von einem Teil der präparierten Zellkerne ein Extrakt erstellt, um es in der SDS-PAGE und später im Western-Blot mit zu analysieren. Als

Positivkontrolle diente stets die einfache Proteinprobe des zu vernetzenden Proteins (siehe Abbildung 2.21).

Die Zuordnung zwischen Signal und Proteinbande im Western-Blot blieb jedoch weiterhin äußerst schwierig.



**Abbildung 2.18:** Gezeigt wird der Western-Blot einer Quervernetzung zwischen dem N-terminalen Fragment von Hsp90 (AS 238-732) und isolierten Rattenleberzellkernen über das Reagenz APAI. Unter I. befindet sich das Kernextrakt. II. bezeichnet den Überstand der nach der Quervernetzung und den Waschvorgängen anfiel. Hierbei zeigt sich, dass sich das Fragment nur leicht homolog quervernetzt und als Dimer auftritt (D). Der Großteil im Überstand bleibt als Monomer (Mo) erhalten. Unter III. ist das Ergebnis einer leichten Vorextraktion zu sehen bei der mit 250 mM NaCl in HEPES-Puffer für 15 Minuten extrahiert wurde. Ia und IIIa stellen Vergrößerungen und Kontrastierungen der eingerahmten Bereiche dar. Die Pfeile verweisen zum Größenvergleich in die entsprechenden Originalbereiche.



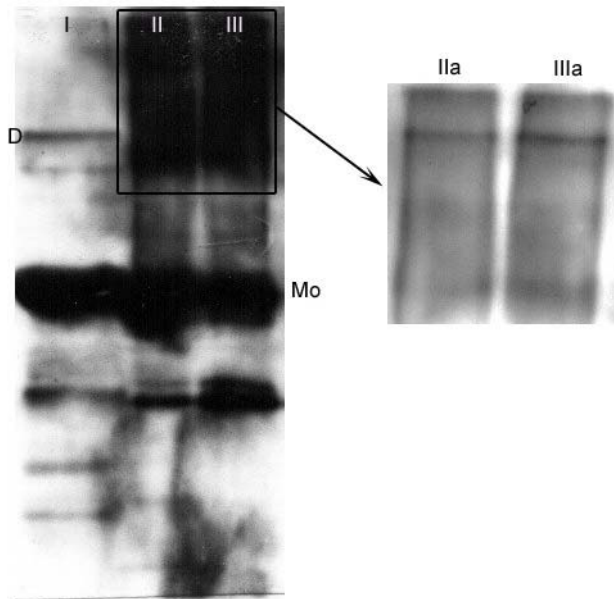
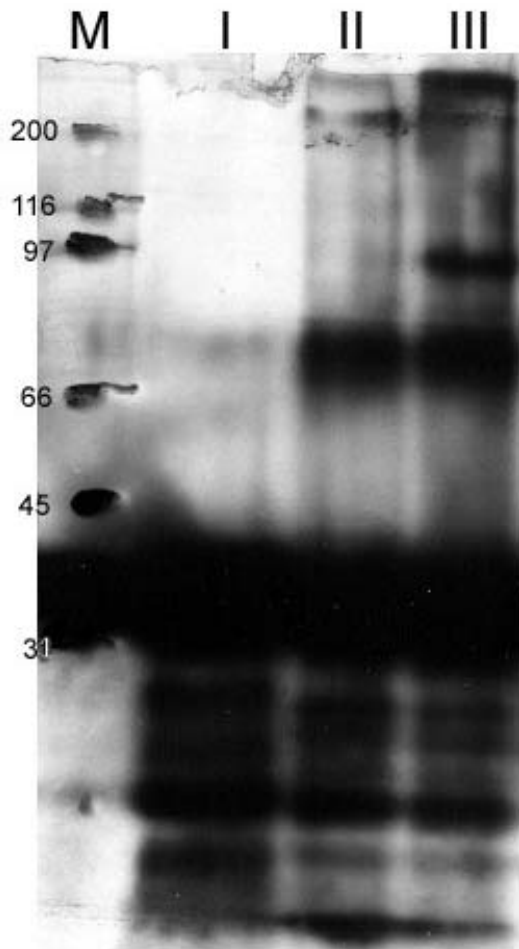


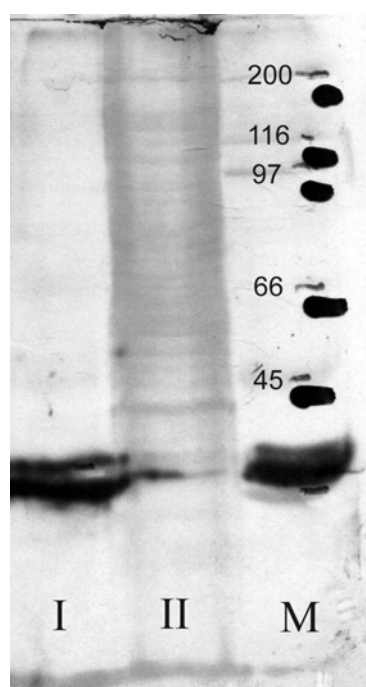
Abbildung 2.19: Dargestellt ist erneut ein Western-Blot, welcher in der ersten Bahn den Überstand nach Quervernetzung und Waschvorgang wiedergibt. Auch hier zeigt sich eine leichte homologe Quervernetzung unter den Fragmentproteinen, das Homodimer wird auch hier mit D gekennzeichnet, das verbliebene Monomer mit Mo. In der zweiten und dritten Bahn sind zwei Kernextrakte aufgeführt, welche beide eine deutliche Bande jenseits der 200 kDa Molekulargewicht aufweisen, was über die jeweilige Vergrößerung und Kontrastierung der entsprechenden Bereiche in den Bahnen IIa und IIIa gut herauskommt. Auch die Bande im Bereich von 90 kDa ist, wenn auch stark diffus, zu erkennen. Ebenso die Bande bei 75 kDa, welche ebenfalls in der Abbildung 2.18 klarer hervortritt, deutet sich hier an.



**Abbildung 2.20:**

Die Quervernetzung des N-terminalen Fragments (AS 1-237) gestaltete sich ähnlich wie die des C-Terminus. Lediglich die Ausbeute lag deutlich niedriger. In der ersten Bahn ist erneut der Überstand nach der Quervernetzung und anschließendem Waschvorgang gezeigt. Deutlich erkennbar ist, dass ein großer Teil des Fragments nicht gebunden hat und rausgewaschen wurde. Interessanter Weise geht hierbei das Homodimer nicht in die Lösung über sondern tritt erst mit den Kernextrakten der Bahnen II +III, dort aber deutlich, auf. In der zweiten und dritten Bahn zeigt sich eine Bande jenseits der 200 kDa, welche der Bande wie sie in Abbildung 2.19 zu sehen ist stark ähnelt. In der dritten Bahn tritt zusätzlich eine Bande bei 90 kDa deutlich zu Tage. Bei genauer Betrachtung ist auch eine sehr diskrete Bande oberhalb der dominanten Dimerbande bei etwa 75 kDa zu erkennen.

Dies machte natürlich auch eine Analyse durch eine partielle Sequenzierung unmöglich. Es wurden daher präparative Gele erstellt und die betreffenden Bereiche ausgeschnitten und die Proteine anschließend aus dem Gel rückeluiert. Die Gele wurden hierfür in einer Coomassie-Blue Färbelösung ohne Essigsäure angefärbt und in 50% Methanol wieder entfärbt. Die interessanten Gelbereiche wurden herausgeschnitten, zerkleinert und in eine Rückelutionskammer gegeben. Die Rückelution erfolgte über einen Zeitraum von 5 h bei RT. Die Anodenfalle, in welcher sich die eluierten Proteine sammeln, wurde regelmäßig entleert und die entnommenen Lösungen vereinigt.



**Abbildung 2.21:**

Kontrolle der Quervernetzungsversuche. In der ersten Bahn des Western-Blots wurde das N-terminale Fragment als Positivkontrolle mitlaufen gelassen. In der zweiten Bahn lief ein erstelltes Kernextrakt als Negativkontrolle mit. Im Kernextrakt trat keinerlei Signal auf. Die mit Amidoschwarz gefärbte Membran ist durch den Film hindurch zu erkennen. Eine weitere Positivkontrolle liefert der Marker, bei dem die 31 kDa Proteinbande in allen Western-Blots angefärbt werden konnte.

Die Gesamtmenge an Eluat wurde anschließend mittels Ultrafiltration und danach in der Speedvac wieder aufkonzentriert. Die Konzentrate konnten dann in einer erneuten SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot erneut untersucht werden. In den seltensten Fällen konnten nachher distinkte Banden erkannt und zugeordnet werden, da sich meistens ein breiter Schmier über die Gesamte Gelbahn ausbildete. Dennoch zeigte sich, dass drei Proteinbanden auf dies Art und Weise soweit angereichert werden konnten, dass sie auf der PVDF-Membran nach Amidoschwarzfärbung in der Form zu erkennen waren, dass sie ausgeschnitten und der Proteinsequenzierung zugeführt werden konnten.

Die ausgeschnittenen Membranstücke wurden an das MPI für Biochemie Abteilung Proteinchemie in München Martinsried geschickt und von Dr. Mann nach LysC-Spaltung vom N-Terminus ausgehend sequenziert.

## 2.21 Ergebnisse der Proteinsequenzierungen

Die Proteinbanden mussten von der Membran herunter gespalten werden, da der Quervernetzer nicht spaltbar und somit das Hsp90 Fragment nicht von dem markierten Protein getrennt werden konnte. Somit konnte man nicht einfach vom N-Terminus aus sequenzieren, da ansonsten stets ein Gemisch an abgespaltenen Aminosäuren auftreten würde. Zudem war die Proteinmenge trotz aller Bemühungen äußerst dürftig, so dass lediglich von einer der drei eingeschickten Banden Fragmente nach dem LysC-Verdau ansequenziert werden konnten. Bei dieser Bande handelt es sich um jene, welche bei ca. 250 kDa gefunden und herausgeschnitten wurde.

Zwei der erzielten Fragmente konnten dabei sequenziert werden, und ergaben folgendes Ergebnis:

1. Sequenz: CKESW
2. Sequenz: NRGLPP

Beide Sequenzen stammen nicht vom Hsp90 Fragment (AS 238-732), daher sind sie einem anderen Protein zuzuordnen. Über eine Sequenzdatenbankrecherche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) wurde versucht, diese Sequenzen bereits bekannten Proteinen zuzuordnen. Beide Sequenzen stammen von Fragmenten, welche aus der selben Bande erstellt worden sind. Entsprechend sollten die Sequenzen auf dasselbe Protein hindeuten.

Die Suche für die Sequenz CKESW ergab folgende Treffer mit 100 Prozentiger Übereinstimmung:

- 1.) KIAA0864 Protein [Homo sapiens]
- 2.) AK007566 vermutlich [Mus musculus]
- 3.) Nup57 Protein [Saccharomyces cerevisiae]
- 4.) Kallmann Syndrom Protein [Gallus gallus]
- 5.) Hypothetisches Protein W05B5.2 [Caenorhabditis elegans]
- 6.) Pankretischer Polypeptidrezeptor Y4 [Cavia porcellus]

Für die Sequenz NRGLPP wurden folgende Proteine ermittelt, bei denen die Sequenz zu 100% Übereinstimmung zeigt:

- 1.) Inositol Polyphosphat 5-Phosphatase [Homo sapiens]
- 2.) Phenylalanin Ammonium Lyase [Homo sapiens]
- 3.) RNA2 Polyprotein [Wheat yellow mosaic virus]
- 4.) Hypothetisches Protein Y53G8AR.a [Caenorhabditis elegans]
- 5.) Protoporphyrin IX Magnesium Chelatase [Methanococcus jannaschii]

Mit einer Übereinstimmung von 83,3 Prozent wurde jedoch erneut Nup57 [*Saccharomyces cerevisiae*] angegeben. Die Sequenzübereinstimmung lautet hier:

gefundene Sequenz: NRGLPP  
Übereinstimmung: NRGLP-  
Nup57 AS 424-428: NRGLPL

Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass es sich bei dem, über eine Quervernetzung mit dem Hsp90-Fragment (AS 238-732) markierten Protein um ein homologes Protein von Nup57 aus *Saccharomyces cerevisiae* handeln könnte. Bei höheren Eukaryoten wurde das Nucleoporin p54, welches am p62-Komplex beteiligt ist, als dem Nup57p aus *S.cerevisiae* homologes Protein beschrieben. Überprüfungen der Sequenzen ergaben in diesem Fall aber kaum Übereinstimmungen.

Die Sequenz von Nup57p aus *S.cerevisiae* lautet folgendermaßen, die gefundenen Sequenzen sind hierbei farblich hervorgehoben.

1	MFGFSGSNNG	FGNKPAGSTG	FSFGQNNNNT
31	NTQPSASGFG	FGGSQPNSGT	ATTGGFGANQ
61	ATNTFGSNQQ	SSTGGGLFGN	KPALGSLGSS
91	STTASGTTAT	GTGLFGQOTA	QPQOSTIGGG
121	LFGNKPTTTT	GGLFGNSAQN	NSTTSGGLFG
151	NKVGSTGSLM	GGNSTQNTSN	MNAGGLFGAK
181	PQNTTATTGG	LFGSKPQGST	TNGGLFGSGT
211	QNNNTLGGGG	LFGQSQQPQT	NTAPGLGNTV
241	STQPSFAWSK	PSTGSNLQQQ	QQQQIQVPLQ
271	QTQAIAQQQQ	LSNYPQQIQE	QVLK <b>CKESWD</b>
301	PNTTKTKLRA	FVYNKVNETE	AILYTKPGHV
331	LQEEWDQAME	KKPSPQTIPI	QIYGFEGLNQ
361	RNQVQTEVA	QARIILNHIL	EKSTQLQQKH
391	ELDTASRILK	AQSRNVEIEK	RILKLGTQLA
421	TLK <b>NRGLPLG</b>	IAEEKMWSQF	QTLLQRSEDP
451	AGLGKTNELW	ARLAILKERA	KNISSQLDSK
481	LMVFNDDTKN	QDSMSKGTGE	ESNDRINKIV
511	EILTNRQRGI	TYLNEVLEKD	AAIVKKYKNK
541	T		

Die Übereinstimmung beider Proteinsequenzen zwischen Nup57p und p54 beträgt ca. 45 Prozent. Da die gefundenen Sequenzen in diesem Protein jedoch nicht wiederzufinden sind muss man davon ausgehen, dass es sich um ein anderes Homolog zu scNup57p handelt, welches über die Proteindatenbank zur Zeit nicht ermittelbar ist.

Auch die Laufweite der Bande lässt auf ein anderes Protein schließen, da das Fragment von einer Proteinbande jenseits der 200 kDa stammt.

## 2.22 Erstellung eines mit kolloidalem-Gold markierten Antikörpers

Diese Präparation erfolgte gemäß den Vorschriften von Slot und Geuze (Slot & Geuze 1985) und Baschong und Wrigley (Baschong & Wrigley 1990).

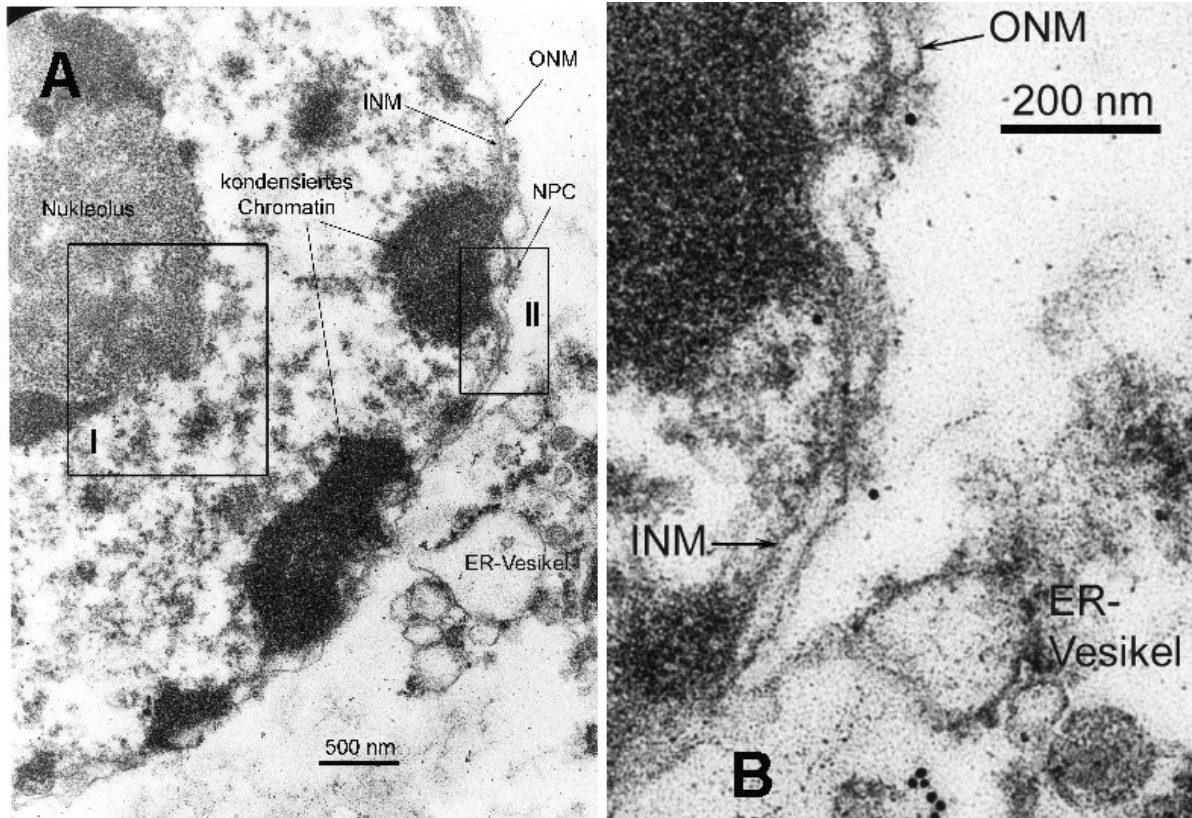
Um zu bestimmen bis zu welcher maximalen Konzentration der Antikörper-Goldkomplex stabil ist, wurde ein Flocculations-Test durchgeführt. Hierfür wurden auf einen Parafilm jeweils 5 µl einer Antikörperverdünnungsreihe aufgetropft. Die Tropfen wurden mit 25 µl Gold-Kolloid-Lösung und anschließend mit 25 µl einer 10%igen NaCl-Lösung vermischt. Die Konzentration bei der ein erster Farbumschlag von leicht rötlich in ein schwaches blau zu beobachten ist kennzeichnet die kritische Konzentration bei welcher der Protein-Goldkomplex instabil zu werden beginnt. Für die spätere Komplexbildung nimmt man dann das doppelte

der kritischen Konzentration als Maßstab für die einzusetzende Proteinmenge. Die entsprechende Menge Antikörper wurde dann mit den Goldkolloiden vermischt und für 15 Minuten gerührt. Der Ansatz wird auf mit eine BSA-Lösung auf eine Endkonzentration von 0,1% BSA eingestellt und für weitere 10 Minuten gerührt. Die Lösung wurde zentrifugiert und das lockere Sediment in Puffer mit 0,1% BSA resuspendiert.

### **2.23 Elektronenmikroskopische Lokalisation von endogenem Hsp90 $\alpha$**

Um die Lokalisation von Hsp90 im Bereich der Zellkernmembran genauer zu charakterisieren, sollten elektronenmikroskopische Aufnahmen von verschiedenen Inkubationsansätzen gemacht werden. Hsp90 und dessen Fragmente (AS 1-237 und 238-732) wurden hierfür mit den Zellkernen bei 4°C über Nacht inkubiert, da eine Inkubationszeit von 1h bei RT keinen Erfolg brachte. Die Zellkerne wurden gewaschen und anschließend entweder mit Streptavidin-Gold (8 nm Durchmesser) oder dem entsprechenden goldmarkiertem Antikörper konfrontiert, für eine Stunde bei RT inkubiert und anschließend gewaschen. An dieser Stelle wurden auch die Proben erstellt, bei denen die Zellkerne lediglich mit dem Antikörper inkubiert wurden. Diese Proben sollten dazu dienen den Hintergrund für die EM-Aufnahmen bestimmen zu können. Danach wurden die Zellkerne mit Glutardialdehyd fixiert, erneut gewaschen und in Agar eingebettet.

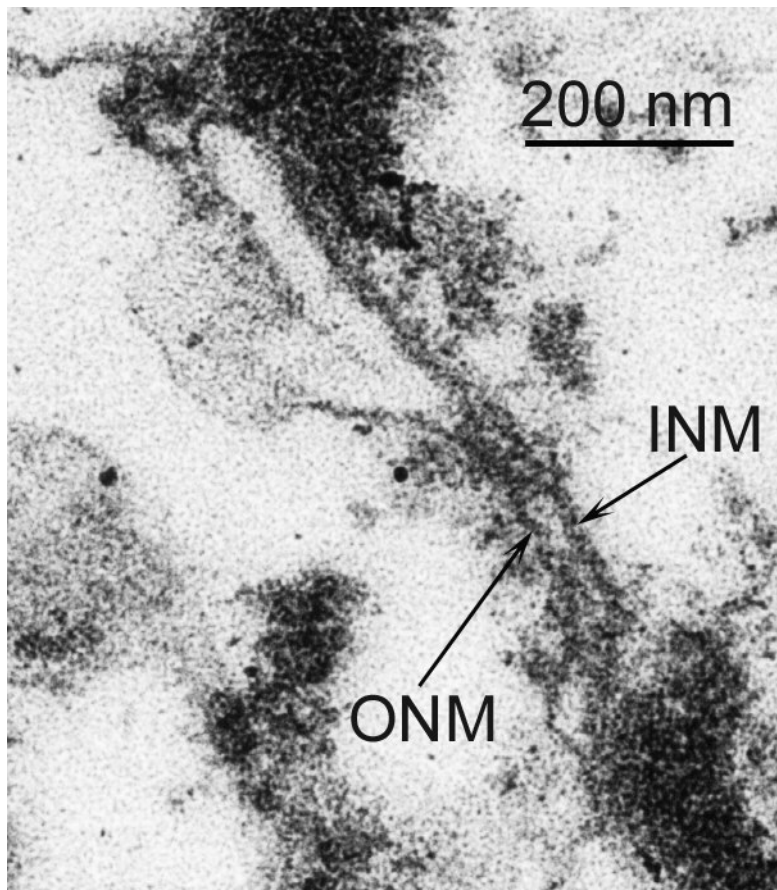
In einer 0,5%igen Osmiumtetroxidlösung wurden die Kernmembranen angefärbt, um für die Aufnahmen einen stärkeren Kontrast zu erzeugen. Nach einem weiteren Waschschrift wurde die Probe entwässert in Harz eingebettet und geschnitten. Versuche durch die Inkubation der Zellkerne mit Hsp90 die Signalhäufigkeit zu erhöhen, schlugen allesamt fehl.



**Abbildung 2.22:**

Das Bild A zeigt eine Übersicht über einen präparierten Rattenhepatozyten Zellkern. Die Innere- und Äußere-Kernmembran (INM und ONM) sind angezeigt. Im rechten unteren Teil sind kleinere ER-Vesikel zu erkennen, welche auch in der Vergrößerung auftreten. Die beiden Rahmen geben die Bereiche an welche im folgenden vergrößert dargestellt wurden. In dieser Abbildung ist lediglich der Rahmen Nr. II vergrößert als Bild B dargestellt. Hier erkennt man mehrere Goldpartikel, von denen etliche an den ER-Vesikeln gebunden vorliegen. Zwei Partikel sind jedoch direkt am Kernporenkomplex lokalisiert. Einmal in der äußeren cytoplasmatischen Peripherie des Kernporenkomplexes und einmal zentral auf der cytoplasmatischen Seite. Einen weiteren Partikel erkennt man an der INM knapp oberhalb des unteren NPC.

Es konnte weder biotinyliertes Hsp90 über Streptavidin-Gold bzw. einen goldmarkierten Anti-Hsp90 $\alpha$ (N-17)-IgG, noch die Hsp90-Fragmente über einen goldmarkierten Anti-(His)<sub>5</sub>-Tag IgG detektiert werden. Auch der goldmarkierte Anti-(His)<sub>5</sub>-Tag IgG zeigte kein Signal. Lediglich der Anti-Hsp90 $\alpha$ (N-17)-IgG allein wies nach der Inkubation mit den Zellkernen Signale auf (siehe Abbildungen 2.22-2.26).

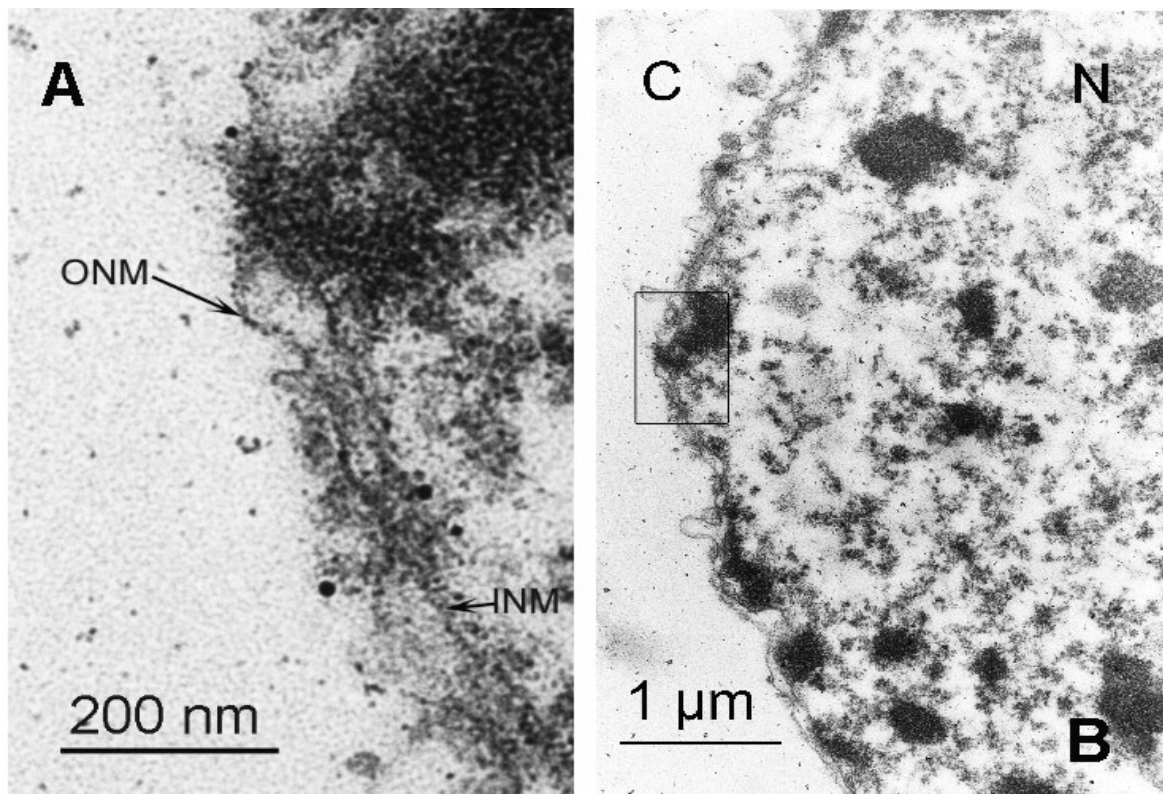


**Abbildung 2.23:**

Das Bild zeigt eine stark vergrößerte Kernpore knapp oberhalb der Bezeichnung für die Innere- und Äußere-Kernmembran. Auch hier ist eine Goldmarkierung zu erkennen, welche sich im Bereich der cytoplasmatische Fibrillen befindet.

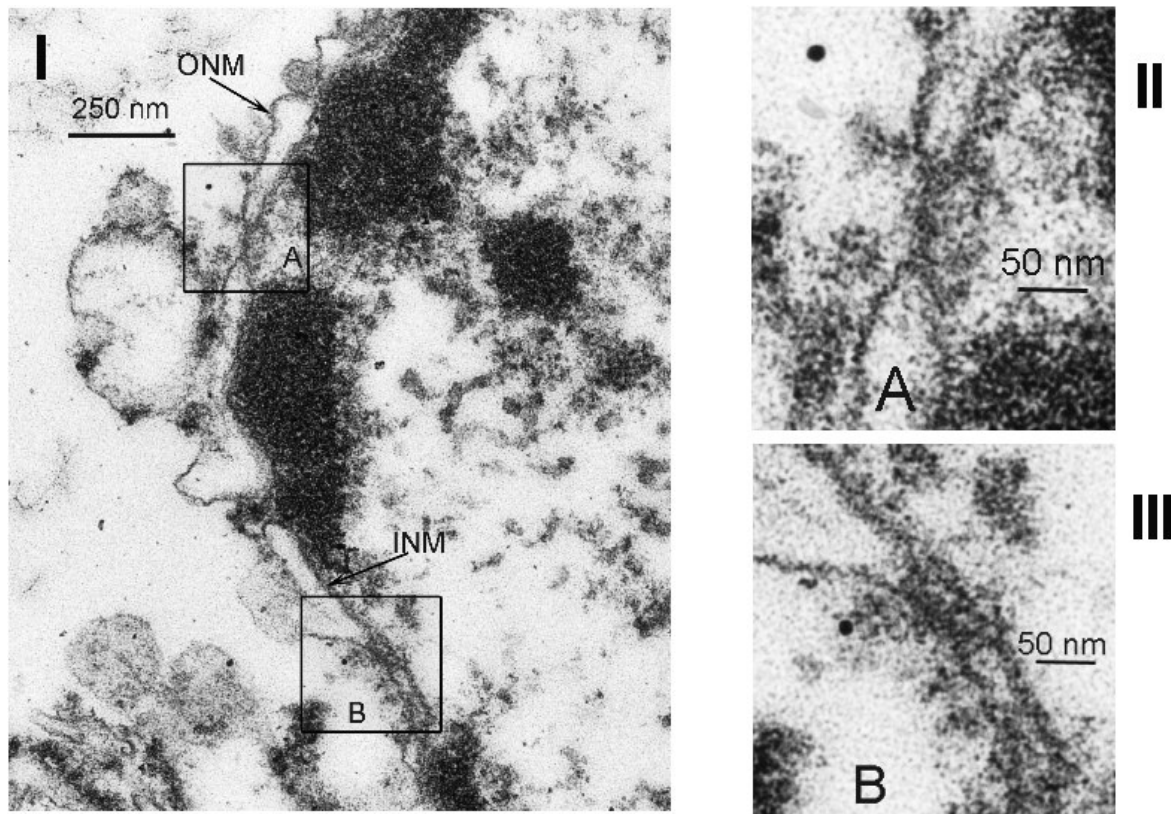
Die Aufnahmen zeigen Signale im Bereich der Kernmembran, und hierbei überwiegend auf der cytoplasmatischen, weniger auf der nukleoplasmatischen Seite. Einige Goldpartikel konnten in unmittelbarem Kontakt zum Kernporenkomplex gefunden werden, andere befanden sich wiederum im Nukleoplasma. Größere Aggregate wurden jedoch nur außerhalb des Zellkerns detektiert, alle anderen Signale waren relativ separiert von einander.



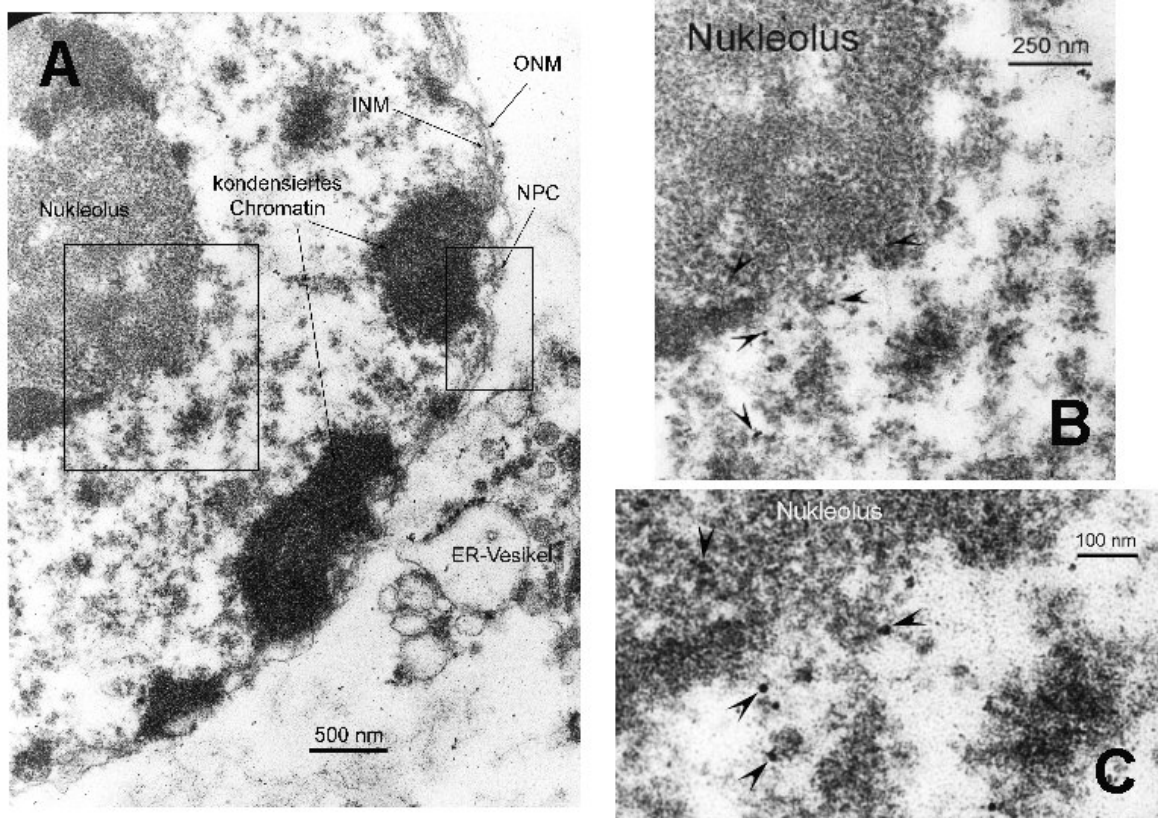


**Abbildung 2.24:**

Hier ist in Bild A eine Vergrößerung des eingerahmten Ausschnitts aus Bild B dargestellt. Hierbei zeigt sich neben einer Goldmarkierung an der cytoplasmatischen Fibrille auch eine Markierung auf der nukleoplasmatischen Seite des Kernporenkomplexes. Die Erkenntnis, dass sich Hsp90 auch auf der nukleoplasmatischen Seite des NPC detektieren lässt, könnte für das Verständnis über den Einfluss von Hsp90 auf den Export von 60S rUE aus dem Zellkern von großer Wichtigkeit sein.

**Abbildung 2.25:**

Das Bild I zeigt den Ausschnitt eines Zellkerns und die Bilder II und III die jeweilige Vergrößerung der in Bild I eingerahmten Bereiche A und B. In Bild II findet sich eine Markierung in einem Abstand zur cytoplasmatischen Seite des Kernporenkomplexes. Hierbei könnte es sich um eine Markierung von mit der Kernmembran bzw. dem Kernporenkomplex assoziiertem Cytoskelett handeln. Bild III zeigt eine cytoplasmatische Markierung an den NPC.



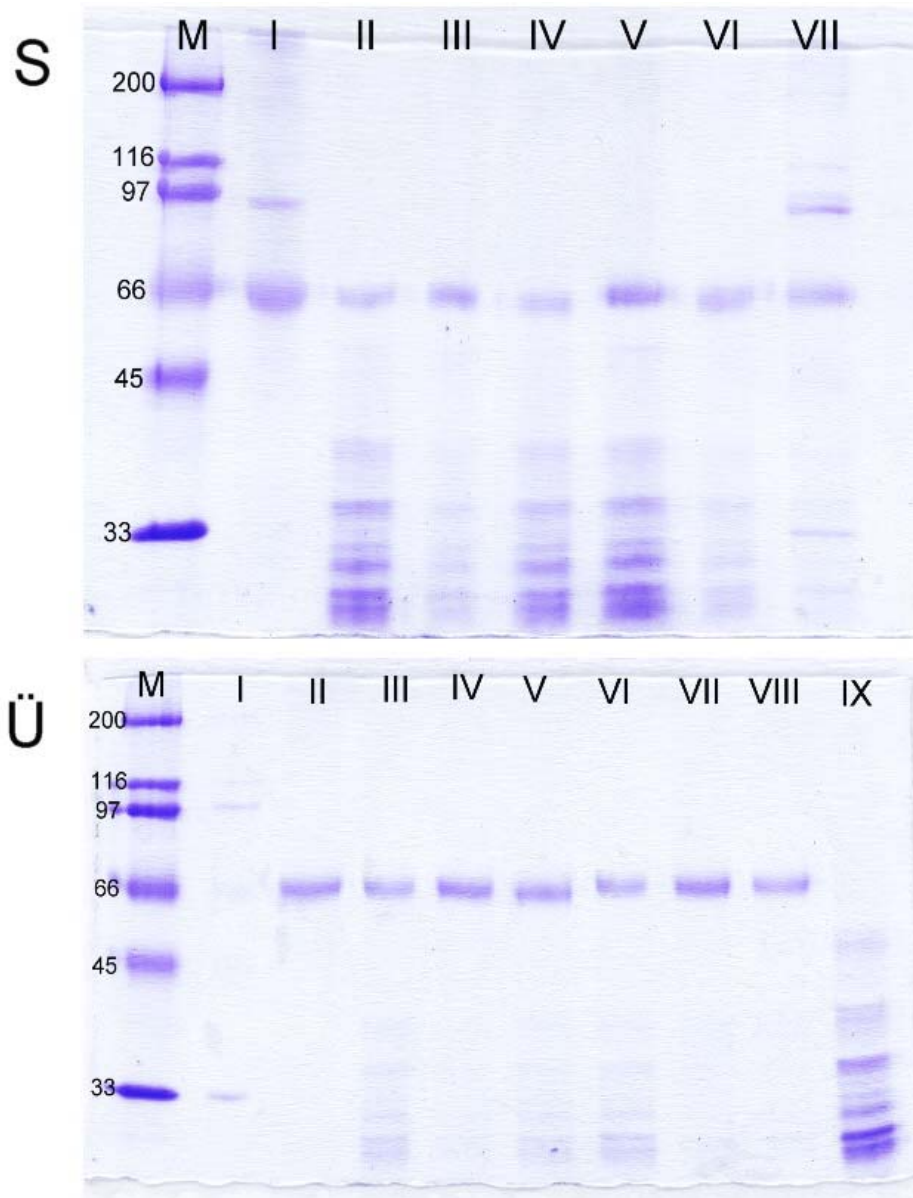
**Abbildung 2.26:**

In diesen Bildern wird gezeigt, dass sich die Markierungen keineswegs auf die Cytoplasmatische Seite bzw. auf die unmittelbare Umgebung der Kernmembran beschränken. Der Rahmen im Bereich des Nucleolus von Bild A zeigt den Bereich an, aus welchem die Vergrößerungen in Bild B und C entstammen. Dies zeigt, dass Hsp90 über das Nukleoplasma verteilt und auch im Bereich des Nucleolus zu finden ist. Vergleichbar dazu ist die Abbildung 2.22.

## 2.24 Untersuchung von Wechselwirkung zwischen Hsp90 und 60S rUE

Da Hsp90 Einfluss auf den Export ribosomaler Untereinheiten aus dem Zellkern nimmt, liegt die Vermutung nahe, dass dabei auch eine direkte Assoziation zwischen Hsp90 und den 60S rUE eine Rolle spielen könnte.

Um dies zu untersuchen wurden zweierlei Wege verfolgt. Zum einen wurde nachzuvollziehen versucht, inwieweit Hsp90 60S rUE co zu präzipitieren vermag. Hierzu wurde Hsp90 an eine aktivierte Sepharose gekoppelt. Das immobilisierte Hsp90 wurde dann zusammen mit 60S rUE für 10 Minuten inkubiert anschließend wurde die Lösung scharf zentrifugiert, der Überstand abgenommen und sowohl das Sediment als auch der Überstand mit Probenpuffer versetzt, aufgeköcht und in einer 12,5% SDS-PAGE analysiert.

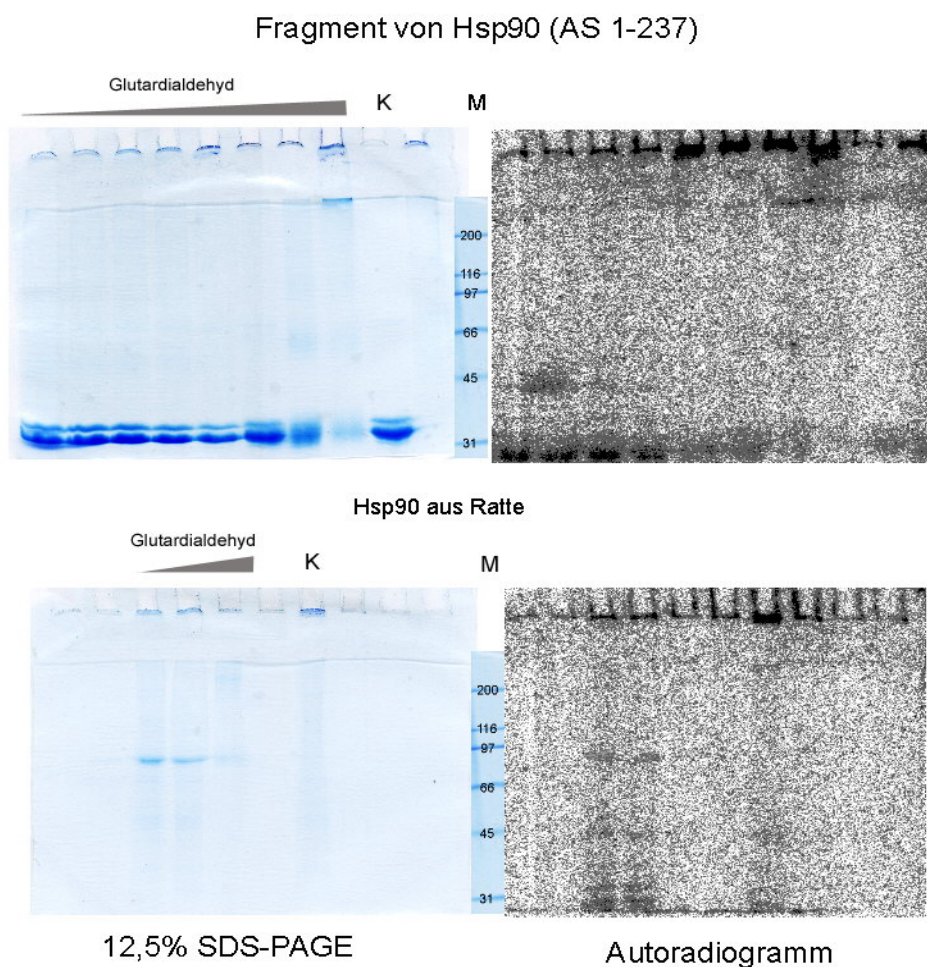


**Abbildung 2.27:**

Die beiden Gele spiegeln das Ergebnis wieder, welches durch die Copräzipitation von 60S rUE durch immobilisiertes Hsp90 erzielt wurde. Das obige Gel gibt hierbei die Proteinzusammensetzung des Sediments, das untere die des Überstandes wieder. In der ersten Probe wurde lediglich das immobilisierte Hsp90, der Überstand dieser Probe befindet sich jedoch in der Bahn VIII des unteren Geles, wo die erste Bahn nach dem Marker (M) freigelassen wurde, eingesetzt. Zu allen anderen Proben wurden etwa 1 OD 60S rUE zugegeben. Die Proben 3-5 wurden in der Reihenfolge mit 0,5 mM Novobiocin (III); 0,5 mM Geldanamycin (IV) und 0,5 mM Radicicol (V) inkubiert. Die Probe Nr. VI wurde mit 40  $\mu$ U CKII inkubiert. Die Probe VII + VIII entspricht der Probe VI bis auf die Tatsache, dass hier die  $Mg^{2+}$ -Ionen für die ATP-Hydrolyse im Ansatz fehlten. Die Bahn IX im unteren Gel zeigt den Überstand einer Probe in welcher lediglich 60S rUE mit Agarose eingesetzt wurden, um zu zeigen, dass diese nicht allein über unspezifische Assoziationen mit der Agarose sedimentieren.



Es zeigte sich, dass mit dem immobilisierten Hsp90 der Großteil der eingesetzten 60S rUE gefällt wurden. Andererseits konnte durch Einsatz von Novobiocin, Geldanamycin und Radicicol oder durch die Phosphorylierung von Hsp90 die Copräzipitation zumindest teilweise unterbunden werden. Es zeigte sich, dass insbesondere die Zugabe von Novobiocin die Bindung zwischen Hsp90 und den 60S rUE zu verhindern vermag, denn hier war bei einer Konzentration von 0,5 mM Novobiocin der Verbleib der 60S rUE im Überstand besonders deutlich.



**Abbildung 2.28:**

Die Fixierung (steigende Glutaraldehydkonzentrationen) zeigt gegenüber der Kontrolle (K) einen Unterschied im Bandenmuster. Der Bereich bei 90 kDa zeigt beim Hsp90 leichte Mengen von Radioaktivität. Diese können an und für sich nur dann auftreten, wenn es zu einer Interaktion zwischen Hsp90 und den  $^{125}\text{J}$ -markierten 60S rUE gekommen ist. Ob das Fragment im oberen Gel eine ähnliche Assoziation hervorruft, lässt sich nicht bestimmen, da die größten Proteine der 60S rUE ebenfalls bei 30 kDa laufen, und in ihrem Anteil an Radioaktivität dann deutlich dominieren. In den obigen Proben wurde das Glutaraldehyd in den Konzentrationen 0,005; 0,001; 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,5 und 1 % zugesetzt. In dem unteren Gel wurde mit 0,01; 0,05 und 0,1 % fixiert.

Desweiteren wurde in diesem Zusammenhang versucht festzustellen, ob auch bei der eigentlichen Translokation der 60S rUE über die Kernmembran ebenfalls eine Assoziation zwischen Hsp90 und 60S rUE detektierbar ist. Dazu wurden Vesikel wie unter 2.2 beschrieben präpariert und mit  $^{125}\text{J}$  radioaktivmarkierten 60S rUE beladen. Es wurde ein Inkubationsansätze erstellt, welche neben Hsp90 (Ratte) bzw. dem Hsp90-Fragment (AS 1-237), 4 mM ATP, 2 mM DTT und 5mM  $\text{Mg}^{2+}$  in HEPES-Puffer enthielten.

Die Ansätze wurden bei 37°C vorinkubiert. Schließlich sind, wie bei einer Endpunktbestimmung beschrieben, die Vesikel zugegeben worden, um einen Transport zu simulieren. Nach 5 Minuten weiterer Inkubationszeit wurde die Ansätze auf Eis gestellt und zu den Ansätzen steigende Konzentration Glutaraldehyd zugegeben, um die Proteine zu fixieren und damit den Transport einzufrieren. Die Proben wurden dann mit Probenpuffer versetzt, aufgekocht und über eine 12,5%ige SDS-PAGE analysiert (siehe Abbildung 2.28). Es zeigt sich in beiden Fällen sowohl bei den Proben mit Hsp90 (Ratte) als auch bei denen mit dem rekombinanten Hsp90-Fragment (AS 1-237), dass das entsprechende Autoradiogramm eine wenn auch sehr schwache radioaktive Markierung im Bereich der jeweiligen Proteine, also bei etwa 90 kDa bzw. 33 kDa, aufweist. Interessanter Weise zeigt sich auch ein anderes Verhalten der Proteinbanden bei steigender Glutaraldehyd Konzentration. Während bei den Hsp90-Proben die Vernetzung schon bei sehr geringen Konzentrationen einsetzt, so dass bereits in der vierten Gelbahn keine Proteinbanden mehr im Trenngel zu erkennen sind, beginnt die Vernetzung bei den Fragmentproben erst bei höheren Glutaraldehydkonzentrationen und erreicht erst in der letzten Bahn einen derartigen Vernetzungsgrad, dass der Komplex nicht mehr in das Trenngel einzuwandern vermag. Dies bedeutet, dass die Probe mit Hsp90 einen wesentlich höheren Vernetzungsgrad besitzt, als die mit dem N-terminalen Fragment von Hsp90.

Dies könnte auch ein Hinweis dafür sein, dass der Kontakt zu den 60S rUE über den N-Terminus von Hsp90 erfolgt, aber über den C-Terminus eine Verbindung zum Kernporenkomplex besteht, was die stärkere Vernetzung erklären könnte.

### 3. Diskussion

#### 3.1 Warum ausgerechnet Hsp90?!

In vorangehenden Arbeiten konnte Hsp90 als cytosolischer, den Export von 60SrUE beeinflussender Faktor identifiziert und näher charakterisiert werden (Schlatter 1997, Rosmus 2000, Langer 2001).

Diese Arbeiten gaben etliche Indizien preis, welche die beobachtete Wirkung von Hsp90 zu untermauern vermögen. Mit Geldanamycin verfügt man über einen sehr spezifisch im Bereich der N-terminalen ATP-Bindungsstelle assoziierenden Faktor, welcher alle bisher bekannten Aktivitäten von Hsp90 signifikant reduziert (Chadli et al. 1999; Czar et al. 1997; Jakob et al. 1995; Neckers et al. 1999; Schnaider et al. 2000; Stebbins et al. 1997; Whitsell et al. 1998). Zudem konnte gezeigt werden, dass Geldanamycin in Oocyten coinjiziert auch *in vivo* sehr spezifisch bindet und die Wirkung von endogenem Hsp90 signifikant zu beeinflussen vermag (Uzawa et al. 1995). Im Hinblick auf den Export 60S rUE aus dem Zellkern konnte der Einsatz dieses Ansamycins sowohl in *in vitro* wie auch in *in vivo* Studien zeigen, dass zum einen die über Hsp90 hervorgerufene Steigerung des 60S rUE Exports aus isolierten Zellkernen zumindest teilweise wieder aufgehoben werden konnte, zum anderen ein unmittelbarer Zusammenhang zwischen dem Einsatz von Geldanamycin und der Exportrate von 60S rUE auch in Oocyten feststellbar ist. Vergleichbares zeigte sich bei dem Einsatz weiterer an Hsp90 bindender Substanzen, wie Radicicol und Novobiocin. Von Radicicol wurde geschrieben, dass es ähnlich wie Geldanamycin im Bereich der ATP-Bindungsstelle am N-Terminus des Proteins zu binden vermag. Die Röntgenstrukturanalysen des N-Terminus in Verbindung mit Radicicol konnten dies eindeutig bestätigen, wobei die Wechselwirkungen schon allein aufgrund der sterischen Größenunterschiede beider Stoffe von leicht unterschiedlicher Natur sind. Der Unterschied in der Lokalisation der Bindung zwischen Geldanamycin und Radicicol wird jedoch weder im *in vitro* noch im *in vivo* Transportversuch wirklich signifikant deutlich. Beide Substanzen beeinflussen den Transport mit gleicher Wirkung, nämlich dass der Effekt von Hsp90 im *in vitro* Versuch eliminiert und *in vivo* deutlich reduziert werden konnte. Ein weiterer Aspekt in dieser Richtung ergab sich durch den Einsatz von Novobiocin. Dieses Antibiotikum, welches als Inhibitor der bakteriellen DNA GyraseB bekannt wurde, zeigte eine ebenso deutliche Affinität zu Hsp90. Es konnte bis dato jedoch nicht klargestellt werden in welchem Bereich von Hsp90 es seine spezifische

Bindungsstelle besitzt. Es besetzt bei der Inhibierung der Gyrase eine dafür typische ATP-Bindungsstelle. Bei Hsp90 konnte eine Bindung an die bisher einzig bekannte ATP-Bindungsstelle des Proteins an dessen N-Terminus nicht gezeigt werden. Vielmehr geht man aufgrund unterschiedlicher Studien inzwischen davon aus, dass Novobiocin seine Bindungsstelle im Bereich der Aminosäuren 538-728, wahrscheinlich den Aminosäuren 657-677, des C-Terminus von Hsp90 besitzt und folgert daraus, dass auch der C-Terminus von Hsp90 über eine ATP-Bindungsstelle verfügt, welche der entsprechenden Domäne der angesprochenen Gyrase strukturell ähnlich sein könnte (Marcu et al. 2000 a +b). Auch der Einsatz dieses Antibiotikums in den beiden Transportsystemen erzielt die Effekte, welche bereits von Radicicol und Geldanamycin bekannt sind. Wenn man also die Ergebnisse aller *in vitro* und *in vivo* Transportmessungen zusammennimmt, ergibt sich ein sehr schlüssiges Bild. Alle getesteten Substanzen reduzieren sowohl den über die Zugabe von Hsp90 erzielten exportfördernden Effekt im Vesikelmesssystem, als auch die natürliche Exportrate von 60S rUE aus Oocytenzellkernen. Alle Substanzen zeigten dabei ähnliche Wirkungsprofile. Dies drückt sich auch in dem Verhältnis zwischen eingesetzter Dosis und erzielter Wirkung aus, da Geldanamycin und Radicicol mit 0,2 mM cytoplasmatischer Konzentration eine vergleichbare Wirkung in der Oocyte hervorriefen wie Novobiocin mit einer Endkonzentration von 0,5 mM, was gerade einmal einen Faktor von 2,5 ausmacht. Die etwas höhere Konzentration die bei Novobiocin benötigt wird, lässt auf eine etwas geringere Assoziationskonstante für Novobiocin an Hsp90 schließen. Auch die *in vitro* Studien zeigen ein ähnliches Ergebnis beim Dosis-Wirkungs-Verhältnis (Langer 2001). In jedem Fall muss man jedoch deutlich machen, dass der Effekt *in vivo* nicht oder nicht gänzlich der Inhibierung von Hsp90 zugesprochen werden muss, da ebenso auch andere Faktoren durch die Zugabe eines einzelnen der Inhibitoren in ihrem Wirken eingeschränkt werden können. Da sich der Effekt jedoch unabhängig voneinander bei allen an Hsp90 bindenden Faktoren mit vergleichbarer Intensität zeigt, kann man davon ausgehen, dass die Reduzierung der Transportrate von 60S rUE aus Oocyten Zellkernen signifikant auf die direkte Beeinflussung von Hsp90 zurückzuführen ist. Es wurde bisher an mehreren Stellen beschrieben, dass eine Bindung von Geldanamycin Einfluss auf die Bindung von Hsp90 Partnerproteinen am C-Terminus hervorruft. Genauso ließ sich die Assoziation von Geldanamycin über vorangehende Novobiocin Inkubation reduzieren. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass beide Termini von Hsp90 sich gegenseitig stark zu beeinflussen vermögen (Roe et al.1999). Letztlich wird das genaue Zusammenspiel und damit das Wirkungsprinzip von Hsp90 erst dann verstanden



werden können, wenn man den physiologischen Daten genaue strukturelle Daten des Gesamtproteins zugrunde legen kann.

Die Hsp90 Familie stellt eine über die Organismen hinweg extrem stark konservierte Proteinfamilie dar, bei der sich die homologen Proteine von *E.coli* über alle Eukaryoten bis hin zum Menschen in weniger als 40% der Aminosäuren unterscheiden (Bartwell & Craig 1987, Lindquist & Craig 1988). Zwischen pro- und eukaryotischen Zellen lässt sich der deutlichste Unterschied zwischen den Hsp90 Vertretern feststellen. Zum einen unterscheiden sich die geladenen Domänen zwischen N- und C-Terminus erheblich, zum anderen ist Hsp90 für die Hefezelle absolut essentiell, während *E.coli* auch ohne HtpG überleben kann, obwohl sich beide Vertreter physikochemisch kaum unterscheiden (Bartwell & Craig 1988, Brokowitsch et al. 1989).

Die Oligomerisierung von Hsp90 und ihre Auswirkung auf die Aktivität wird vielfach diskutiert. Die Fähigkeit zur Oligomerisierung ist jedoch nicht essentiell, und 20% des gesamt Hsp90 Anteils liegt in der dimeren Form in der Zelle vor. Dennoch könnte die Oligomerisierung bei der Präparation und Anwendung von Hsp90 die Ergebnisse deutlich beeinflussen, da durch Fehler in der Konzentration zweiwertiger Ionen und verstärkter Oligomerisierung die aktive Dimerform dem System entzogen werden könnte.

### **3.2 Die Phosphorylierung von Hsp90 und ihr Einfluss auf die Aktivität**

Das Potential von Hsp90 über Autophosphorylierung die eigene Aktivität beeinflussen zu können ist bis dato von mehreren Seiten beschrieben worden. Dennoch ist dabei nie ausgeschlossen worden, ob diese Erkenntnis nicht auf eine präparative Unzulänglichkeit zurückführbar ist. Inzwischen unbestritten ist die Assoziation zwischen Hsp90 und einer Vielzahl von Kinasen (Übersichtsartikel von Buchner 1999). Zwar wurde des öfteren eine Kinaseaktivität etwa von CKII in der Hsp90 Präparation beschrieben (Nadeau et al. 1993), interessanter Weise ist dabei nie richtig untersucht worden, inwieweit Hsp90-Kinase-Komplexe über die diversen Präparationsschritte hinweg erhalten bleiben, und somit im letztlich erhaltenen Präparat weiterhin vorhanden sind. Eine Möglichkeit dies herauszufinden bestand in einer weiteren Aufreinigung von Hsp90, bei welcher das nach der Gelfiltration erhaltene Präparat über eine Heparinsäule gegeben wurde. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Kinase CKII stark mit Heparin wechselwirkt, während Hsp90 eine sehr geringe Affinität

zeigt. Die Hoffnung bestand somit darin, die Kinase zumindest teilweise aus der Präparation zu entfernen, um einen Unterschied in der späteren Phosphorylierung feststellen zu können. Wie gezeigt, wurde hierbei in der Tat ein deutlicher Unterschied sichtbar, was die Theorie bestätigt, dass eine Präparation von Hsp90 stets auch ein gewisses Quantum an Kinasen mitzieht, welches ausreicht, um eine deutlich sichtbare Phosphorylierung von Hsp90 zu erzielen. Dadurch ist zwar die Qualität des Potentials von Hsp90 zu einer Autophosphorylierung nicht weg zu diskutieren, da die Phosphorylierung auch nach der Einwirkung von Heparin weiterhin zu erkennen ist, der quantitative Anteil an der beobachteten Phosphorylierung, der auf eine Autophosphorylierung von Hsp90 zurückzuführen ist, lässt sich über diesen Befund aber in jedem Fall reduzieren. Aufgrund anderer Studien, erscheint das Vorhandensein einer Eigenphosphorylierung von Hsp90 ohnehin nicht abwegig. So konnte gezeigt werden, dass für die Autophosphorylierung das komplette Protein benötigt wird und diese über Novobiocin blockiert wurde (Langer 2001). Die ATPase-Aktivität von Hsp90 wurde dabei verstärkt dem C-Terminus zugesprochen, da ein Fragment des N-Terminus (AS 1-210) zwar ATP bindet, aber dieses nicht selbstständig zu hydrolysieren vermag (Prodromou et al. 2000). In dieser Hinsicht war es auch interessant zu erfahren, inwieweit sich die Bindung von Geldanamycin, Radicicol und Novobiocin auf den Phosphorylierungsgrad von Hsp90 auswirken. Erst kürzlich wurde beschrieben, dass die Bindung von Geldanamycin eine Phosphorylierung durch die Casein Kinase II unterbindet (Zhao et al. 2001). Wenn man dazu die vermutete Bindungsstelle von Novobiocin mit den postulierten CKII Phosphorylierungsstellen vergleicht, sieht man, dass die Bindung von Novobiocin durchaus die potentielle Phosphorylierung der Serine 658 und 677 beeinträchtigen könnte. Die Studien welche in dieser Hinsicht erfolgten konnten zeigen, dass Novobiocin die Phosphorylierung von Hsp90 ab einer Konzentration von 0,5 mM deutlich unterbunden. Radicicol scheint im Bezug auf das Gesamtprotein einen noch wesentlich stärkeren Effekt auf die Phosphorylierung zu haben, da hier die Inhibierung bereits bei 0,05 mM Radicicol einsetzt. Geldanamycin zeigt hingegen keine Wirkung. Interessanter Weise zeigt sich die Wirkung aber auf unterschiedliche Art, da lediglich im Falle von Radicicol andere Proteinbanden weiterhin phosphoryliert wurden, während bei Novobiocin auch die Phosphorylierung anderer Proteinbanden im gleichen Maße abnahm, wie die Phosphorylierung von Hsp90. Dies kann darauf zurückzuführen sein, dass Novobiocin eventuell breiter wirkt und eventuell sogar mit der ATP-Bindungsstelle der CKII interagiert. Die Bindung von Radicicol scheint eine Phosphorylierung jedoch sehr effektiv zu verhindern, was entweder mit der Wirkung auf die räumliche Struktur von Hsp90 nach erfolgter Radicicol

Bindung zurückzuführen ist, oder auf eine durch Radicicol verursachte Maskierung der entsprechenden Phosphorylierungsstelle. Ebenfalls sehr interessant ist die Tatsache, dass sich eine Phosphorylierung des 1-237 Fragments erst mit wesentlich höherer Dosis an Radicicol verhindern lässt. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass das Fragment in seiner räumlichen Struktur erheblich vom N-Terminus des nativen Proteins abweicht oder dass in der Tat das Zusammenwirken und die gegenseitige Beeinflussung beider Termini von Nöten sind, um einen dezidierten Effekt im Protein zu erzielen. Der Versuch die Phosphorylierung des C-terminalen Fragments (AS 238-732) durch CKII auf diese Weise unter der Einwirkung von Novobiocin zu unterbinden, zeigte keinen Effekt.

### **3.3 Der Transport von 60S rUE**

Die ribosomalen Untereinheiten stellen ein Protein-RNA Ensemble dar, welches in seiner strukturellen und funktionellen Komplexität seines gleichen in der Zelle sucht. Ihre präzise Funktion ist für die Zelle und den Organismus existentieller Bedeutung, was den enorm hohen Umsatz dieser Untereinheiten widerspiegelt. Eine gerade in proliferierenden Zellen enorme Stoffwechsellleistung und damit verbundene Proteinbiosynthese bedingt eine ebenso gewaltige Neuproduktion an ribosomalen Untereinheiten, um eine mittlere cytosolische Halbwertszeit von etwa 10 Minuten gewährleisten zu können. Dies spiegelt sich natürlich auch in der Transportrate für ribosomale Untereinheiten über den Kernporenkomplex wieder, so wird für einen Oocyten Zellkern eine Transportrate von 3-17 60S rUE pro Minute veranschlagt je nachdem wie viele Kernporen man pro  $\mu\text{m}^2$  Kernmembran annimmt (Bataille 1990).

Ein entscheidendes Kriterium für die Translokation von ribosomalen Untereinheiten über die Kernmembran ist deren vollständige Generierung. Das heißt, dass der Transportmechanismus in jedem Fall erkennen muss, wann dieser Reifungsprozess abgeschlossen wurde. Nimmt man andere Transportmechanismen zur Hand, welche bisher besser untersucht wurden als der Export von 60S rUE, so stellt man fest, dass in allen Fällen ein Signal existiert, welches den Abschluss dieser Prozedur der Reifung symbolisiert. Bei der t-RNA erfolgen nach dem erfolgreichen Splicing diverse posttranskriptionale Modifikationen, welche im Zusammenspiel als Erkennungsmerkmal für den Rezeptor Exportin-t dienen. Bei den U snRNPs dient die Methylierung des 5'-Endes als entscheidendes Moment und Signal für die Translokation sowohl in die eine wie die andere Richtung (Cullen 2000). Auch bei den 60S rUE wurde herausgefunden, dass diese nur dann transportiert werden, wenn die Biogenese

abgeschlossen und die Untereinheiten somit funktionstüchtig waren. Da die Assemblierung der 60S rUE im Nucleolus einem vorgegebenen Mechanismus unterliegt, lässt sich der Status der Assemblierung an den letzten assoziierten Proteinen erkennen. Hier ist vermutlich auch die Erkennungssequenz für den Transport der Ribosomen zu suchen, da Experimente, welche eine sukzessive Ablösung peripherer Proteine beinhaltete, zeigen konnten, dass diese degenerierten ribosomalen Untereinheiten nicht oder nur sehr langsam transportiert wurden (Rosmus 2000). Als möglicher Kandidat der ribosomalen Proteine wird hier sehr häufig das L10 diskutiert, welches sich in der zeitlichen Reihenfolge abschließend assoziiert und dementsprechend an der äußersten Peripherie lokalisiert ist. In diesem Zusammenhang wurde beschrieben, dass ein Exportsignal an L10 (Gadal et al. 2001; Ho et al. 2000; Stage-Zimmermann et al. 2000) letztlich dafür verantwortlich ist, dass die 60S rUE über den Exportrezeptor CRM1 in das Cytoplasma transportiert werden. Diese These muss man jedoch mit Vorsicht genießen, da Experimente an Oocyten, bei denen der sehr spezifische CRM1-Inhibitor Leptomycin B coinjiziert worden war, zeigen konnten, dass der Export von 60S rUE darüber in keinerlei Weise zu beeinträchtigen war (Rosmus 2000; Battaile 1990). Wahrscheinlicher ist es da, dass dieses Signal nicht bei einer einzelnen Komponente, sondern eher im Kontext mehrerer Faktoren zu suchen ist. Desweiteren muss in Betracht gezogen werden, dass die 60S rUE durch einen Kernporenkomplex manövriert werden muss, welcher an seiner engsten Stelle in etwa dem Durchmesser einer Untereinheit entspricht und von Anfang bis Ende des Transports etwa 10 mal so lang ist. Allein dies verdeutlicht, dass der Transport der 60S rUE nicht allein von einem Faktor abhängig sein kann. Vielmehr muss man sich ein Zusammenspiel diverser Faktoren an unterschiedlichen Wirkungsorten vorstellen, welche letztlich dazu beitragen, dass die Translokation von 60S rUE über die Kernmembran ablaufen kann.

Allein auf cytoplasmatischer Seite wirken unterschiedlich Faktoren auf diesen Prozess ein. Vorrangig sind an dieser Stelle die kleineren 40S rUE zu nennen, welche zwar getrennt von den 60S rUE transportiert werden, jedoch im Cytoplasma im Verhältnis 1:1 mit den größeren Untereinheiten assoziieren. So konnte durch die cytosolische Coinjektion von 40S rUE in Oocyten eine konzentrationsabhängige Beeinflussung des Exports von 60S rUE festgestellt werden (Rosmus 2000).

Durch Fraktionierung des Cytosols und dem anschließenden Einsatz der Fraktionen im Vesikelsystem konnten verschieden starke Einflüsse durch die unterschiedlichen Fraktionen auf den Vesikelexport von 60S rUE festgestellt werden (Romero-Matuschek 2000). Doch ist bisher einzig das Hsp90 als proteinärer Faktor isoliert worden.

Hsp90 vermag direkt an 60S rUE zu binden. Dies wurde über die Copräzipitation von Hsp90 mit 60S rUE verdeutlicht. Hierbei wurde mit an Agarose gekoppeltem Hsp90 untersucht, ob sich die zugegebenen ribosomalen Untereinheiten darüber ebenfalls sedimentieren lassen. Es liegt natürlich immer die Vermutung nahe, dass ein Chaperon ohnehin an alle möglichen Proteine bindet, gerade dann, wenn sie anfangen zu denaturieren. Kontrollversuche belegten jedoch, dass Hsp90 nicht wahllos Proteine bindet sondern dieses nur sehr dezidiert tut. Somit lässt sich davon ausgehen, dass es sich im Falle der 60S rUE in der Tat um eine spezifische Affinität handelt. Diese Spezifität ließ sich zudem auch in der Fixierung von Hsp90 bzw. des AS 1-237 Fragmentes im Vesikelsystem zeigen. Zumindest was das komplette Protein betraf ließ sich hier eine, wenn auch sehr leicht radioaktive Markierung im Bereich der 90 kDa nachweisen. Eine solche Markierung konnte nur durch die Verknüpfung von Hsp90 mit <sup>125</sup>J radioaktiv markierten Proteinkomponenten der 60S rUE erzielt werden. Mit zunehmender Glutaraldehyd verschwand sowohl die Markierung im Autoradiogramm als auch die Proteinbande im SDS-Gel. Da die Vesikel vor der Erstellung der Gelproben pelletiert wurden, ist zudem davon auszugehen, dass diese Markierung lediglich über 60S rUE erfolgte, welche sich in unmittelbarem Kontakt zur Kernpore bzw. Kernmembran befanden, da sie ansonsten nicht mit sedimentiert wären. Im Falle des Hsp90-Fragmentes lässt sich nur sehr schwer sagen, ob hier eine Markierung stattgefunden hat, da sich Fragment und Teile der ribosomalen Proteine in einem ähnlichen Gewichtsbereich bewegen. Definitiv ist jedoch der Unterschied innerhalb der Vernetzung beider Proben. Während die Hsp90-Probe bereits bei einer Konzentration von 0,05% - 0,1% Glutaraldehyd komplett vernetzt und als riesiger Komplex nicht mehr in das Trenngel einzudringen vermag, stellt sich diese Beobachtung bei dem Fragment des N-Terminus erst bei verhältnismäßig hohen Glutaraldehyd Konzentrationen von 0,5% - 1% ein. Dies könnte ein Beleg dafür sein, dass das Fragment zum einen schlechter bindet, und somit auch in einem geringeren Maße vernetzt wird, zum anderen ließe sich diese Beobachtung aber auch dadurch erklären, dass aufgrund des fehlenden C-Terminus der Kontakt zu Kernpore bzw. Kernmembran fehlt, und somit auch die Vernetzung zwischen Kernpore und dem Transportsubstrat den 60S rUE nicht nur geringer ausfällt, sondern scheinbar auch eine direkte Verknüpfung zwischen den Untereinheiten und der Kernpore aufgrund der Anwesenheit des Fragmentes unterbleibt. Denn auch im Autoradiogramm ist weiterhin Radioaktivität in den unteren Bereichen zu detektieren, während bei der Probe mit Hsp90 die Radioaktivität ausschließlich in der Geltasche bzw. am Übergang zwischen Trenn- und Sammelgel zu finden ist. Diese Beobachtung könnte zum Verständnis der Hsp90 Funktion beim Transport der 60S rUE beitragen. So deutet es darauf hinaus, dass der C-

Terminus eher den Kontakt zur Kernpore herstellt, während die ribosomalen Untereinheiten über den N-Terminus fixiert werden. Die Flexibilität von Hsp90 könnte dabei zur besseren Überwindung des Engpasses Kernpore für die ribosomalen Untereinheiten beitragen, was die Erhöhung der Transportrate im Vesikelsystem erklären könnte. Desweiteren scheint sich auch die direkte Kontaktfläche von den 60S rUE zur Kernpore durch die Anwesenheit von Hsp90 deutlich zu reduzieren, auch dies könnte den Transport der Untereinheiten beschleunigen.

### **3.4 Einfluss von Hsp90 auf den Transport von 60S rUE**

Über die Fraktionierung des Cytosols und den Einsatz der Fraktionen im Transportversuch von 60S rUE aus wiederversiegelten Zellkernmembranen erbrachte den Hinweis darauf, dass insbesondere die Anwesenheit eines Proteins die über die Zugabe von Cytosol erzielte Transportrate erheblich zu steigern vermochte, welches sich anschließend als Hsp90 herausstellte (Schlatter 1997). Im Folgenden wurde versucht dieses Phänomen näher zu charakterisieren. Dabei wurde stets davon ausgegangen, dass Hsp90 von außen zugegeben auch lediglich dort seine Aktivität entwickeln kann. Eine Möglichkeit inwieweit Hsp90 in diesem Bereich in den Transport eingreifen könnte, ist indem Hsp90 als cytosolisches Protein durch Interaktion mit den im Transport befindlichen 60S rUE aus dem Einflussbereich der Kernpore in das Cytoplasma herauslöst. Geht man davon aus, dass die Bindung zwischen Hsp90 und den 60 rUE spezifisch sind, muss man auch davon ausgehen das ein spezielles Motiv existiert, welches für die Bindung an Hsp90 signifikant sein sollte. Da zudem bekannt ist, dass die 60S rUE als komplette und funktionelle Einheit über die Kernmembran hinweg transportiert wird, kann dieses Erkennungsmotiv auch nur in der Peripherie des Komplexes gesucht werden (Wood 1997; Wool 1996). Es zeigte sich, dass der N-Terminus von Hsp90 eine gewisse Affinität zu den 60S rUE aufwies, die Verknüpfung zur Kernmembran aber schwächer war als beim kompletten Hsp90 Protein. Dies könnte darauf hindeuten, dass Hsp90 zwischen Kernporenkomplex und den im Transport befindlichen 60S rUE agiert und darüber die Interaktionen zwischen Kernpore und 60S rUE minimiert, was zu einem "reibunglosen", schnelleren und in Bezug auf die Untereinheiten auch schonenderen Translokationsprozess führt. Doch zu welchem Zeitpunkt des Transportprozesses soll Hsp90 aktiv werden können? Wenn man sich die Morphologie des Kernporenkomplexes betrachtet, ließen sich vier Terminationpunkte definieren an welchen die Interaktion einsetzen könnte.

Der späteste Zeitpunkt liegt beim Verlassen des Zentralkanals und Übertritt der Untereinheiten in den cytoplasmatischen Teil des Kernporenkomplexes bzw. in das Cytoplasma selbst. An dieser Stelle könnte Hsp90 auf der Seite der Kernpore eine strukturunterstützende bzw. stabilisierende Funktion übernehmen und gleichzeitig aufgrund seiner intramolekularen Flexibilität in den Transport der 60S rUE unterstützend eingreifen, um in einer Art "Geburtshelfervorgang" den Übertritt der 60S rUE in das Cytoplasma zu erleichtern. Dazu angenommen, dass ein zu scNup57p homologes Protein vielleicht noch im Bereich des cytoplasmatischen Ringes am NPC lokalisiert ist, würde dies diese Theorie stark unterstützen können.

Ein weiterer möglicher Zeitpunkt liegt beim Übertritt der Untereinheit in den Zentralkanal auf der nukleoplasmatischen Seite des NPC. An dieser Stelle könnte Hsp90 den Eintritt der 60S rUE in den Zentralkanal erleichtern, denn man muss stets bedenken, dass der Durchmesser einer 60S rUE zu dem des Zentralkanals ungefähr kongruent ist, was vollkommen andere Adhäsionsbedingungen hervorruft als dies bei allen anderen bekannten Transportprozessen der Fall ist. Zudem könnte Hsp90 während der eigentlichen Translokation als "Schmiermittel" fungieren, um auf diese Weise den NPC und natürlich auch die 60S rUE vor möglichen Schäden zu bewahren und den Transport zu beschleunigen. Dieser Ansatz lässt sich über alle bisher ermittelten Ergebnisse genauso erklären, wie dies im vorangegangenen Punkt getan wurde. Nur würde hierbei die Passage durch den Zentralkanal des Kernporenkomplexes im Vordergrund der Betrachtung stehen.

Die beiden anderen Möglichkeiten, wo Hsp90 in den Ribosomentransport eingreifen könnte, befinden sich dann im Kerninneren. Hier wäre zum einen die Phase der Assoziation an den Kernporenkomplex im Bereich der nuklearen Korbstruktur. Wenn Hsp90 an diesem Punkt unterstützend eingreift, müsste es verstärkt kernständig sein, um diese Funktion ausfüllen zu können. Wenn es aber verstärkt kernständig ist, sollte wenig dagegen sprechen, dass Hsp90 sich im Nukleoplasma relativ frei bewegen kann, und somit spricht auch nichts dagegen, dass es die 60S rUE auch direkt im Bereich ihrer Assemblierung sprich im Nukleolus binden kann. Dies würde jedoch ein ganz anderes Licht auf den gesamten Transportprozess werfen. Denn dann hätte Hsp90 für die 60S rUE eine Funktion, wie man sie bei bisher allen Heterokomplexen an denen Hsp90 beteiligt ist, beschreiben konnte, nämlich eine Funktion, welche vornehmlich begleitende und dabei die Struktur und die Funktion bewahrende Tätigkeiten umfasst. Aufgrund der Tatsache, dass endogenes Hsp90 auch im Nukleoplasma detektiert werden kann, es im Heterokomplex mit Steroidrezeptoren im Nukleus funktionell nachgewiesen wurde und es definitiv Affinität zu 60S rUE aufweist, lässt sich dieser Weg

durchaus plausibel darstellen. Entscheidend ist dabei, dass man Hsp90 nicht als ein rein cytosolisches Protein darstellen kann, sondern vermehrt auch nukleoplasmatische Betätigungsfelder für das Protein identifiziert (Galy et al. 2000; Cserembly et al. 1994). Wenn Hsp90 demnach auch als teilweise kernständig betrachtet werden kann, ist nur schwer dagegen zu argumentieren, dass der Einfluss von Hsp90 auf den Export von 60S rUE aus dem Zellkern bereits weit vor der eigentlichen Translokation über die Kernmembran im Nukleoplasma einsetzt. Dennoch kann in einem *in vitro* System durchaus eine Steigerung des Exports von 60S rUE nach einer Zugabe von Hsp90 auf der cytoplasmatischen Seite der Kernmembran beobachtet werden, da Hsp90 dann immer noch in der Lage ist einen Einfluss auf den Translokationsprozess zu nehmen, wie auch immer sich dieser im Endeffekt darstellt.

### 3.5 Elektronenmikroskopische Detektion von endogenem Hsp90

Um zu zeigen, dass das endogene Hsp90 in der Tat im Bereich der Kernpore und der Kernmembran auffindbar ist, wurden über die Transmissions Elektronenmikroskopie versucht Hsp90 in diesem Bereich zu detektieren.

Versuche welche die Quervernetzungsversuche mit Hsp90 und dessen Fragmente als EM-Studien wiedergeben sollten, schlugen allesamt aus nur schwer nachvollziehbaren Gründen fehl. Hierbei sollte untersucht werden, inwieweit sich das Hsp90 bzw. die rekombinanten Fragmente nach ihrer Zugabe zu den isolierten Zellkernen im Bereich der Kernmembran detektieren lassen. Dabei wurde das Hsp90 zum einen mit Biotin markiert, um es dann mit Streptavidin-Gold nachweisen zu können, zum anderen sollte es über einen goldmarkierten anti-Hsp90 Antikörper detektiert werden. Die Fragmente, welche ja von Haus aus mit einem His)<sub>6</sub>-Taq markiert sind sollten ebenfalls über einen goldmarkierten, jedoch anti-(His)<sub>5</sub> Antikörper detektiert werden. Zudem wurden zwei verschiedene Inkubationwege einmal für 1h bei RT und einmal über Nacht bei 4°C gewählt. Jedoch zeigte sich bei keinem dieser Ansätze ein vernünftiges auswertbares Maß an Signalen. Lediglich ein als Kontrolle gedachter Ansatz, welcher nur eine einstündige Inkubation mit dem anti-Hsp90 Antikörper vorsah, um einen Hintergrundwert bestimmen zu können, lieferte einige Bilder welche somit endogenes Hsp90 zeigen.

Es finden sich Goldpartikel im Bereich der äußeren und inneren Kernmembran, im Bereich der cytoplasmatischen Fibrillen, partiell im Nukleoplasma aber auch an Resten von ER-



Membran. Dies und die Tatsache, dass kein Locus sich durch verstärkte Markierung irgendwie hervorhebt, zeigt die weite räumliche Streuung und Aktivität von Hsp90.

Das Hsp90 im Bereich der cytoplasmatischen Fibrillen detektiert wurde, kann natürlich mehrere Gründe haben. Zum einen, und dies gilt auch für alle weiteren potentiellen Lokalisationen, kann Hsp90 an leicht denaturierte Proteine binden, um diese rezunaturieren und zu stabilisieren. Es könnte sich dabei jedoch auch um eine spezifische Bindung von Hsp90 in diesem Bereich handeln, vielleicht auch verbunden mit einem Import von Hsp90. Bekannt ist diesbezüglich bisher jedoch noch gar nichts. Jedoch zusammen mit der Erkenntnis, dass Hsp90 sich unter Stressbedingungen im Bereich der äußeren Kernmembran akkumuliert, lässt sich diese Bindungsstelle durchaus erklären. In Verbindung mit der zellulären Verteilung von Steroidrezeptoren, wird auch die damit zusammenhängende Verteilung von Hsp90 diskutiert. Es ist weiterhin nicht zweifelsfrei gezeigt worden, inwieweit der Transport von Steroidrezeptoren in den Zellkern und auch ihr gezeigter Rücktransport mit dem Vorhandensein von Hsp90 in Verbindung steht (Kang et al. 1994). Angeblich soll Hsp90 in das Recycling von Steroidrezeptoren nach der Dissoziation von der DNA involviert sein (Liu et al. 1999). Dafür spricht auch, dass Hsp90 die DNA-Bindedomäne des Steroidrezeptors zu maskieren vermag, was keinerlei Sinn ergeben würde, wenn Hsp90 nicht auch wichtige nukleoplasmatische Funktionen in Verbindung mit den Steroidrezeptoren übernehmen muss (Sabbah et al. 1996). Dies würde auch die intranuklearen Markierungen bei den EM-Aufnahmen erklären. Man muss sich vielleicht von der These verabschieden, dass es sich bei Hsp90 um ein rein cytoplasmatisch wirkendes Protein handelt.

Das in dieser Präparation Antikörper in das Nukleoplasma gelangten, stellt einen ebenfalls sehr interessanten Aspekt dar. Denn eigentlich stellen Antikörper aufgrund ihrer Größe und ihres eigentlichen Vorkommens kein potentiell über den NPC transportierbares Substrat dar, dennoch gelangt es, auch nach Studie der EM-Bilder, in absolut intakte Zellkerne. Dies lässt im Prinzip drei mögliche Schlüsse zu. Erstens könnten die Antikörper auf der Kernaußenseite an Hsp90 binden und anschließend mit dem Protein in den Zellkern transportiert werden. Zweitens könnte während der Präparation und der Inkubation mit dem Antikörper die Membran doch poröser gewesen sein, als es die späteren Bilder zu zeigen vermögen, und ist hierbei der Antikörper zu einem gewissen Teil in den Zellkern inkorporiert worden. Drittens könnten Antikörper trotz ihrer Größe einfach in das Nukleoplasma difundieren.

Denn die These, dass lediglich Moleküle unterhalb von 40 kDa frei die Kernpore passieren können, gilt nicht mit hundertprozentiger Gewissheit. Zudem würde dies auch für die These sprechen, dass die eigentliche Selektion zwischen kernständigen und nichtkernständigen Komponenten weniger über den Import als über den Export gewährleistet wird (Wada et al. 1998).

### **3.6 Quervernetzung von Hsp90 mit Proteinen der Kernmembran**

Hsp90 stellt ein Protein dar, welches eine Vielzahl proteinärer Bindungspartner in der Zelle aufweist. Zudem ist die Wirkung von Hsp90 nicht auf eine oder wenige Lokalisationen beschränkt, sondern erstreckt sich beinahe über die gesamte Bandbreite möglicher Wirkungsstätten und Kompartimente. Vorgegangene Lokalisationsstudien konnten jedoch zeigen, dass Hsp90 eine besondere Affinität zur Kernmembran, im besonderen der cytoplasmatischen Seite, aufweist. Bei Zellen unter Hitzestress wird die Lokalisation von fluoreszenzmarkiertem Hsp90 besonders deutlich, da man in diesem Falle eine deutliche Ringfärbung um den Zellkern herum erkennen kann (Rosmus 2000). Würde man davon ausgehen, dass sich das Wirkungsspektrum von Hsp90 auf die bis dato beschriebenen Phänomene beschränken, welche sich in erster Linie auf funktionserhaltende und begleitende Tätigkeiten in Verbindung mit vor allem cytoplasmatischen Proteinen beziehen, läge die Vermutung nahe, dass auch oder gerade im Falle von Zellstress Hsp90 ebenfalls verstärkt und verteilt im Cytosol detektiert werden müsste (Yonehara et al. 1996). Da sich die Aufenthaltswahrscheinlichkeit für Hsp90 im Bereich der Kernporenkomplexe in Stresssituationen aber deutlich erhöht spricht dies für den essentiellen Einfluss, den Hsp90 in diesem Bereich innezuhaben scheint. Zieht man des weiteren in Betracht, dass die Aufrechterhaltung der Transportprozesse über die Kernmembran für die Zelle neben der Energieversorgung einen existentiellen Eckpfeiler darstellt und eine Aggregation von Proteinen im Bereich der inneren Kernpore schnell zu einem schwer behebbaren Verschluss der Poren führen könnte, macht vielleicht deutlich, warum gerade in dieser Situation die Anwesenheit von Hitzestressproteinen und hier insbesondere von Hsp90 derartige Wichtigkeit für die Zelle besitzt.

Dies und natürlich alle bisher erbrachten Befunde, welche den Einfluss von Hsp90 auf den Transport 60S rUE betreffen, legen die Schlussfolgerung nahe, dass Hsp90 aufgrund seiner Affinität auch konkrete Bindungspartner im Bereich der Kernpore besitzen muss. Unter

anderem dort einen näheren Hinweis zu finden und einen dieser Partner detektieren und beschreiben zu können war, ein Bestandteil dieser Arbeit.

Die Vorgehensweise basierte auf der Verknüpfung von Hsp90 mit dessen imaginärem Partnerprotein in der Kernpore über spezielle Quervernetzungsreagenzien, welche eine möglichst hohe Spezifität der Verknüpfung aufweisen sollten. Um dies zu untersuchen wurden Studien unter der Verwendung verschiedener Quervernetzungsreagenzien durchgeführt, um anschließend den Quervernetzer mit dem womöglich besten Verhältnis zwischen Spezifität und Ausbeute ermitteln zu können.

SASD zeigte sich hierbei als zu unspezifisch, was sicherlich auf den um einiges längeren Zwischenraum der zwischen den beiden kovalenten Verknüpfungen zurückbleibt, zurückzuführen ist. Hierdurch erhöht sich die Bandbreite möglicher Verknüpfungen um ein Vielfaches und umfasst eine große Anzahl nicht relevanter meist zufälliger Bindungen. ANS und APAI zeigten eine deutlich höhere Selektivität, was die Verknüpfungen anbetraf, wobei die Ausbeute dann doch für das APAI sprach. Nicht zu letzt war das APAI einfach auch in größerer Menge verfügbar und ließ sich zudem in hoher Konzentration in Methanol vorlösen und anschließend in Puffer auf die angemessene Konzentration verdünnen, was mit ANS schon aufgrund der geringen Verfügbarkeit nicht in dem Maße möglich war. Zudem waren die Lösungseigenschaften von ANS deutlich schlechter als die von APAI.

Aufgrund der Tatsache, dass die Quervernetzung lediglich mit einem Reagenz möglich war, dessen Platzhalter ausgesprochen kurz gehalten wurde, zeigt prinzipiell die Spezifität der Protein-Protein Wechselwirkung zwischen Hsp90 und den entsprechenden Komponenten der Kernmembran auf.

Es wurde beschrieben, dass die Bindung und nachfolgende Hydrolyse von ATP für die Funktion von Hsp90 essentiell sind (Prodromou et al. 2000). In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass die Ausbeute der Quervernetzungen mit dem Vorhandensein eines ausreichenden ATP-Spiegels deutlich ansteigt. Interessanterweise galt dies auch für die Quervernetzung mit dem C-Terminus von Hsp90 dem Fragment mit den Aminosäuren 238-732. Interessant ist dies, weil bisher lediglich eine zweite ATP-Bindungsstelle im Bereich des C-Terminus postuliert, aber nicht nachgewiesen wurde. Aufgrund der Bindung von Novobiocin, wo man das Bindemotiv in dem Aminosäurebereich 657-677 vermutet, hat man der Novobiocinbindungsstelle eine vergleichbare Charakteristik zugeschrieben, wie sie der Novobiocinbindungsstelle in der bakteriellen DNA Gyrase B entspricht, bei der es sich ebenfalls um eine ATP-Bindungsstelle handelt (Marcu et al. 2000b).

Die Quervernetzungen ergaben in der SDS-PAGE Analyse stets ein sehr diffuses Bild ab, in welchem sich nur selten distinkte Proteinbanden hervortaten. Wenn diese Banden auftraten, war es häufig nur möglich diese im Autoradiogramm bzw. wie in den meisten Fällen im Western-Blot, nicht aber im gefärbten Gel oder der gefärbten PVDF-Membran deutlich zu erkennen. Diesen Banden in irgendeiner Form habhaft zu werden stellte die weitere Herausforderung dar, welche schließlich nur bedingt bewältigt werden konnte. Der Versuch über die Proteinrückelution einiger Gelbereiche die entsprechenden Proteine verstärkt anzureichern schlug absolut fehl, da der Verlust an Protein durch Abbau und präparativem Schwund größer war als der Nutzen der sich durch die weitere Isolierung und Vereinigung von Präparationen ergab. Die Folge war, dass lediglich über größere Ansätze versucht werden konnte die Proteinausbeute insgesamt und damit die der Quervernetzungsausbeute zu erhöhen.

Aus Gründen der besseren Zuordnungsmöglichkeiten fanden für die Studien lediglich die beiden Fragmente von Hsp90 Verwendung, da diese auch in diesen größeren Mengen, der Einsatz von 500 OD Kernen benötigte eine quervernetzende Proteinmenge von bis zu 60 mg der Fragmente, zur Verfügung standen, wesentlich stabiler waren und sie zudem oberhalb der eigenen Bande keinerlei Verunreinigung mehr aufwiesen. Zudem gewann man anhand erster Studien mit isoliertem Hsp90 als quervernetzendes Protein den Eindruck, dass insgesamt eine stärkere Vernetzung des Gesamtgefüges verursacht wurde, welches in der SDS-PAGE später nicht mehr aufzutrennen war.

Auf diese Weise war es möglich bei der Quervernetzung zwischen dem C-terminalen Fragment mit den Aminosäuren 238-732 und der Kernmembran drei Proteinbanden zu identifizieren. Zwei Proteinbanden ergaben sich bei der Quervernetzung des kleineren N-terminalen Fragments (AS 1-237).

In der präparativen SDS-PAGE ließen sich die Signale den Proteinbanden auf der PVDF-Membran soweit zuordnen, dass diese ausgeschnitten und der Sequenzanalyse zugeführt werden konnten. Doch lediglich bei einer Proteinbande vom quervernetzten AS 238-732 Fragment im molekularem Gewichtsbereich von 250 kDa, reichte die Proteinmenge aus, um von zwei Segmenten eine Sequenz zu bekommen.

### 3.7 Die Sequenzen CKESW und NRGLPP

Die Datenbankrecherche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) ergab für die Sequenz CKESW:

- 1.) KIAA0864 Protein [Homo sapiens]
- 2.) AK007566 vermutliches Protein [Mus musculus]
- 3.) Nup57 Protein [Saccharomyces cerevisiae]
- 4.) Kallmann Syndrom Protein [Gallus gallus]
- 5.) Hypothetisches Protein W05B5.2 [Caenorhabditis elegans]
- 6.) Pankretischer Polypeptidrezeptor Y4 [Cavia porcellus]

Für die Sequenz NRGLPP:

- 1.) Inositol Polyphosphat 5-Phosphatase [Homo sapiens]
- 2.) Phenylalanin Ammonium Lyase [Amanita muscaria]
- 3.) RNA2 Polyprotein [Wheat yellow mosaic virus]
- 4.) Hypothetisches Protein Y53G8AR.a [Caenorhabditis elegans]
- 5.) Protoporphyrin IX Magnesium Chelatase [Methanococcus jannaschii]

Mit einer Übereinstimmung von 83,3 Prozent fand sich diese Sequenz ebenfalls in Nup57 [Saccharomyces cerevisiae] wieder.

Da beide Sequenzen auf ein Protein hindeuten, muss man davon ausgehen, dass es sich bei dem markierten Protein um ein zu scNup57p homologes Protein der Ratte handelt.

Dennoch darf man deswegen die anderen Proteine auf welche diese Sequenzen zutreffen könnten erst einmal nicht außer Acht lassen, da eine stichfeste Zuordnung in der Form nicht möglich ist.

Über einige dieser Proteine ist bis dato nichts bzw. nur äußerst wenig bekannt. Bei den Proteinen AK007566, W05B5.2 und Y53G8AR.a handelt es sich um rein hypothetische Proteine, welche sich aufgrund von Genomanalysen als mögliches Genprodukt darstellen.

Dem zum Kallmann-Syndrom Protein homologen Genprodukt aus dem Huhn konnte in diesem bisher ebenfalls keine Funktion zugeordnet werden. Das Kallmann-Syndrom stellt eine psychische Erkrankung beim Menschen dar, welche durch eine Überproduktion dieses Proteins beispielsweise in den Purkinjen Zellen des Cerebellum, den Neuronen der Retina und

des Geruchszentren sowie weiteren Neuronen ausgelöst wird. Dies führt zur Anosmia und einem Defizit in der Produktion von Gonadotropin-Releasing-Hormone (Legouis et al. 1993). Die Inositol Polyphosphat 5-Phosphatase ist ein cytosolisches Protein, welches an der Eliminierung des über die Phospholipase C freigesetzten Second-Messenger  $IP_3$  beteiligt ist. Dieses Enzym dürfte in beinahe allen Zellen expremiert werden die Wahrscheinlichkeit ein derartiges rein cytoplasmatisches Protein in dieser Form zu markieren ist jedoch äußerst unwahrscheinlich.

Die Phenylalanin Ammonium Lyase ist ein spezielles Enzym welches bisher in unterschiedlichen Microorganismen gefunden wurde, und dort für den Umsatz von Phenylalanin zu Phenylpyruvat verantwortlich ist. In der Phenylketonurie, einer genetischen Disposition, bei welcher Phenylalanin nicht über die Phenylalaninhydroxylase zu Tyrosin abgebaut werden kann, wird dieses Enzym substituiert (Levy 1999), um dem Überangebot an Phenylalanin zu entgegen. Auch in diesem Fall ist eine Verknüpfung mit Hsp90 mehr als unwahrscheinlich.

Ebenso ein Enzym welches in Mikroorganismen zu finden ist stellt die Protoporphyrin IX Magnesium Chelatase dar. Dieses Enzym dient dem Einbau von Magnesium in den Protoporphyrinring und kommt für eine mögliche Verknüpfung daher ebenfalls nicht in Frage.

Das RNA2 Polyprotein ist ein virales Polyprotein, welches posttranskriptional proteolytisch in vier funktionelle Proteine gespalten wird. Vertreter in welchen dieses Protein gefunden wurde, sind die Familie der Nepoviren oder Comoviren zu denen auch das *Wheat yellow mosaic virus* zu zählen ist, und welche allesamt zu den Pflanzenviren gehören (Carrier et al.2001).

Zu guter letzt steht noch der Pankretischer Polypeptidrezeptor  $Y_4$  zur Diskussion. Wie der Name suggeriert, handelt es sich um einen Rezeptor für die Peptidhormone der Bauchspeicheldrüse. Von den Peptidhormonrezeptoren sind die Varianten  $Y_{1+2}$  bisher wesentlich besser charakterisiert. Von Ihnen weiß man, dass es sich um G-Protein gekoppelte Rezeptoren handelt, welche als Neuropeptidrezeptoren nach Bindung des Liganden häufig endosomal internalisiert werden (Parker et al. 2001).

In jedem Fall schließen sich alle bis hierhin beschriebenen Proteine entweder vom Organismus, dem Organ oder dem zellulären Wirkungsort beinahe gänzlich aus.

Daher bleibt von den Sequenzen her lediglich Nup57p aus *Saccharomyces cerevisiae* übrig, um zumindest funktionell diskutiert zu werden.

### 3.8 Ein Bestandteil der Kernporenkomplexes der Hefe *S.cerevisiae*:

#### Nup57p

Über diese Komponente der NPC ist bis dato noch nicht allzu viel bekannt geworden. Es ist Bestandteil eines Unterkomplexes der Kernpore, welcher als Nsp1-Komplex bezeichnet wird. Zu diesem zählen unter anderem auch die Proteine Nup49p, Nic96p und das namensgebende Nsp1p (Fahrenkrog et al. 1998). Nup57p scheint in diesem Subkomplex eher eine strukturgebende Funktion zu erfüllen. Es stellt das organisatorische Fundament des Komplexes dar, an welchen folgend die Proteine Nsp1p und Nup49p individuell assoziieren. Erst wenn dieser Komplex generiert wurde, kann auch Nic96p, welches nicht in der Lage ist, einen der drei Bestandteile in freier Form zu erkennen, binden, um den Subkomplex zu vervollständigen (Schlauch et al. 1997). Die Proteine Nsp1p, Nup49p und Nup57p besitzen im Bereich ihres C-Terminus eine siebenfache Wiederholungssequenz (heptade repeat), welche als  $\alpha$ -helicale coiled-coil Bindedomäne fungieren könnte. Zumindest bei Nic96p zeigt sich bei fehlender Coiled-Coil-Domäne des N-Terminus, dass keine Assoziation mit dem Nsp1-Grundkomplex mehr stattfindet (Grandi et al. 1995; Schlauch et al. 1997). Lokalisiert ist der Komplex sowohl an der nukleären als auch an der cytoplasmatischen Peripherie des Zentralkanals (Fahrenkrog et al. 1998). Alle Nups dieses Komplexes tragen zudem die typischen FXFG- und GLFG-Wiederholungssequenzen. Die Bedeutung dieser Motive ist weiterhin Bestandteil von Spekulation. Sinnvoll erscheint hierbei die Hypothese, dass über das Vorkommen dieser Sequenzen entlang der Transportstrecke durch die Kernpore die Richtung für potentielle Transportsubstrate vorgegeben wird.

In jedem Fall führen Defekte in den Proteinen Nic96p und Nsp1p zu einem defizitären Import in den Zellkern (Mutvei et al. 1992; Nehrbas et al. 1993; Grandi et al. 1993), während Mutationen in den Proteinen Nup57 und Nup49 sowohl zu einem Block beim Proteinimport wie auch beim mRNA-Export führt (Sharma et al. 1996; Grandi et al. 1995; Hurwitz & Blobel 1995).

Das Homolog diese Subkomplexes bei den Vertebraten stellt der p62-Komplex dar. Auch die Komponenten des Komplexes weisen Homologien zueinander auf. Daher lassen sich aufgrund der Übereinstimmungen die Proteine p62 mit Nsp1p, p58/46 mit Nup49p, p93 mit Nic96p und p54 mit Nup57p miteinander vergleichen. Insbesondere im Bereich des C-Terminus liegen die Übereinstimmung bei über 50 Prozent (Carmo-Fonseca et al. 1991), während sie über das gesamte Protein betrachtet bei 35-45 Prozent anzusiedeln ist. Lediglich

zwischen Nic96p und p93 liegt die Übereinstimmung mit lediglich 27 Prozent deutlich niedriger (Doye & Hurt 1997; Fabre & Hurt 1997).

Das Vertebratenhomolog zu Nup57p das p54 besitzt eine Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz von 45 Prozent. Dennoch waren die ermittelten Sequenzen lediglich in Übereinstimmung einer einzelnen Aminosäure wiederzufinden. Zudem würde der Größenvergleich mit der Proteinbande in der SDS-PAGE nicht auf ein Protein von 50 - 60 kDa sondern vielmehr auf ein Protein in der Größe von etwa 200 kDa schließen lassen, wenn man von einer 1:1 Verknüpfung zwischen Hsp90-Fragment (60 kDa) mit dem unbekanntem Protein einmal ausgeht.

Aufgrund der Vielzahl bis dato noch unbekannter Proteine im Bereich des Kernporenkomplexes besteht durchaus die Möglichkeit, dass sich unter diesen auch eines befindet, welche ein identisches Sequenzmuster aufweist.

Letztlich muss man sich natürlich auch fragen, ob es sich bei dieser Übereinstimmung beider Sequenzen mit Nup57p um einen absoluten Zufall handeln könnte, und das entsprechende Protein gar nichts mit der Kernpore zu tun hat. Dies lässt sich jedoch zum einen anhand dessen verneinen, da die isolierte Proteinbande aus welcher diese Sequenzen gewonnen wurden, erst über die Erstellung eines Kernextraktes soweit in Lösung zu bringen war, dass eine Detektion möglich war. Ein Protein welches keinerlei Bezug zur Kernpore besitzt oder der Kernmatrix besitzt, wäre sicherlich nicht erst an diesem Punkt zu detektieren gewesen.

Der andere Punkt ist natürlich der, dass es sich bei dem Protein zwar um kein Nukleoporin, aber dafür um ein absolut kernständiges Protein handeln könnte. Dies Möglichkeit lässt sich anhand der Ergebnisse in der Tat nicht von der Hand weisen. Dies würde jedoch den Befunden, welche den Hsp90 Einfluss auf den 60S rUE Transport widerspiegeln, in erster Sicht nicht widersprechen. Doch muss man dann natürlich kritisch anmerken, dass bei einem System welches den Einfluss eine von außen zugegebenen Faktors auf den Fluss ribosomaler Untereinheiten von Innen nach Außen hin untersucht, es nur schwer erklärbar ist, dass dieser Faktor den erzielten Effekt lediglich über die Bindung an ein internes Protein erzielen kann. Zudem fand ja auch bei der Quervernetzung die Zugabe von Hsp90 von der cytoplasmatischen Seite aus statt. Dabei ist es durchaus nicht abwegig, dass Hsp90 einen Einfluss auf den Transport von 60S rUE nicht nur in Bezug auf die Passage durch den Kernporenkomplex besitzt, sondern auch auf den Transport durch das Nukleoplasma hat.

Außerdem stammten die ermittelten Sequenzen ja nur von einem der drei isolierten Proteinbanden, was bedeutet, dass dort zumindest noch zwei weitere Proteine auf eine Identifizierung warten, welche innerhalb dieser Studien spezifisch markiert wurden. Des



weiteren gab es noch Signale deren Proteinbande jedoch nicht detektiert werden konnte, wobei es sich aber dennoch um spezifisch markierte Proteine handeln könnte.

### 3.9 Ausblick

Letztlich kann man einen unmittelbaren Einfluss von Hsp90 auf den Export von 60S rUE aus dem Zellkern nicht mehr wegdiskutieren. Lediglich das Wie, Warum und Wo bleibt weiterhin zu diskutieren.

Hierzu wäre vor allem anderen eine brauchbare strukturelle Darstellung vom gesamten Hsp90 Protein von großem Vorteil, um das Protein selbst erst einmal richtig verstehen zu können, ohne dass man sich wie bisher nur über seine Vielseitigkeit wundert. Insbesondere der C-Terminus dürfte nach allen bisher gewonnenen Erkenntnissen mit einigen Überraschungen aufwarten. Das Zusammenspiel zwischen N- und C-Terminus über die zwischengeschaltete geladene Sequenz scheint entscheidend für die Funktionalität von Hsp90 zu sein, diesen Zusammenhang im Detail zu beleuchten wäre ebenfalls ein wichtiger Schritt zum genaueren Verständnis dieser Materie.

Um den Einfluss von Hsp90 auf den Ribosomentransport weiter zu untersuchen, sollte man verstärkt über Bindungsstudien bereits identifizierter Kernporenproteine mit Hsp90 versuchen genaueres über die Affinität von Hsp90 zu Kernpore herauszufinden.

Im Zuge der Genomsequenzierung auch von Vertebraten sollte eine Identifizierung von Kernporenproteinen in der Form wie es bei der Hefe vollzogen wurde, auch hier durchgeführt werden, um mehr über die Architektur und Funktion des Kernporenkomplexes in Erfahrung zu bringen. Zusätzlich könnten auf diesem Wege weitere Komponenten des NPC identifiziert werden, welche eine spezifische Affinität zu Hsp90 aufweisen. Denn die Quervernetzungsversuche konnten zeigen, dass nicht nur ein Protein im Bereich des Kernporenkomplexes über Hsp90 markiert werden konnte. Durch weitere Quervernetzung und einer eventuell größeren Ausbeute markierten Proteins ließen sich auch weitere Sequenzen gewinnen, welche eine Identifikation der Proteine insoweit ermöglichen könnte, dass man über die Erstellung sequenzspezifischer Antikörper vielleicht eine bessere Isolierung und genauere Charakterisierung vornehmen kann.

Interessant wäre es in Erfahrung zu bringen, ob Hsp90 in der Lage ist, Konformationsänderungen am Kernporenkomplex zu begünstigen bzw. zu stabilisieren, was

in Bezug auf die Translokation von 60S rUE durch die Kernpore durchaus eine unterstützende Funktion von Hsp90 darstellen könnte.

Auch präzisere Angaben zu Lokalisation von Hsp90 wären erstrebenswert. Mit heutiger Technik, welche bis in den Molekülmaßstab aufzulösen vermag, sollte dies nur eine Frage der Zeit darstellen.

Die Entdeckung von Hsp90 auch als pharmazeutisches Zielprotein, beispielsweise in der gezielten Tumorbekämpfung, wird in naher Zukunft ebenfalls aufgrund verstärkter Forschungsintensität das Bild von Hsp90 weiter konkretisieren helfen.

#### 4. Zusammenfassung

Hsp90 ist ein äußerst vielseitiges Protein, welches nicht strikt cytosolisch anzusiedeln ist. Es besitzt eine Vielzahl von Partnerproteinen zu denen stetig neue hinzukommen und deren Interaktionen längst nicht alle hinreichend untersucht und verstanden wurden.

Worin der Unterschied in der Funktionalität von Hsp90 in Eukaryoten und HtpG in Prokaryoten besteht, das Hsp90 für Eukaryoten (auch einzellige) derart essentiell werden lässt, ist absolut unklar. Ein möglicher Grund könnte die Beteiligung von Hsp90 an Transportprozessen in und um den Zellkern darstellen.

Der Einfluss von Hsp90 auf den Export von 60S rUE aus dem Zellkern konnte manifestiert werden. Die Einwirkung Hsp90 spezifischer Inhibitoren wie Geldanamycin, Radicicol und Novobiocin zeigten deutliche Effekte in den Transportmessungen sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Durch Coinjektionen von Novobiocin und Radicicol in die Oocyten von *Xenopus laevis* ließ sich der Export von <sup>125</sup>J markierten 60S rUE aus dem Zellkern gegenüber den Kontrollen deutlich reduzieren. Damit konnte der mittel- oder unmittelbare Zusammenhang zwischen Hsp90 und dem Export von 60S rUE *in vivo* erneut bewiesen werden.

Hsp90 besitzt mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen für die Casein Kinase II.

Untersuchungen zeigten, dass die Phosphorylierung von Hsp90 den Effekt auf den *in vitro* Export von 60S rUE aufzuheben vermag. Die Phosphorylierung von Hsp90 durch die CKII könnte somit eine potentielle Regulationsmöglichkeit von Hsp90 darstellen.

Die Phosphorylierung von Hsp90 durch die CKII ließ sich durch die Zugabe von Radicicol deutlich reduzieren. Es ist durchaus möglich, dass die potentielle Phosphorylierungsstelle im Bereich der Bindungsstelle von Radicicol am N-Terminus von Hsp90 zu suchen ist, da auch die Phosphorylierung des N-terminalen Fragments über Radicicol beeinflusst werden konnte. Über Quervernetzungsversuche zwischen Hsp90 und isolierten Zellkernen, konnten Proteine der Kernmembran spezifisch markiert werden. Aufgrund der äußerst geringen Proteinausbeute war eine Analyse sehr schwierig. Lediglich eine Proteinbande konnte schließlich partiell N-terminal ansequenziert werden. Die ermittelten Sequenzen deuten auf ein zu scNup57p homologes Protein der Ratte hin, welches bisher jedoch noch nicht über eine der Proteindatenbanken ermittelbar ist.

Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von isolierten Rattenleberzellkernen, welche mit einem Anti-Hsp90 $\alpha$  Antikörper inkubiert wurden, konnten zeigen, dass Hsp90 neben Komponenten im Bereich des Kernporenkomplex auch an Bestandteile im Nukleoplasma bindet. Da aufgrund der *in vitro* Messungen bisher ein rein cytosolische Effekt

von Hsp90 in Bezug auf den Export von 60S rUE vermutet wurde, könnte dieser Befund nahe legen, dass die Einflussnahme von Hsp90 auf den Transport von 60S rUE wesentlich früher bereits im Nukleoplasma oder in den Nukleoli einsetzen könnte. Wenn dies der Fall ist, könnte Hsp90 auch im Zusammenhang mit den ribosomalen Untereinheiten eine Begleiterfunktion zukommen, welche den Transport vom Ort der Biosynthese bis an die spätere Wirkungsstätte unter Aufrechterhaltung der Funktion gewährleistet.

Hierfür könnte auch sprechen, dass Hsp90 mit den 60S rUE interagiert, wie es in Copräzitationsversuchen gezeigt wurde.

Zudem konnte Hsp90 gezielt über proteinäre Bestandteile im Transport befindlicher 60S rUE radioaktiv markiert werden. Es spricht demnach vieles dafür, dass Hsp90 unmittelbar in den Transportprozess der großen ribosomalen Untereinheiten eingreift, und hierbei der Effekt nicht lediglich in der Unterstützung bei der Translokation zu suchen wäre, sondern eventuell schon sehr viel früher im inneren des Nukleoplasmas.

## 5. Experimenteller Teil

### 5.1 Isolierung von Zellkernen aus Rattenhepatozyten

Die frisch präparierten Lebern von vier ca. 400g schweren männlichen Sprague-Darwley-Ratten werden in 4°C kaltem 0,25M STKMC-Puffer gewaschen.

Im folgenden wird, wenn nicht anders erwähnt, stets bei 4°C weitergearbeitet.

Die Lebern werden mit einem Skalpell grob zerkleinert und anschließend die Hepatozyten in einem 60 ml Elvehjem-Homogenisator aufgeschlossen. Der Zellaufschluss wird durch vier Lagen Gaze gestrichen, um Restgewebe zurückzuhalten. Das Filtrat wird einer Zentrifugation ( 1.500g , 12 min , 4°C ) unterzogen. Der so erhaltene Überstand wird vorsichtig abgossen, bis sich das Pellet als grau-braune Zunge zeigt. Der Überstand kann wie unter 5.4 beschrieben für die Isolierung zytosolischer Faktoren weiterverwertet werden. Das Pellet wird in einen 30 ml Elvehjem-Homogenisator überführt und erneut homogenisiert. Vom Resultat werden in einen Messzylinder 40 ml abgemessen und diese anschließend auf 180 ml mit 2,3M STKMC-Puffer aufgefüllt und durch invertieren gemischt. Mit der so erhaltenen Lösung werden die zuvor mit 5 ml 2,3M STKMC-Puffer befüllten SW28 Zentrifugenröhrchen überschichtet.

Die sich anschließende Zentrifugation erfolgt für 1h bei 4°C und 130.000g. Man erhält ein gelblich-weißes Pellet, welches in einem 15 ml Elvehjem-Homogenisator in 0,25M STKMC-Puffer resuspendiert wird. Die Suspension wird bei 1000g und 4°C für 3 min zentrifugiert. Das Pellet wird in 0,25M STKMC-Puffer wieder resuspendiert. Dieser letzte Waschschrift wird wiederholt, bis der Überstand fast klar ist.

Nach dem letzten Waschschrift wird das Pellet in einem definierten Volumen 0,25M STKMC-Puffer resuspendiert, um anschließend über eine OD<sub>260</sub>-Messung die Ausbeute bestimmen zu können. Hierbei entspricht eine OD<sub>260</sub> 106,5 µg Kernprotein bzw.  $3 \cdot 10^6$  Kernen.

### 5.2 Darstellung von Kernhüllenvesikeln

Die Kerne werden bei 1.500g, 4°C und 2 min sedimentiert und anschließend in 8,5 ml Permeabilisierungspuffer pro 100 OD vorsichtig bei RT resuspendiert. Die Kerne werden für 3 min gerührt und die Suspension dann mit 65,5 µl Heparin ( Liquemin N 25.000, Roche ) je

100 OD versetzt. Nach weiteren 4 min pelletiert man die Kerne bei 1.800g in 3 min. Der Überstand wird vorsichtig entfernt und das Pellet in 0,2 ml Permeabilisierungspuffer gelöst. Die so erhaltenen offenen Kernhüllen können mit dem entsprechenden Transportsubstraten beladen werden. In diesem Fall werden 120 µg zuvor mit  $^{125}\text{J}$  radioaktiv markierten 60S rUE zum Ansatz hinzugegeben und für 90 s bei RT und anschließend für weitere 60 s auf Eis inkubiert. Durch die Zugabe von 0,4 ml 0,25M STKMC-Puffer pro 100 OD werden die Kernmembranen wieder geschlossen und ein Teil des Transportsubstrates entsprechend der Volumenverteilung eingeschlossen. 60S rUE welche nicht in die Vesikel eingeschlossen wurden, werden durch dreimaliges Waschen der Vesikel in 0,25M STKMC-Puffer bei 4°C für 3 min bei 1.800g aus dem Ansatz entfernt. Nach dem letzten Waschschrift werden die beladenen Vesikel in 0,5 ml Transportpuffer je 100 OD resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf Eis gelagert.

### 5.3 Isolierung von 60S rUE aus Rattenhepatocyten

Pro Präparation werden die Lebern von 10 zuvor mit Genickbruch getöteten Sprague-Dawley-Ratten präpariert. Die Lebern werden in Puffer A gewaschen, und anschließend im Starmix mit 200 ml Puffer A zerkleinert. In einem 60 ml Elvehjem-Homogenisator erfolgt der Zellaufschluß. Danach wird das Homogenisat bei 30.000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert, um alle Zelltrümmer aus dem Homogenisat zu entfernen. Die vereinigten Überstände werden mit Puffer A auf 400 ml aufgefüllt und anschließend mit ebenfalls 400 ml Puffer B vermischt. Der Ansatz wird auf Eis für 1 h inkubiert.

Der Inkubationsansatz wird danach auf 12 Ultrazentrifugenröhrchen (Beckmann 45 Ti) verteilt und mit 5 ml Puffer C vorsichtig unterschichtet. Es folgt eine Zentrifugation für 1 h bei 110.000 g und 4°C. Die Pellets werden in 5 ml Puffer C mit einem Elvehjem-Homogenisator resuspendiert. Von dieser Suspension wird eine  $\text{OD}_{260}$  Bestimmung durchgeführt, um den ungefähren Gehalt an Polysomen zu ermitteln. Die Polysomensuspension wird anschließend über eine weitere Ultrazentrifugation bei 110.000 g und 4°C für 1,5 h gewaschen. Anschließend werden die Sedimente mit einem Spatel herausgekratzt und vereinigt. Die vereinigten Polysomen werden dann in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bis auf weiteres bei -80°C gelagert.

Von den Polysomen entnimmt man ca. 6000  $\text{OD}_{260}$  und resuspendiert diese in 15 ml Aufnahmebuffer. Diese Suspension wird dann bei 4°C, 10.000 g für 10 min zentrifugiert, um

ungelöste Bestandteile zu sedimentieren. Von einer zuvor angesetzten Puromycin-Lösung werden zu den 15 ml Suspension 150  $\mu$ l Lösung zugeführt und für 40 min bei 36°C inkubiert. In einem Gradienten von 0-40% Saccharose lassen sich beide Untereinheiten gemäß ihrer Dichte voneinander trennen. Die Auftrennung erfolgte in einem Zonalrotor bei 60.000 g, 12°C für 16,5 h. Der Gradient wird anschließend mit 50% Saccharoselösung abgepumpt und fraktioniert. Zudem wird die Verteilung der Untereinheiten über eine Extinktionsmessung bei 280 nm bestimmt. Die Fraktionen, welche die 60S rUE beinhalten, lassen sich anschließend vereinigen und werden mit 1M MgCl<sub>2</sub>-Lösung zur besseren Stabilität der 60S rUE auf eine Endkonzentration von 0,25 M MgCl<sub>2</sub> gebracht. Die 60S rUE der vereinigten Fraktionen werden in der Ultrazentrifuge für 22 h bei 150.000 g und 16°C sedimentiert. Die Sedimente werden folgend in Markierungspuffer resuspendiert und, nachdem die OD<sub>260</sub> bestimmt wurde, bei -80°C gelagert.

#### **5.4 Isolierung von Hsp90 aus Rattenhepatocyten**

Das bei der Zellkernpräparation nach dem ersten Zentrifugationsschritt anfallende Rohcytosol wird in der Ultrazentrifuge für 1 h bei 4°C und 130.000 g zentrifugiert. Der Überstand wird zweimal für zwei Stunden gegen 5 l HEPES-Puffer dialysiert, um die Saccharose aus der Lösung zu eliminieren und gleichzeitig das System von Tris/HCl auf HEPES/KOH umzupuffern. Das Dialysat wird anschließend für 14 h bei 4°C und 95.000 g ultrazentrifugiert.

Vom Überstand wird das flottierende Fett abgesaugt und der restliche Überstand gesammelt. Die so erhaltene cytosolische Fraktion kann eingefroren werden, um beispielsweise für Transportmessungen eingesetzt zu werden, oder wird unmittelbar der weiteren chromatographischen Aufarbeitung unterzogen. In diesem Falle erfolgt erst eine Anionenaustauscherchromatographie über eine Q-Sepharose Säule (Pharmacia; Flussrate 2 ml/min; Rückdruck 3 bar). Bei allen Chromatographischen Arbeiten wurden die Puffer vor ihrer Verwendung entgast. Das Säulenmaterial wird zuvor mit jeweils dem doppelten Säulenvolumen einfachen HEPES-Puffer gefolgt von HEPES-Puffer mit 1M NaCl und erneut einfachem HEPES-Puffer äquillibriert. Anschließend wird die Säule bei 250 mM NaCl beladen, und dann bei 450 mM NaCl eluiert, da die Hsp90 haltigen Fraktionen bei dieser Ionenkonzentration von der Säule gewaschen werden. Sobald kein Protein mehr detektiert werden kann, wird der Gradient auf 1M NaCl gestellt, um die Säule zu reinigen.

Die erhaltenen Fraktionen können über SDS-PAGE Gelelektrophorese (siehe 5.9 ) auf ihren Gehalt an Hsp90 hin untersucht werden. Danach können die relevanten Fraktionen in 2 ml Schritten über eine Superdex 200 (Pharmacia; Flussrate 1,5 ml/min; Rückdruck 15 bar) Gelfiltrationssäule nach ihren Proteinbestandteilen weiter aufgereinigt werden. Die Hsp90 Fraktionen eluieren ab 38 ml, gesammelt werden 10 Fraktionen zu je 6 ml. Die Fraktionen werden auf ihren Gehalt an Hsp90 hin überprüft, dann vereinigt und anschließend bei Bedarf mittels Zentrifugalkonzentratoren (Centriprep10; Amicon) eingengt. Danach werden die Fraktionen bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

## 5.5 Proteinbestimmung

Um den Proteinanteil von 60S rUE und von isolierten Rattenleberkernen bestimmen zu können, wurde jeweils die optische Dichte bei 260 nm ( $\text{OD}_{260}$ ) gemessen.

Aus der gemessenen OD lässt sich die Proteinmenge wie folgt ermitteln:

- 1.) Bei 60S rUE entspricht 1  $\text{OD}_{260}$  der Menge von 83  $\mu\text{g}$  60S rUE. Da 60S rUE neben 59% RNA-Anteil lediglich zu 41% aus Proteinen bestehen ergibt sich somit eine Proteinmenge von 34  $\mu\text{g}$  pro gemessener  $\text{OD}_{260}$ .
- 2.) Bei den isolierten Rattenleberkernen ergibt sich pro  $\text{OD}_{260}$  eine Anzahl von  $3 \times 10^6$  Kernen und eine Proteinmenge von 66  $\mu\text{g}$  Kernprotein.

Für alle übrigen Proteinbestimmungen fand der Proteintest der Firma Roth, welcher sich an die Methode nach Bradford (Bradford 1976) anlehnt, Verwendung.

## 5.6 Expression rekombinanter Proteine

Für die Expression der beiden rekombinanten Hsp90 Fragmente hHsp90 $\alpha$ 1-237 und hHsp90 $\alpha$ 238-732 wurden die entsprechenden Stämme aus der Gefrierkultur in 5 ml 2fach TY-Medium bei  $37^{\circ}\text{C}$  über Nacht im Schüttler angezogen. Damit wurde am nächsten Tag die Vorkultur und darüber die Hauptkultur angeimpft. Die Hauptkultur wurde bis zu einer Bakteriendichte von 0,8  $\text{OD}_{600}$  angezogen und dann mit 2 mM IPTG für 3-6 h induziert.



Daraufhin wurden die Zellen auf Eis gestellt und auf 2 mM PMSF, 2 µg / ml Leupeptin und 40 µg / ml Pepstatin (Sigma-Aldrich) gebracht. Die Zellen wurden in einem Zentrifugationsschritt bei 7.300 g für 20 min bei 4°C sedimentiert. Die Zellen wurden dann in Resuspendierungspuffer resuspendiert und bei -80°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurden die Zellen in einer French-Press (Cell Pressure 18000 psi) aufgeschlossen. Die erhaltene Lösung wurde für 30 min und 12.000 g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer 1 M Imidazol-Stammlösung, pH 7,6 auf eine Gesamtkonzentration von 10 mM Imidazol gebracht. Eine Ni-NTA-Superflow-Säule (Quiagen) für die FPLC wurde ebenfalls mit 10 mM Imidazol äquilibriert. Die Proteinlösung wurde auf die Säule aufgetragen und die Säule anschließend mit 30 mM Imidazol gewaschen. Die mit einem (His)-Taq versehenen Proteine wurden dann über einen linearen Gradienten von 30 - 500 mM Imidazol eluiert. Die eluierten Proteine wurden vereinigt und gegen HEPES-Puffer dialysiert. Danach wurden die Proteine aliquotiert und bei -80°C gelagert.

## 5.7 Endpunktbestimmungen mit wiederversiegelten Kernhüllen

Die entsprechenden zu untersuchenden Ansätze werden mit den wiederversiegelten Kernmembranen versetzt. Die Ansätze werden zu je 150 µl auf die vorbereiteten Mikrofugenröhrchen verteilt und daraufhin für 20 min bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit werden die Kernhüllen bei maximaler Geschwindigkeit in der Mikrofue E<sup>TM</sup> (Beckmann, 1-2 min) sedimentiert. Vom Überstand überträgt man 100 µl zur quantitativen Radioaktivitätsbestimmung in entsprechende Flüssigkeitsszintillationszählröhrchen (siehe 5.8).

## 5.8 Flüssigkeitsszintillationszählung

Um in Lösungen die Menge an radioaktiven Isotopen quantitativ auswerten zu können, werden die Lösungen in spezielle Zählröhrchen überführt und mit Szintillationsflüssigkeit auf das fünffache Volumen verdünnt. Die Proben können anschließend im Szintillationszähler (Beckmann, LS 6500) in cpm ausgezählt werden.

## 5.9 Gelelektrophorese

Alle durchgeführten SDS-Polyakrylamidgelelektrophoresen erfolgten nach einer modifizierten Methode von Laemmli (Laemmli et al. 1970). Hierbei fanden Minigelapparaturen von Biorad Verwendung. Die Rezepte für die einzelnen Geldichten sind in der folgenden Tabelle 6.1 aufgelistet.

**Tabelle 6.1:**

Trenngel	5%	7,5%	10%	12%	15%	18%	Sammelgel	4%	5%	6%
Wasser [ml]	5,53	4,7	3,85	3,5	2,5	1,5	Wasser [ml]	3,05	2,625	2,5
3M Tris pH 8,8 [ml]	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	0,5M Tris pH 6,8 [ml]	1,25	1,25	1,25
AA/BisAA [ml]	1,7	2,5	3,35	4	5	6	AA/BisAA [ml]	0,65	0,85	1
10% SDS [ $\mu$ l]	100	100	100	100	100	100	10% SDS [ $\mu$ l]	50	50	50
10% APS [ $\mu$ l]	150	150	150	150	150	150	10% APS [ $\mu$ l]	100	100	100
TEMED [ $\mu$ l]	10	10	10	10	10	10	TEMED [ $\mu$ l]	5	5	5

Für Gradientengele wurden die Rezepturen der Tabelle 6.2 verwendet. Von den Lösungen wurden jeweils 2,5-2,9 ml in einen Gradientenmischer gegeben.

**Tabelle 6.2:**

Gradientengel	5 %	7,5 %	15 %
Wasser [ml]	2,5	3,75	7,5
3M Tris pH 8,8 [ml]	9,175	7,9	4,175
AA/BisAA [ml]	1,875	1,875	1,875
10 % SDS [ $\mu$ l]	150	150	150
TEMED [ $\mu$ l]	6	6	6
10 % APS [ $\mu$ l]	60	60	60
Saccharose	-	-	2,5

## 5.10 Western-Blotting

Die Proteine einer Probe werden über eine SDS-PAGE Gelelektrophorese (siehe 5.9 ) gemäß ihrer Größe voneinander getrennt. Pro Gel werden vier Filterpapiere, zwei Vliese und eine PVDF-Membran (Millipore, Immobilon P) in frisch angesetztem CAPS-Puffer vorinkubiert. Nach der Elektrophorese wird das Gel entnommen und in CAPS-Puffer gewässert. Die Apparatur (Bio-Rad Minigel Blotting Apparatur) wird wie folgt unter CAPS-Puffer zusammengesetzt:

Auf die dunkle Seite der Apparatur wird ein Vlies gefolgt von zwei Filterpapieren gelegt. Darauf positioniert man das Gel und legt darüber die PVDF-Membran. Es folgen erneut zwei Filterpapiere und abschließend das zweite Vlies. Die Apparatur wird unter Puffer zusammengesetzt und verschlossen, damit sich keinerlei Luftblasen bilden können.

Die Apparatur wird in die Halterung gesteckt ein Eisbehälter wird eingehängt und die Gesamtapparatur mit CAPS-Puffer aufgefüllt. Der Elektrotransfer erfolgt bei 150 mA pro Gel für 1,5 - 2 h. Die Apparatur wird dabei auf Eis gekühlt , um eine Überhitzung und damit eine Widerstandserhöhung zu unterbinden.

Der Erfolg lässt sich überprüfen, indem man die Membran nach dem Elektrotransfer in einer Tintenfärbelösung für 20-30 min inkubiert wird. Die Proteinbanden werden dabei sichtbar, ohne dass dies das weitere Prozedere beeinflusst, und können bei Bedarf markiert werden. Anschließend kann die Membran über Nacht in TBST-Puffer mit 5 % Milchpulver bei 4°C geblockt, oder direkt mit dem ersten Antikörper (in TBST-Puffer mit 1 % Milchpulver) für eine Stunde bei RT inkubiert werden. Die Membran wird dreimal für 10 min in TBST-Puffer gewaschen. Es folgt die Inkubation mit dem zweiten Antikörper (ebenfalls in TBST-Puffer mit 1 % Milchpulver) der gegen den Fc-Teil des ersten Antikörper gerichtet und zusätzlich Peroxidase gekoppelt ist.

**Tabelle 5.3:**

primärer Antikörper	sekundärer Antikörper
Anti-Hsp90 $\alpha$ (N-17, Santa Cruz)	Anti-Ziege, Peroxidase (A5420, Sigma)
Anti-(His) <sub>5</sub> (Quiagen)	Anti-Maus, Peroxidase (A0412, Sigma)
Avidin-Peroxidase (A3151, Sigma)	kein zweiter Antikörper

Auch diese Inkubation benötigt eine Stunde und erfolgt bei RT. Es schließt sich erneut ein dreimaliges Waschen für 10 min mit TBST-Puffer bei RT an. Die Membran wird auf einen aufgeschnittenen Autoklavierbeutel in eine Expositionskassette gelegt. Die ECL-Lösung (NEN bzw. Amersham) wird zu gleichen Teilen gemischt und auf der Membran verteilt. Nach einer 1 minütigen Inkubation wird die überschüssige Lösung abgenommen und der Autoklavierbeutel luftblasenfrei zugeklappt. Die Exposition erfolgt in der Dunkelkammer unter Rotlicht. Hierzu wird ein Röntgenfilm in die Expositionskassette gelegt, und für 1-15 min belichtet. Danach wird der Film in Entwickler (Tetenal Eukobrom) gelegt und für 2-4 min entwickelt. Der Film wird in Wasser gewaschen und anschließend in Photofixierer fixiert, bis der Film klar geworden ist. Danach wird der Film für 10 min gewässert und zum trocknen aufgehängt.

Die Membran wird für eine Minute in Amidoschwarzfärbelösung getränkt anschließend mit Wasser abgespült und schließlich mit einfachem Entfärber entfärbt und zum trocknen aufgehängt.

## **5.11 *In vivo* Messungen in Oocyten von *Xenopus laevis***

### **5.11.1 Isolation und Aufbewahrung von Oocyten**

Die Arbeiten zur operativen Entnahme von Ovar aus *Xenopus laevis* wurden im Arbeitskreis Dr. Schmalzing durchgeführt. Nach der Präparation wurden die Ovarloben in Ori-Medium mittels einer feinen Pinzette vorsichtig geöffnet, um die Oberfläche für die anschließende Collagenasebehandlung zu vergrößern. Zuvor in Ori-Medium gelöste Collagenase (Serva) wird zu den geöffneten Loben zugegeben und für 3h bei RT inkubiert.

Danach wurden die Oocyten zweimal in Ori-Medium und anschließend dreimal in calciumfreiem Ori-Medium gewaschen. Es folgt eine 10 minütige Inkubation in calciumfreiem Ori-Medium, um die Folikeln vollständig abzulösen. Die Oocyten können nun durch mehrmaliges waschen mit calciumfreiem Medium von den Folikeln getrennt werden, um schließlich zur Lagerung in Ori-Medium überführt zu werden.

Von allen Oocyten wurden die in den Stadien V und VI befindlichen für die späteren Injektionen herausselektiert.

Bei der weiteren Lagerung sollte stets darauf geachtet werden, dass apoptotische Zellen ausgemustert werden, da sie ansonsten über Botenstoffe auch bei den übrigen Oocyten der Charge die Apoptose einleiten können. Berücksichtigt man dies und führt zudem einen regelmäßigen Mediumwechsel durch, so lassen sich die Oocyten bei RT über mehrere Tage lagern.

### 5.11.2 Mikroinjektion in Oocyten

Die für die Mikroinjektion benötigten Glasnadeln wurden aus mit einem Brown-Flaming Micropipette Puller aus Sodaglas kapillaren (Länge 100 mm,  $\varnothing$  1 mm) gezogen.

Zur Vorbereitung der Injektionsapparatur wird eine Injektionsnadel dem Vorrat entnommen und mittels einer Pinzettenschere am vordersten Ende abgeschnitten. Dabei sollte möglichst eine scharfe Kante entstehen, um nachher bei der Injektion leichter durch die Plasmamembran stechen zu können.

Die Nadel wird von hinten über eine Spritze mit Parafinöl luftblasenfrei befüllt, und anschließend manuell auf die Spitze des Nanoliter Injektors (WPI) gesteckt.

Um den Injektor präzise führen zu können, wird er in einen Mikromanipulator (WPI) gespannt. Die Funktionalität des Systems lässt sich nun überprüfen, indem man über die Injektaste einen Parafinöltropfen herausdrückt. Zur Befüllung der Nadel gibt man einen kleinen Tropfen des entsprechenden Injektats auf ein Stück Parafilm, führt die Spitze der Nadel vorsichtig über den Mikromanipulator in den Lösungstropfen und saugt das Injektat über die Fill-Taste in die Nadel.

Die für die Injektion vorgesehenen Oocyten werden in eine mit Rillen aus Sylgard versehenen Petrischale überführt. Je nachdem wohinein injiziert werden soll, wird die Oocyte mit einer Wimper so platziert, dass über den vorgegebenen Winkel des Mikromanipulators die entsprechende Stelle optimal getroffen werden kann.

Bei Injektionen in den Zellkern der Oocyte wurde die Oocyte so positioniert, dass das Zentrum des dunklen, animalen Pols genau getroffen werden konnte, da sich genau dort der Zellkern befindet. Das Volumen betrug hierbei maximal 18,5 nl. Bei cytosolischen Injektionen wurden bis zu 50,6 nl im Bereich des Äquators in die Zelle gespritzt. Nach der jeweiligen Injektion wurden die Oocyten bis zum Start der Messreihe auf Eis gelagert.

### 5.11.3 Darstellung einer Messreihe

Je nach Dauer und Umfang der Messreihe werden pro Messpunkt eine Petrischale vorbereitet, auf welche die Oocyten nach der Injektion verteilt werden können. Pro Messpunkt werden mindestens zehn Oocyten veranschlagt. Der Zeitrahmen einer Messreihe beträgt 0-6 h, wobei pro Stunde ein Messpunkt anfällt. Zur jeweiligen Stunde wird die entsprechende Anzahl an Oocyten entnommen und bei 4°C für 30 min in 1% TCA/Ori-Medium fixiert.

Nach der Fixierung können der Nukleus vom Cytosol getrennt werden. Hierfür fixiert man die Oocyte mit einer feinen Pinzette und ritzt den animalen Pol etwas seitlich mit einer Nadel vorsichtig an. Durch leichten Druck tritt der Nukleus, welcher zum gelblich-weißen Cytosol leicht bläulich schimmert, hervor und lässt sich mit der Nadel dann herauspräparieren. Wenn man das Kerninjektat mit Hämoglobin versehen hat, sollte der präparierte Nukleus bei erfolgreicher Kerninjektion leicht rosafarben schimmern. Nukleus und Cytosol lassen sich nun in separate Szintillationsröhrchen überführen und mittels Flüssigkeitszintillationszählung die cpm pro Fraktion bestimmen.

Die cpm-Werte können zueinander ins Verhältnis gesetzt werden, um so die prozentuale Verteilung der Radioaktivität pro Oocyte zu ermitteln. Der Wert des entsprechenden Messpunktes ergibt sich dann aus dem Mittelwert aller für diesen Messpunkt verwendeten Oocyten.

## 5.12 Synthese der Quervernetzungsreagenz APAI

Das Quervernetzungsreagenz APAI (p-Azidophenylacetylimidooester) wurde nach einer Vorschrift von Fink, Fasold und Rommel (Fink 1980) synthetisiert.

Vom Edukt p-Aminophenylcyanid wurden 0,1 Mol eingewogen und in 200 ml kalter 2N HCl gelöst. Zur Lösung werden 0,105 Mol in 170 ml H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> gelöstes Natriumnitrit zugegeben. Aufgrund der stark exothermen Reaktion sollte die Zugabe in kleineren Portionen unter Schütteln und auf Eis erfolgen. Der Ansatz wird für 10 min geschüttelt und anschließend für 30 min gerührt. Das überschüssige Nitrit wird mit 30 mg Harnstoff gefällt und kann über eine anschließende Filtration aus dem Ansatz eliminiert werden. 0,1 Mol Natriumazid werden in 5 ml H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> gelöst, und dem Filtrat zugegeben und geschüttelt. Das dabei entstehende p-Azidophenylcyanid lässt sich dann in zwei Extraktionsschritten mit jeweils 200 ml

Methylenchlorid ausschütteln. Danach wird die Lösung erst mit verdünnter Salzsäure, dann mit einer 5%igen Natriumbicarbonat-Lösung und abschließend mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$  gewaschen. Die Lösung wird über Nacht mit Natriumsulfat getrocknet und anschließend im Rotationsverdampfer bis zur Trockenheit eingeengt. Das getrocknete Zwischenprodukt wird in 20 ml wasserfreiem Methanol und 40 ml ebenfalls wasserfreiem Diethylether resuspendiert, und die resultierende Lösung bei  $0^\circ\text{C}$  mit wasserfreiem Chlorwasserstoffgas gesättigt. Die gesättigte Lösung wird für 12 h bei  $4^\circ\text{C}$  stengelassen. Es sollten sich in der Zeit erste Hydrochloridkristalle des Endproduktes gebildet haben. Produkt welches noch nicht ausgefallen ist kann mit wasserfreiem Diethylether in mehreren Extraktionsschritten ausgefällt und abfiltriert werden. Das Produkt wird mit wasserfreiem Diethylether gewaschen und über Phosphorpentoxid im Exsiccator getrocknet. Die Ausbeute liegt bei 75%.

## 5.13 Proteinmarkierung

### 5.13.1 Radioaktive Markierung mit $^{125}\text{J}$

Für eine Proteinlösung mit einer Gesamtproteinkonzentration von 10 mg/ml werden 0,25 mCi  $\text{N}^{125}\text{J}$  benötigt, welche in 100  $\mu\text{l}$  1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH 7,2 verdünnt und anschließend mit 100  $\mu\text{l}$  Chloramin T-Lösung versetzt wird. Chloramin T reduziert das freie Jod in der Lösung zu freiem Jodid. Die Iodidlösung wird zur Proteinlösung hinzu pipettiert und für 5 min inkubiert.

Danach wird die Reaktion durch Zugabe von Ascorbat gestoppt. Anschließend wird die Lösung gegen, mit Ascorbat versetzten, Inverspuffer dialysiert, um das freie Jod zu entfernen. Eine schonendere Variante der Jodierung erfolgte über den Einsatz von Iodo-Beads<sup>®</sup> (Pierce). Hierbei wurde  $\text{Na}^{125}\text{I}$  auf eine entsprechende Zahl der Kügelchen (0,55  $\mu\text{mol}$  / bead) gegeben und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Proteinlösung addiert und für weitere 15 min inkubiert. Die Reaktion wurde mit dem Zeitpunkt der Entfernung der Lösung von den Beads gestoppt. Die Proteinlösung wurde anschließend ebenfalls gegen Inverspuffer dialysiert. Von der Proteinlösung wird abschließend über Flüssigkeitszintillationszählung die spezifische Aktivität der Probe in cpm/ $\mu\text{g}$  bestimmt. Danach kann die Probe bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert werden.

### 5.13.2 Biotinylierung von Proteinen

Zu einer Proteinlösung von 1 ml Volumen und einer Proteinkonzentration von 2 mg/ml werden 150 µg Biotin (Sigma Aldrich) in möglichst wenig DMF gelöst und zur Proteinlösung gegeben. Der Ansatz wird für 2 h bei 4°C unter schütteln inkubiert. Danach wird das überschüssige Biotin durch Zugabe von 20 µl 1M Tris/HCl pH 7,4 abreagiert und kann anschließend über eine Gelfiltrationssäule vom Protein getrennt werden. Die Biotinylierung lässt sich nachweisen, indem man die Proteine im Western-Blotting auf eine PVDF Membran elektrotransferiert (siehe ) und anschließend für 1 h mit 10 µg Avidin (Peroxidase gekoppelt), welches in 50 ml TBST mit 1% Milchpulver gelöst wurde, inkubiert. Die Exposition erfolgt anschließen wie unter (5.10) beschrieben.

### 5.14 Quervernetzung von Proteinen

Das entsprechende Quervernetzungsreagenz wurde in einem entsprechenden Lösungsmittel als Stammlösung angesetzt. Von dieser Stammlösung die Menge an Reagenz entnommen wie sie dem Mengenverhältnis zum eingesetzten Protein entsprach, bei APAI wurde die fünffache molare Menge gegenüber dem Protein eingesetzt, und in Puffer vorgelöst. Protein- und Reagenzlösung wurden miteinander vermischt und unter Lichtausschluss bei 4°C im Schüttler für 1,5 h inkubiert. Durch Zugabe von Tris/HCl, pH 7,4 wurde die Reaktion gestoppt und überschüssige Imidoester abgefangen. Die Protein-APAI Lösung wird mit einer entsprechenden Menge isolierter Rattenleberzellkerne versetzt und nach Zugabe von 4 mM ATP und 2 mM DTT für 15 min unter Lichtausschluss unter leichtem Rühren inkubiert. Danach wurde der Ansatz für 15 min bei 256 nm bestrahlt. Die Kerne wurden mehrmals durch Zentrifugation (1000 g; 2 min 4°C) gewaschen. Die Überstände wurden vereinigt und aufkonzentriert (Centriprep). Die Kerne wurden der weiteren Extraktion zugeführt.



### **5.15 Darstellung eines Kernextraktes**

Die Darstellung eines Kernextraktes erfolgte gemäß einer Vorschrift von Ruoff (Ruoff 1998). Die Zellkernsuspension wurden vorsichtig bei 1500 g für 3 min bei 4°C zentrifugiert. Das Sediment wurde mit 5 M NaCl auf 1 M NaCl und mit Triton X-100 auf 1 % Triton X-100 eingestellt, und für 30 min auf Eis gerührt. Anschließend wurde die Suspension auf das 30fache Volumen mit Niedrigsalzpuffer verdünnt. Der Abbau der DNA wurde durch Zugabe von 5 U DNaseI (Boehringer Mannheim) gewährleistet. Der Ansatz wurde für 15 min bei RT gerührt. Abschließend wurden alle nicht löslichen Bestandteile über eine Ultrazentrifugation für 1h bei 4°C und 100000 g aus der Lösung entfernt.

### **5.16 Proteinrückelution**

Die SDS-PAGE wird in Färbelösung ohne Essigsäure für eine halbe Stunde gefärbt und anschließend mit 50 % Methanol entfärbt. Die relevanten Gelbereiche werden ausgeschnitten leicht zerdrückt, mit Laufpuffer versetzt und in die Kammer des Biotrap-Elektroseparationssystems (BioRad) überführt. Zwischen Anode und Anodenfalle sowie zwischen Anodenfalle und Gelkammer wurde eine glycerinierte Membran (BT1, Schleicher und Schüll) eingebracht, während die Gelkammer und Katode über eine trockene Membran (BT2, Schleicher und Schüll) voneinander getrennt wurden. Die Elution erfolgte bei RT unter konstanten 300 mV für einen Zeitraum von 3-5 h. Die Anodenfalle wurde regelmäßig entleert und die Kammer mit Laufpuffer wieder aufgefüllt. Anhand des Färbemittels konnte man den Stand der Elution stets gut verfolgen.

### **5.17 Bromcyan-Spaltung membrangebundener Proteine**

BrCN spaltet Peptidbindungen C-terminal von Methionin. Auf diese Weise lassen sich von einem Protein mehrere Fragmente mit unblockiertem N-Terminus erzeugen, welche folgend der partiellen Sequenzanalyse zugeführt werden können.

Die wie unter (5.10) auf einer PVDF-Membran fixierten und mit Amidoschwarz gefärbten Proteinbanden, werden ausgeschnitten, zerkleinert und in 2 ml Reaktionsgefäße überführt.

Die Membranstücke werden zweimal mit 2 ml Aceton gewaschen. Das Aceton wird dekantiert und anschließend werden die Membranstücke in 400  $\mu\text{l}$  BrCN-Lösung für 24 h im Dunkeln unter schütteln inkubiert. Durch Verdünnung des Ansatzes mit 800  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$  wird die Reaktion gestoppt. Der Überstand wird abgenommen und im Vakuumkonzentrator (Speedvac) auf ca. 50  $\mu\text{l}$  Volumen eingengt.

Um das restliche BrCN zu entfernen wird die Lösung mit 400  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$  abermals verdünnt und dann bis zur Trockenheit eingengt.

### 5.18 Affinitätschromatographie mit Heparin-HiTrap

Da CKII sehr effektiv an das Polyanion Heparin bindet, wurde versucht, die Hsp90 Präparation über eine weitere chromatographische Aufreinigung mit einer Heparin-HiTrap-Säule CKII frei zu bekommen. Dabei bindet CKII wesentlich stärker an das Polyanion Heparin als es Hsp90 tut. Da aber auch Hsp90 über seine geladene Mittelsequenz an Heparin zu binden vermag, musste es über einen Salzgradienten eluiert werden. Hsp90 eluierte bei ca. 200 mM NaCl wieder von der Säule, und wurde anschließend über Ultrafiltration (Centriprep10) entsalzt

Die Säule hatte ein Bettvolumen von 5 ml. Die Flussgeschwindigkeit betrug durchgehend 2 ml / min. bei einem maximalen Rückdruck von 10 bar ( $\sim 1,0$  MPa).

### 5.19 Phosphorylierung und radioaktive Exposition

Für die Phosphorylierungsversuche wurde  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP von Amersham (100 mCi / ml; spezifische Aktivität 30 Ci / mmol; Amersham-Pharmacia) eingesetzt. Alle Phosphorylierungsversuche wurden über eine SDS-PAGE analysiert.

Alle SDS-PAGEs in denen radioaktive Substanzen untersucht wurden, konnten nach dem Trocknen in eine PhosphoImager -Kassette eingelegt und exponiert werden. Die Platte konnte nach erfolgter Exposition im PhosphoImager (Modell 445 SI, Molecular Dynamics) abgescannt und ausgewertet werden (ImageQuANT V.4.2; Molecular Dynamics).

## 5.20 Herstellung eines Hsp90-Agarose Gels

Um Hsp90 zu immobilisieren wurden 10 ml Affi-Gel 10 (BioRad) in 50 mM Phosphatpuffer (pH 8,0) im Batch-Verfahren gewaschen. Anschließend wurden 5 mg Hsp90 zu dieser Suspension gegeben und das Ganze unter leichter Rotation bei 4°C für 3 h reagieren gelassen. Der aktivierte Ester der Agarose reagiert mit freien Aminogruppen des Proteins kovalent ab. Anschließend wurden 1 ml 1 M Tris/HCl, pH 7,4 zum Reaktionsansatz gegeben, und für weitere 1,5 h bei 4°C rotieren gelassen, um überschüssige Ester zu blockieren. Abschließend wird das Gel in HEPES-Puffer mit 1 % BSA und 0,03 % NaN<sub>3</sub> mehrmals im Batch-Verfahren gewaschen und kann dann bei 4°C für kurze Zeit (wenige Tage) gelagert werden.

## 5.21 Darstellung eines Gels mit immobilisiertem Novobiocin

Es werden 3g Epoxy-aktivierte Sepharose 6B (Sigma) in H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub> für 1 h quellen gelassen. Das entstandene Gel wird mit Kopplungspuffer gewaschen, bis es einen pH von 9,5 aufweist. 400 µg Novobiocin (Sigma) werden in 10 ml Kopplungspuffer gelöst. Im weiteren sollten die Schritte möglichst unter Lichtausschluß erfolgen, da Novobiocin relativ lichtempfindlich reagiert. Das Gel und die Novobiocin-Lösung werden in einen Rundkolben gegeben und bei 30-40°C unter leichtem Schwenken wird das Novobiocin über 20 h an die Sepharose gekoppelt. Danach wird das Gel im Batchverfahren mehrmals mit Kopplungspuffer gewaschen, um nicht gekoppeltes Novobiocin zu entfernen. Anschließend wird mit Kopplungspuffer + 1 M Ethanolamin gewaschen. Um verbliebene Epoxygruppen der Sepharose zu blocken, wird der Ansatz unter leichtem Schwenken bei 30°C für 12 h inkubiert. Daraufhin wird das Gel mit folgenden Lösungen gewaschen:

- 1.) Kopplungspuffer
- 2.) Kopplungspuffer + 0,5 M NaCl
- 3.) H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub>
- 4.) 0,1 M Natriumacetatpuffer pH 4 + 0,5 M NaCl
- 5.) H<sub>2</sub>O<sub>demin</sub>
- 6.) Äquilibrierungspuffer

Das Gel kann im Äquilibrierungspuffer bei 4°C lichtgeschützt gelagert werden.

## 5.22 Darstellung eines kolloidalen Gold-Protein Komplexes

Diese Durchführung folgt einer Vorschrift von Slot und Geuze (Slot & Geuze 1985).

Für 8-nm Goldpartikel wurden 80 ml einer 0,01 % HAuCl<sub>4</sub>-Lösung (HAuCl<sub>4</sub> von Sigma G-4022) hergestellt. Die Lösung wird in einem siliconisiertem Becherglas gerührt und auf 60°C erhitzt. Anschließend werden 20 ml Gold-Reduktionslösung zugegeben, die Lösung aufgekocht und wieder abgekühlt. Die Lösung wird für die Lagerung auf 0,01 % NaN<sub>3</sub> gebracht und kann so unter Lichtausschluss bei RT gelagert werden.

Um die Stabilität eines Protein-Gold-Komplexes zu überprüfen, wurde eine Verdünnungsreihe der Proteinlösung erstellt und diese in 5 µl Tropfen auf einen Parafilm gebracht.

Zu diesen Tropfen wurden nacheinander jeweils 25 µl der Goldlösung und 25 µl 10 % NaCl-Lösung gegeben und jeweils miteinander gut vermischt. Die Tropfen wurden betrachtet und die Konzentration, bei welcher ein Wechsel der Farbe von Rot zu Blau feststellbar war, stellte die kritische Konzentration dar, bei welcher der Gold-Protein-Komplex instabil zu werden beginnt. Protein und Goldlösung wurden in entsprechender Konzentration gemischt und für 15 min gerührt. Mit einer BSA-Stammlösung wird die Gold-Protein Lösung auf eine Konzentration von 0,1 % BSA gebracht, um überschüssiges Gold zu binden. Anschließend wurde die Lösung für 15 min bei 4°C und 32.000 rpm (Beckmann 50.1 Ti) zentrifugiert.

Das lockere Pellet wird in PBS mit 0,1 % BSA resuspendiert.

## 5.23 Transmissionselektronenmikroskopie

20 OD isolierter Rattenleberzellkerne wurden bei 1.000 g in 2 min sedimentiert und anschließend in PBS mit 1 % BSA resuspendiert. Dazu wurden 50 bzw. 100 µg des zu untersuchenden Proteins (Hsp90) gegeben. Der Ansatz wurde unter leichter Rotation über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 800 µl PBS mit 1 % BSA gewaschen (Zentrifugation bei 1.000 g für 2 min), und das Sediment in 100 µl PBS mit 1 % BSA resuspendiert. Hierzu wurden entweder 5 µl Streptavidin-Gold oder 5 µl des Gold-markierten Antikörpers hinzugegeben und für eine weitere Stunde bei RT inkubiert. Danach wurden 800 µl PBS hinzugegeben und die Lösung 2 min bei 2.000 g zentrifugiert. Das Pellet wurde in PBS mit 1 % BSA resuspendiert und zweimal gewaschen. Anschließend wurde mit 2 % Glutardialdehyd in PBS für 30 min im Taumler fixiert.

Die Kerne wurden erneut zweimal mit PBS gewaschen und dann in Agar eingebettet. Alle weiteren Schritte bis hin zur Aufnahme wurden ausschließlich von Ursula Sauder am Biozentrum der Universität Basel (Schweiz) durchgeführt.

## 6. Puffer und Lösungen

### AA/Bis-Lösung

29,5 g Acrylamid  
0,5 g N,N'-methylen-bisacrylamid  
auf 100 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auffüllen

### Äquilibrationpuffer

25 mM HEPES/KOH, pH 8  
1 mM EDTA  
200 mM KCl  
10 % Ethylenglykol  
0,03% NaN<sub>3</sub>

### Amidoschwarzfärbelösung

1 g Amidoschwarz 10b (Serva)  
20 ml Essigsäure  
100 ml Methanol

### Aufnahmepuffer

40 mM Tris/HCl, pH 7,4  
3 mM MgCl<sub>2</sub>  
25 mM NaCl  
3 mM DTT  
0,5 mM PMSF

### BrCN-Lösung

70 mg BrCN  
in 400µl 13% Acetonitril, 87% Ameisensäure

### CAPS-Puffer

10 mM CAPS/NaOH, pH 10,5-11  
12,5 % Methanol)

### Chloramin T-Lösung

2 mg / ml Chloramin-T in 50 mM Phosphatpuffer pH 7,4

### Entfärber

10 % Eisessig  
40 % Methanol

**Gelfärbelösung**

10 % Essigsäure  
10 % Methanol  
0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma-Aldrich)

**Gelfärbelösung ohne Essigsäure**

50 % Methanol  
0,1 % Coomassie Brillant Blue R250

**Gold-Reduktionslösung**

4 ml 1 % Na-Citrat-Lösung  
0,5 ml 1 % Tanninsäure  
0,5 ml 25 mM  $\text{KCO}_3$   
auf 20 ml mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  auffüllen

**HEPES-Puffer**

50 mM HEPES/KOH, pH 7,4  
25 mM KCl  
5 mM NaCl  
0,5 mM  $\text{CaCl}_2$   
1,25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,4

**Inverspuffer**

50 mM HEPES/KOH pH 7,4  
110 mM KAc  
5 mM NaAc  
5 mM  $\text{MgAc}_2$   
2 mM DTT

**Kopplungspuffer**

0,3 M  $\text{Na}_2\text{HCO}_3$ , pH 9,5

**Laufpuffer**

3 g Tris  
14,4 g Glycin  
1 g SDS  
auf 1000 ml mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest.}}$  auffüllen

**Markierungspuffer**

50 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ , pH 7,2  
5 mM  $\text{MgCl}_2$

**Niedersalzpuffer**

25 mM Tris/HCl      pH 7,4

**Ni-NTA-Säulen-Puffer**

10 mM; 30 mM; 500 mM und 1M Imidazol, pH 7,6  
0,5 M NaCl

**Ori-Medium**

5 mM HEPES/KOH, pH 7,4  
110 mM NaCl  
1 mM KCl  
1 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM CaCl<sub>2</sub>  
50 mg / l Streptomycin oder Penicilin

**PBS**

80 g NaCl  
2 g KCl  
16,6 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4  
ad 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auffüllen

**Perchlorsäure (Dichte = 1,3 g / ml)**

4,6 ml HClO<sub>4</sub>  
5,4 ml H<sub>2</sub>O

**Permeabilisierungspuffer**

10 mM Tris/HCl, pH 8,0  
10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8,0  
0,5 mM PMSF

**Photofixierer**

1 % w/v Natriumpyrosulfit  
10 % w/v Natriumthiosulfat

**Puffer A**

25 mM Tris/HCl, pH 7,4  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
25 mM NaCl  
3 mM DTT  
2 % v/v Triton X-100  
1 mg / ml Heparin (Liquemin N 25.000, Roche)  
0,5 mM PMSF



**Puffer B**

25 mM Tris/HCl, pH 7,4  
200 mM MgCl<sub>2</sub>  
25 mM NaCl

**Puffer C**

25 mM Tris/HCl, pH 7,4  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
25 mM NaCl  
40 % w/v Saccharose  
0,5 mM PMSF

**Puromycin-Lösung**

10 mg Puromycin auf 500 µl Wasser

**Resuspendierungspuffer**

0,2 M Tris/HCl, pH 8,0  
0,5 M NaCl  
5 mM β-Mercaptoethanol  
1 mM PMSF

**SDS-Probenpuffer**

8 ml 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8  
6,2 ml Glycerin  
12,8 ml 10 % SDS  
3,2 ml β-Mercaptoethanol  
1,6 ml 0,1 % Bromphenolblau

**Siliconöl (Dichte = 1,03 g / ml)**

1 Teil Siliconöl Typ 3 (Merck)  
4 Teile Siliconöl Typ 550 (Merck)  
48 h rühren, dann ruhen lassen

**0,25/2,3 M STKMC-Puffer**

50 mM Tris/HCl, pH 7,4  
25 mM KCl  
5 mM MgCl<sub>2</sub>  
3,3 mM CaCl<sub>2</sub>  
0,5 mM PMSF  
0,25/2,3 M Saccharose

**TBST-Puffer**

10 mM Tris/HCl, pH 7,4  
150 mM NaCl  
0,05% Triton X-100

**Tintenfärbelösung**

98,9 % TBST  
1 % Eisessig  
0,1 % Pelikan Tinte 4001 Königsblau

**Transportpuffer**

50 mM Tris/HCl, pH 7,4  
25 mM KCl  
5 mM NaCl  
2,5 mM MgCl<sub>2</sub>  
2,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4  
0,5 mM CaCl<sub>2</sub>  
5 mM Spermidin  
0,5 mM PMSF

**TY-Medium**

0,8 % Casein-Hydrolysat  
0,5 % Hefeextrakt  
0,5 % NaCl  
pH 7,4

## 7. Literaturverzeichnis

- Adam S.A.  
Current Opinion in Cell Biology; 11; 402-406; 1999  
"Transport pathways of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm"
- Aebi U.; Cohn J.; Buhle L.; Gerace L.  
Nature; 323; 560-564; 1986  
"The nuclear lamina is a meshwork of intermediate-type filaments"
- Ahmed K.  
Critical Review of Eukaryotic Gene Expression; 9; 329-336; 1999  
"Nuclear matrix and protein kinase CK2 signaling"
- Akey C.; Rademacher M.  
The Journal of Cell Biology; 122; 1-19; 1993  
"Architecture of the *Xenopus* nuclear pore complex revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy"
- Aitchison J.D.; Rout M.P.  
The Journal of Cell Biology; 151; F23-F26; 2000  
"The road to ribosomes: Filling potholes in the export pathway"
- Akner G.; Mossberg K.; Sundqvist K.; Gustafson J.; Wikstrom A.  
European Journal of Cell Biology; 58 (2); 356-364; August 1992  
"Evidence for reversible, non-microtubule and non-microfilament-dependent nuclear translocation of hsp90 after heat shock in human fibroblasts"
- Allen T.D.; Goldberg W.M.  
Trends in Cell Biology; 5; 176-178; 1995  
"Four functions and a funeral: mitosis, replication, transcription transport and apoptosis in the nucleus"
- Ali A.; Bharadwaj S.; O'Carroll R.; Ovsenek N.  
Molecular and Cellular Biology; 18; 4949-4960; 1998  
"Hsp90 interacts with and regulates the activity of heat shock factor 1 in *Xeopus* oocytes"
- Allison L.; North M.; Murdoch K.; Romaniuk P.; Dechamps S.; Maire M.  
Molecular Cell Biology; 13; 6819-6831; 1993  
"Structural requirements of 5S rRNA for nuclear transport, 7S ribonucleoprotein particle assembly and 60S ribosomal subunit assembly in *Xenopus* oocytes"
- Allison L.; North M.; Neville L.  
Developmental Biology; 168; 284-295; 1995  
"Diferential binding of oocyte-type and somatic-type 5S rRNA to TFIIA and ribosomal protein L5 in *Xenopus* oocytes: specialization for storage versus mobilization"
- Allison L.; Romaniuk P.; Bakken A.  
Developmental Biology; 144; 129-144; 1991  
"RNA protein interactions of stored 5S rRNA with TFIIA and ribosomal protein L5 during *Xenopus* oogenesis"
- Albertini M.; Pemberton L.F.; Rosenblum J.S.; Blobel G.  
The Journal of Cell Biology; 143; 1447-1455; 1998  
"A novel import pathway for the transcription factor TFIIS"
- Annilo T.; Karis A.; Hoth S.; Rikk T.; Kruppa J.; Metspalu A.  
Biochemical and Biophysical Research Communications; 249; 759-766; 1998  
"Nuclear import and nucleolar accumulation of human ribosomal protein S7 depends on both a minimal nuclear localization sequence and adjacent basic region"

- Arts G.; Fornerod M.; Mattaj I.  
Current Biology; 8; 305-314; 1998  
"Identification of a nuclear export factor for tRNA"
- Arts G.; Kuersten S.; Romby P.; Ehresmann B.; Mattaj I.  
The EMBO Journal; 17; 7430-7441; 1998  
"The role of exportin-t in selective nuclear export of mature t-RNAs"
- Askjaer P.; Bachi A.; Wilm M.; Bischoff F.R.; Weeks D.L.; Ogniewski V.; Ohno M.; Niehrs C.; Kjellms C. et al.  
Molecular and Cellular Biology; 19; 6276-6285; 1999  
"Ran-GTP regulated interactions of CRM1 with nucleoporins and a shuttling DEAD-box helicase"
- Askjaer P.; Jensen T.H.; Nillson J.; Englmeier L.; Kjellms C.  
The Journal of Biological Chemistry; 273; 33414-33422; 1998  
"The specificity of the Crm1-Rev nuclear export signal interaction is mediated by RanGTP"
- Azuma Y.; Dasso M.  
Current Opinion in Cell Biology; 12; 302-307; 2000  
"The role of ran in nuclear function"
- Azuma Y.; Tabb M.M.; Vu L.; Nomura M.  
PNAS; 92; 5159-5163; 1995  
"Isolation of a yeast protein kinase that is activated by the protein encoded by SRP1 (Srp1p) and phosphorylates Srp1p complexed with nuclear localization signal peptides"
- Azuma Y.; Takio K.; Tabb M.M.; Vu L.; Nomura M.  
Biochimie; 79; 247-259; 1997  
"Phosphorylation of Srp1p, the yeast nuclear localization signal receptor, *in vitro* and *in vivo*"
- Bachi A.; Braun IC; Pante N. Ribbeck K.; Kuttay U.; Wilm M.; Gorlich D.; Carmo Fonseca M.; Izaurrealde E.  
RNA; 6 (1); 136-158; Januar 2000  
"The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates"
- Bailer S.M.; Balduf C.; Katahira J.; Podtelejnikov A.; Rollenhagen C.; Mann M.; Panté N.; Hurt E.D.  
The Journal of Biological Chemistry; 275; 23540-23548; 2000  
"Nup116p associates with the Nup82p-Nsp1Nup159p nucleoporin complex"
- Bamberger C.M.; Wald M.; Bamberger A.M.; Schulte H.M.  
Molecular and Cellular Endocrinology; 131; 233-240; 1997  
"Inhibition of the mineralocorticoid and glucocorticoid receptor function by the heat shock protein 90-binding agent geldanamycin"
- Bangs P.; Burke B.; Powers C.; Craig R.; Purohit A.; Doxsey S.  
The Journal of Cell Biology; 143 (7); 1801-1812; Dezember 1998  
"Functional analysis of Tpr: identification of nuclear pore complex association and nuclear localization domains and a role in mRNA export"
- Bangs PL; Sparks CA; Odgren P.; Fey E.  
Journal of Cell Biochemistry; 61 (1); 48-60; April 1996  
"Product of the oncogene-activating gene Tpr is a phosphorylated protein of the nuclear pore complex"
- Barth W.; Stochaj U.  
Biochemistry and Cell Biology; 74; 363-372; 1996  
"The yeast nucleoporin Nsp1p binds nuclear localization sequences *in vitro*"
- Baschong W.; Wrigley N.G.  
Journal of Electron Microscopy Technic; 14; 313-323; 1990  
"Small colloidal gold conjugated to Fab fragments or to immunoglobulin G as high-resolution labels for electron microscopy: a technical overview"

- Bastos R.; de Pouplana L.R.; Enarson M.; Bodoor K.; Burke B.  
The Journal of Cell Biology; 137; 989-1000; 1997  
"Nup84, a novel nucleoporin that is associated with CAN/Nup214 at the cytoplasmic face of the nuclear pore complex"
- Bastos R.; Lin A.; Enarson M.; Burke B.  
The Journal of Cell Biology; 134 (5); 1141-1156; September 1996  
"Targeting and function in mRNA export of nuclear pore complex protein Nup153"
- Bataille N.; Helser T.; Fried H.  
The Journal of Cell Biology; 111; 1571-1582; 1990  
"Cytoplasmic transport of ribosomal subunits microinjected into the *Xenopus laevis* oocyte nucleus: a generalized, facilitated process"
- Bayliss R.; Ribbeck K.; Akin D.; Kent H.; Feldherr C.; Görlich D.  
Journal of Molecular Biology; 293; 579-593; 1999  
"Interaction between NTF2 and xFxFG-containing nucleoporins is required to mediate nuclear import of RanGDP"
- Bear J.; Tan W.; Zolotukhin A.; Hudson E.; Felber B.  
Molecular Cell Biology; 19; 6306-6317; 1999  
"Identification of novel import and export signals of human TAP, that protein that binds to the constitutive transport element of the type-D retrovirus mRNAs"
- Belgareh N.; Doye V.  
The Journal of Cell Biology; 136; 747-759; 1997  
"Dynamics of nuclear pore distribution in nucleoporin mutant yeast cells"
- Belgareh N.; Snay-Hodge C.; Pasteau F.; Dagher S.; Cole C.; Doye V.  
Molecular Biology of the Cell; 9 (12); 3475-3492; Dezember 1998  
"Functional characterization of a Nup159p-containing nuclear pore subcomplex"
- Bell J.; Neilson L.; Pellegrini M.  
Molecular Cell Biology; 8; 91-95; 1988  
"Effect of heat shock on ribosomae synthesis in *Drosophila melanogaster*"
- Ben-Elfraim I.; Gerace L.  
The Journal of Cell Biology; 152; 411-417; 2001  
"Gradient of increasing affinity of importin  $\beta$  for nucleoporins along the pathway of nuclear import"
- Biggiogera M.; Tanguay R.; Marin R.; Wu Y.; Martin T.; Fakan S.  
Experimental Cell Research; 229; 77-85; 1996  
"Localization of heat shock proteins in mouse male germ cells: an immunoelectron microscopy study"
- Bischoff FR; Görlich D.  
FEBS Letters; 419; 249-254; 1997  
"RanBP1 is crucial for the release of Ran GTP from importin beta-related nuclear transport factors"
- Bischoff FR; Klebe C.; Kretschmer J.; Wittinghofer A.; Ponstingl H.  
PNAS; 91; 2587-2591; 1994  
"RanGAP induces GTPase activity of nuclear ras-related Ran"
- Bischoff FR; Krebber H.; Smimova E.; Dong W.; Ponstingl H.  
The EMBO Journal; 14; 705-715; 1995  
"Coactivation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by RanGTP binding protein RanBP1"
- Bischoff FR; Ponstingl H.  
PNAS; 88; 10830-10834; 1991a  
"Mitotic regulator protein RCC1 is complexed with a ras-related polypeptide"

- Bischoff FR; Postingl H.  
Nature; 354; 80-82; 1991b  
"Catalysis of guanine nucleotide exchange of Ran by the mitotic regulator RCC1"
- Black B.E.; Levesque L.; Holaska J.M.; Wood T.C.; Paschal B.M.  
Molecular and Cellular Biology; 19; 8616-8624; 1999  
"Identification of a NTF2-related factor that binds RanGTP and regulates nuclear protein export"
- Blatch GL; Lässle M.  
BioEssays; 21; 932-939; 1999  
"The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein-interactions"
- Blobel G.  
PNAS; 82; 8527-8529; 1985  
"Gene gating: a hypothesis"
- Blobel G.; Potter VR  
Science; 154; 1662-1665; 1966  
"Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield"
- Blom N.; Gammeltoft S.; Brunak S.  
Journal of Molecular Biology; 294; 1351-1362; 1999  
"Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites"
- Blumer KJ; Johnson GL  
Trends in Biochemical Science; 19; 236-240; 1994  
Diversity in function and regulation of MAP kinase pathway"
- Boche I.; Fanning E.  
The Journal of Cell Biology; 139; 313-325; 1997  
"Nucleocytoplasmic recycling of the nuclear localization signal receptor  $\alpha$  *in vivo* is dependent on a nuclear export signal, energy, and RCC1"
- Boer J.M.; van Deursen J.M.A.; Croes H.J.; Fransen J.A.M.; Grosveld G.C.  
Experimental Cell Research; 232; 182-185; 1997  
"The nucleoporin CAN/Nup214 binds to both the cytoplasmic and the nucleoplasmic site of the nuclear pore complex in overexpressing cells"
- Bodoor K.; Shaikh S.; Enarson P.; Chowdhury S.; Salina D.; Raharjo WH; Burke B.  
Biochemical Cell Biology; 77 (4); 321-329; 1999  
"Function and assembly of nuclear pore complex proteins"
- Bogatcheva NV.; Ma Y.; Urosev D.; Gusev NB  
FEBS-Letters; 457 (3); 369-374; September 1999  
"Localization of calponin binding sites in the structure of 90 kDa heat shock protein (Hsp90)"
- Bogerd H.P.; Benson R.E.; Truant R.; Herold A.; Phinbodhipakkiya M.; Cullen B.R.  
The Journal of Biological Chemistry; 274; 9771-9777; 1999  
"Definition of a consensus transportin-specific nucleocytoplasmic transport signal"
- Bohen S.P.  
The Journal of Biological Chemistry; 270; 29433-29438; 1995  
"Hsp90 mutants disrupt glucocorticoid receptor ligand binding and destabilize aporeceptor complexes"
- Booth J.W.; Belanger K.D.; Sanella M.I.; Davis L.I.  
The Journal of Biological Chemistry; 274; 32360-32367; 1999  
"The yeast nucleoporin Nup2p is involved in nuclear export of importin  $\alpha$ /Srp1p"
- Borer RA; Lehner CF; Eppenberger HM; Nigg EA  
Cell; 56; 379-390; 1989  
"Major nucleolar proteins shuttle between the nucleus and cytoplasm"

- Bornens M; Courvalin JC  
Journal of Cell Biology; 76; 191-206; 1978  
"Isolation of nuclear envelopes with polyanions"
- Boulikas T.  
Critical Review of Eukaryotic Gene Expression; 3; 193-227; 1993  
"Nuclear localization signals (NLS)"
- Bouvet P.; Odiaz JJ; Kindbeiter K.; Madjar JJ; Amalric F.  
The Journal of Biological Chemistry; 273; 19025-19029; 1998  
"Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain"
- Bradford MM  
Analytical Biochemistry; 72; 248-254; 1976  
"A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins utilizing the principle of Protein-Dye binding"
- Bresnick EH; Dalman FC; Sanchez ER; Pratt WB  
Journal of Biological Chemistry; 264; 4992-4997; 1989  
"Evidence that the 90-kDa heat shock protein is necessary for the steroid binding conformation of the L cell glucocorticoid receptor"
- Bucci M.; Wente S.R.  
The Journal of Cell Biology; 136; 1185-1199; 1997  
"In vivo dynamics of nuclear pore complexes in yeast"
- Buchner J.; Bose S.; Mayr C.; Jakob U.  
Methods of Enzymology; 290; 409-419; 1998  
"Purification and characterization of prokaryotic and eukaryotic Hsp90"
- Buchner J.  
Trends in Biochemical Science; 24; 136-141; 1999  
"Hsp90 & CO. - a holding for folding"
- Buendia B.; Santa-Maria A.; Courvalin JC  
Journal of Cell Science; 112; 1743-1753; 1999  
"Caspase-dependent proteolysis of integral and peripheral proteins of nuclear membrane and nuclear pore complex proteins during apoptosis"
- Bugler B.; Caizergues-Ferrer M.; Bouche G.; Bourbon H.; Amalric E.  
European Journal of Cell Biology; 128; 475-480; 1992  
"Detection and localization of a class of proteins immunologically related to 100-kDa nucleolar protein"
- Bullock T.L.; Clarkson W.D.; Kent H.M.; Stewart M.  
Journal of Molecular Biology; 260; 422-431; 1996  
"The 1.6 Å resolution crystal structure of nuclear transport factor 2 (NTF2)"
- Bustamante J.O.; Michelette E.R.F.; Geibel J.P.; Dean D.A.; Hanover J.A.; McDonnell T.J.  
European Journal of Physiology; 439; 433-444; 2000  
"Calcium, ATP and nuclear pore channel gating"
- Byrd D.; Sweet D.; Panté N.; Konstantinov K.; Guan T.; Saphire A.; Mitchell P.; Cooper C.; Aebi U.; Gerace L.  
The Journal of Cell Biology; 127 (6/1); Dezember 1994; 15515-1526  
"Tpr, a large coiled coil protein whose amino terminus is involved in activation of oncogenic kinases, is localized to the cytoplasmic surface of the nuclear pore complex"
- Cambiagno V.; Gonzales M.; Isamit C.; Maccioni RB  
FEBS Letters; 457; 343-347; 1999  
"The beta isoform of heat shock protein Hsp90 is structurally related with the microtubule-interacting protein Mip90"

- Cano E.; Mahadevan LC  
Trends in Biochemical Science; 20; 117-122; 1995  
"Parallel signal processing among mammalian MAPKs"
- Caplan AJ  
Trends in Cell Biology; 9; 262-267; 1999  
"Hsp90 secrets unfold: new insights from structural and functional studies"
- Carello A.; Ingley E.; Minchin RF; Tsai S.; Ratajczak T.  
Journal of Biological Chemistry; 274; 2682-2689; 1999  
"The common tetratricopeptide repeat acceptor site for steroid receptor associated immunophilins and hop is located in the dimerization domain of Hsp90"
- Carrier K.; Xiang Y.; Sanfacon H.  
Journal of General Virology; 82; 1785-1790; 2001  
"Genomic organization of RNA2 of *tomato ringspot virus*: processing at a third cleavage site in the N-terminal region of the polyprotein *in vitro*"
- Cezanne V.  
Dissertation; Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main  
"Untersuchungen zum Einfluss cytosolischer Faktoren auf den Transport von 60S ribosomalen Untereinheiten aus Vesikeln der Kernhülle"
- Chadi A.; Ladjimi MM; Baulieu E.; Catelli MG  
Journal of Biological Chemistry; 274; 4133-4139; 1999  
"Heat-induced oligomerization of the molecular chaperone Hsp90"
- Chadi A.; Bouhouche I.; Sullivan W.; Stensgard B.; McMahon N.; Catelli M.G.; Toft D.O.  
PNAS; 97; 12524-12529; 2000  
"Dimerization and N-terminal domain proximity underlie the function of the molecular chaperone heat shock protein 90"
- Chen D.; Huang S.  
The Journal of Cell Biology; 153; 169-176; 2001  
"Nuclear components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells"
- Chen SY; Prapapanich V.; Rimerman RA; Honore B.; Smith DF  
Molecular Endocrinology; 10; 682-693; 1996  
"Interactions of p60, a mediator of progesterone receptor assembly, with Hsp90 and Hsp70"
- Chen SY; Smith DF  
Journal of Biological Chemistry; 273; 35194-35200; 1998  
"Hop as an adaptor in the heat shock protein 70 (hsp70) and Hsp90 chaperone machinery"
- Chen SY; Sullivan WP; Foft DO; Smith DF  
Journal of Biological Chemistry; 273; 35194-35200; 1998 Cell Stress Chaperones; 3; 116-129; 1998  
"Differential interactions of p23 and the TPR-containing proteins Hop, Cyp40, FKBP51 with hsp90 mutants"
- Chi N.C.; Adam E.J.H.; Adam S.A.  
The Journal of Biological Chemistry; 272; 6818-6822; 1997  
"Different binding domains for RanGTP and RanGDP/RanBP1 on nuclear import factor p97"
- Chook YM; Blobel G.  
Nature; 399 (6733); 230-237; Mai 1999  
"Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp"
- Claußen M.; Rudt F.; Pieler T.  
The Journal of Biological Chemistry; 274; 33951-33958; 1999  
"Functional modules in ribosomal protein L5 for ribonucleoprotein formation and nucleocytoplasmic transport"



- Cobb MH; Goldsmith EJ  
Trends in Biochemical Science; 25; 7-9; 2000  
"Dimerization in MAP-kinase signaling"
- Cohen M.; Lee K.K.; Wilson K.L.; Gruenbaum Y.  
Trends in Biochemical Science; 26; 41-47; 2001  
"Transcriptional repression, apoptosis, human disease and the functional evolution of the nuclear lamina"
- Cole C.N.; Hammel C.M.  
Current Biology; 8; R368-R372; 1998  
"Nucleocytoplasmic transport: Driving and directing transport"
- Collas P.; Courvalin J.C.  
Trends in Cell Biology; 10; 5-8; 2000  
"Sorting nuclear membrane proteins at mitosis"
- Corbett A.H.; Koepf D.M.; Schinstedt G.; Lee M.S.; Hopper A.K.; Silver P.A.  
Journal of Cell Biology; 130; 1017-1026; 1995  
"Rna1p, a Ran/TC4 GTPase-activating protein, is required for nuclear import"
- Corbett A.H.; Silver P.A.  
Microbiology and Molecular Biology reviews; 61; 193-211; 1997  
"Nucleocytoplasmic transport of macromolecules"
- Cordes V.C., Hase M.E.; Muller L.  
Experimental Cell Research; 245 (1) 43-56; November 1998  
"Molecular segments of protein Tpr that confer nuclear targeting and association with the nuclear pore complex"
- Cordes V.C.; Reidenbach S.; Köhler A.; Struurman N.; van Driel R.; Franke W.W.  
Journal of Cell Biology; 123; 1333-1344; 1993  
"Intranuclear filaments containing a nuclear pore protein"
- Cordes V.C.; Reidenbach S.; Rackwitz H.-R.; Franke W.  
The Journal of Cell Biology; 136 (3); 515-529; Februar 1997  
"Identification of protein p270/Tpr as a constitutive component of the nuclear pore complex - attached intranuclear filaments"
- Cserembly P.; Kahn CR  
Journal of Biological Chemistry; 266; 4943-4950; 1991  
"The 90-kDa heat shock protein (Hsp90) possesses an ATP-binding site and autophosphorylating activity"
- Cserembly P.; Kajtar J.; Hollosi M.; Oikarinen J.; Somogyi J.  
Biochemical and Biophysical Research Communication; 202; 1657-1663; 1994  
"The 90-kDa heat shock protein (Hsp90) induces the condensation of the chromatin structure"
- Csermely P.; Mijata Y.; Schnaider T.; Yahara I.  
Journal of Biological Chemistry; 270; 6381-6388; 1995  
"Autophosphorylation of grp94 (endoplasmic reticulum chaperone)"
- Csermely P.; Mijata Y.; Soti C.; Yahara I.  
Life Science; 61; 411-418; 1997  
"Binding affinity of proteins to Hsp90 correlates with both hydrophobicity and positive charges"
- Cullen B.R.  
Molecular and Cellular Biology; 20; 4181-4187; 2000  
"Nuclear RNA export pathways"

- Czar M.; Lyons R.; Welsh M.; Renoir J.; Pratt W.  
Molecular Endocrinology; 9 (11); 1549-1560; November 1995  
"Evidence that the FK-506-binding immunophilin heat shock protein 56 is required for trafficking of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus"
- Czar MJ; Owens-Grillo JK; Dittmar KD; Hutchison KA; Zacharek AM  
The Journal of Biological Chemistry; 269; 11155-11161; 1994  
"Characterization of the protein-protein interactions determining the heat shock protein (Hsp90-Hsp70-Hsp56) heterocomplex"
- Czar M.J.; Galigniana M.D.; Silverstein A.M.; Pratt W.B.  
Biochemistry; 36; 7776-7785; 1997  
"Geldanamycin, a heat shock protein 90-binding bezoquinon ansamycin inhibits steroid-dependent translocation of the glucocorticoid receptor from the cytoplasm to the nucleus"
- Czar MJ; Welsh MJ; Pratt WB  
European Journal of Cell Biology; 70; 322-330; 1996  
"Immunofluorescence localization of the 90-kDa heat shock protein to cytoskeleton"
- Dabauvalle M.C.; Franke W.W.  
PNAS; 79; 5302-5306; 1982  
"Karyophilic proteins: Polypeptides synthesized in vitro accumulate in the nucleus on microinjection into cytoplasm of amphibian oocytes"
- Dabauvalle M.C.; Schulz B.; Scheer U.; Peters R.  
Experimental Cell Research; 174; 291,296; 1988  
"Inhibition of nuclear accumulation of karyophilic proteins in living cells by microinjection of the lectin wheat germ agglutinin"
- Dahlberg J.E.; Lund E.  
Current Opinion in Cell Biology; 10; 400-408; 1998  
"Functions of the GTPase Ran in RNA export from the nucleus"
- Dalton S.; Whitbread L.  
PNAS; 92; 2514-2518; 1995  
"Cell cycle-regulated nuclear import and export of Cdc47, a protein essential for initiation of DNA replication in budding yeast"
- Daneholt B.  
Cell; 88; 585-588; 1997  
"A look at messenger RNP moving through the nuclear pore"
- Das AK; Cohen PTW; Barford D.  
The EMBO Journal; 17; 1192-1199; 1998  
"The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions"
- Dasso M.  
Trends in Biochemical Science; 18;-96-101; 1993  
"RCC1 in the cell cycle: The regulator of chromosome regulation takes a new role"
- Dasso M.; Pu R.T.  
American Journal of Human Genetics; 63; 311-316; 1998  
"Nuclear structure '98; Nuclear transport: Run by Ran?"
- Davis RJ  
Journal of Biological Chemistry; 268; 14553-14556; 1993  
"The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway"
- DeFranco DB; Madan AP; Tang Y; Chandran UR; Xiao N.; Yang J.  
Vitamins and Hormones; 51; 315-338; 1995  
"Nucleocytoplasmic shuttling of steroid receptors"

- Dechampsme AM; Koroleva O.; Leger-Silvestre I.; Gas N.; Camier S.  
The Journal of Cell Biology; 145 (7); 1369-1380; Juni 1999  
"Assmby of 5S ribosomal RNA is required at a specific step of the pre-RNA processing pathway"
- Dittmar K.D.; Demady D.R.; Stancati L.F.; Krishna P.; Pratt W.B.  
The Journal of Biological Chemistry; 272; 21213-21220; 1997  
"Folding of the glucocorticoid receptor by the heat shock protein (hsp) 90-based chaperone machinery"
- Denis M.  
Molecular Cell Biology; 173; 405-411; 1988  
"Two step purification and N-terminal amino sequence analysis of the rat Mr 90.000 heat shock protein"
- DeRobertis EM; Black P.; Nishikura K.  
Cell; 23; 89-93; 1988  
"Intranuclear localization of rRNA splicing enzymes"
- Dingwall C.; Kandels-Lewis S.; Seraphin B.  
PNAS; 92; 7525-7529; 1995  
"A family of Ran binding proteins that includes nucleoporins"
- Dingwall C.; Robbins J.; Dilworth SM; Roberts B; Richardson WD  
The Journal of Cell Biology; 107; 841-849; 1988  
"The nucleoplasmin nuclear location sequenz is larger and more complex than that of SV40-large T-antigen"
- Dingwall C; Sharnick SV; Laskey RA  
Cell; 30; 449-458; 1982  
"A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus"
- Duverger E.; Roche AC; Monsigny M.  
Glycobiology; 6; 381-386; 1996  
"N-acetylglucosamine-dependent nuclear import of neoglycoproteins"
- Edwards DR  
Trends in Cell Biology; 15; 239-244; 1994  
"Cell signaling and the controll of gene transcription"
- Efthymiadis A.; Dottorini T.; Jans D.A.  
Archives of Biochemistry and Biophysics; 355; 254-261; 1998  
"A novel system to quantitate nuclear-cytoplasmic flux *in vivo*: kinetics of signal-dependent nuclear protein export"
- Efthymiadis A.; Shao H.; Hübner S.; Jans D.A.  
The Journal of Biological Chemistry; 272; 22134-22139; 1997  
"Kinetic characterization of the human retinoblastoma protein bipartite nuclear localization sequence (NLS) *in vivo* and *in vitro*"
- Elela S.A.; Nazar R.N.  
Cancer Letters; 117; 23-28; 1997  
"The ribosomal 5.8S RNA as a target side of p53 protein in cell differentiation and oncogenesis"
- Elfgang C.; Rosorius O.; Hofer L.; Jaksche H.; Hauber J.; Bevec D.  
PNAS; 96; 6229-6234; 1999  
"Evidence for specific nucleocytoplasmic transport pathways used by leucine-rich nuclear export signal"
- Enarson P.; Enarson M.; Bastos R.; Burke B.  
Chromosoma; 107 (4); 228-236; September 1998  
"Amino-terminal sequences that direct nucleoporin Nup153 to the inner surface of the nuclear envelope"

- Engel K.; Kotlyarov A.; Gaestel M.  
The EMBO Journal; 17; 3363-3371; 1998  
"Leptomycin B-sensitive nuclear export of MAPKAP kinase 2 is regulated by phosphorylation"
- Englmeier L; Olivio JC; Mattaj IW  
Current Biology; 9; 30-41; 1999  
"Receptor-mediated substrate translocation through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis"
- Fahrenkrog B.; Hurt E.C.; Aebi U.; Panté N.  
The Journal of Cell Biology; 143; 577-588; 1998  
"Molecular architecture of the yeast nuclear pore complex: Localization of the Nsp1p subcomplexes"
- Favreau C.; Worman HJ; Wozniak RW; Frappier T.; Courvalin JC  
Biochemistry; 35 (24); 8035-8044; Juni 1996  
"Cell cycle-dependent phosphorylation of nucleoporins and nuclear pore membrane protein Gp210"
- Farjot G.; Sergeant A.; Mikaelian I.  
The Journal of Biological Chemistry; 274; 17009-17017; 1999  
"A new nucleoporin-like protein interacts with both HIV-1 Rev nuclear export signal and Crm-1"
- Feldherr C.M.; Akin D.  
The Journal of Cell Science; 110; 3065-3070; 1997  
"The location of the transport gate in the nuclear pore complex"
- Feng W.; Benko A.L.; Lee J.H.; Stanford D.R.; Hopper A.K.  
Journal of Cell Science; 112; 339-347; 1999  
"Antagonistic effects of NES and NLS determine S.Cerevisiae Rna1p subcellular distribution"
- Ferrigno A.C.P.; Henry M.; Kahana J.; Koepf D.; Lee M.; Nguyen L.; Schlenstedt G.; Seedorf M. et al.  
Experimental Cell Research; 229; 212-216; 1996  
"Genetic analysis of macromolecular transport across the nuclear envelope"
- Finlay DR; Forbes DJ  
Cell; 60; 17-29; 1990  
"Reconstitution of biochemically altered nuclear pores: transport can be eliminated and restored"
- Finlay D.R.; Newmeyer D.D.; Price T.M.; Forbes D.J.  
The Journal of Cell Biology; 104; 189-200; 1987  
"Inhibition of in vitro nuclear transport by a lectin that binds to nuclear pores"
- Fischer Utz; Michael W.M.; Lührmann R.; Dreyfuss G.  
Trends in Cell Biology; 6; 290-293; 1996  
"Signal-mediated export pathways of proteins and RNAs"
- Floer M.; Blobel G.  
The Journal of Biological Chemistry; 274; 16279-16286; 1999  
"Putative reaction intermediates in CRM-1-mediated nuclear protein export"
- Floer M.; Blobel G.; Rexach M.  
The Journal of Biological Chemistry; 272; 19538-19546; 1997  
"Disassembly of RanGTP-Karyopherin  $\beta$  complex, an intermediate in nuclear protein import"
- Fontoura B.M.; Blobel G.; Zhong H.  
PNAS; 38; 3208-3213; 2001  
"The nucleoporin Nup98p associates with the intranuclear filamentous protein network of Tpr"
- Fontoura B.M.; Blobel G.; Matunis M.J.  
The Journal of Cell Biology; 144 (6); 1097-1112; März 1999  
"A conserved biogenesis pathway for nucleoporins: proteolytic processing of a 186-kDa precursor generates Nup98 and a novel nucleoporin, Nup96"

- Fricker M.; Hollinshead M.; White N.; Vaux D.  
The Journal of Cell Biology; 136 (3); 531-544; Februar 1997  
"Interphase Nuclei of many mammalian cell types contain deep, dynamic, tubular membrane-bound invaginations of the nuclear envelope"
- Fridel R.A.; Bogerd H.P.; Cullen B.R.  
PNAS; 93; 4421-4424; 1996  
"Nuclear export of late HIV-1 mRNAs occurs via a cellular protein export pathway"
- Frydman J.; Höhfeld J.  
Trends in Biochemical Science; 22; 88-93; 1997  
"Chaperones get in Touch: the Hip-Hop connection"
- Galigniana M.; Hously P.; DeFranco B.D.; Pratt W.B.  
The Journal of Biological Chemistry; 274; 16222-16227; 1999  
"Inhibition of glucocorticoid receptor nucleocytoplasmic shuttling by ocaidaic acid requires intact cytoskeleton"
- Galigniana M.; Radanji C.; Renoir J.M.; Hously P.; Pratt W.B.  
The Journal of Biological Chemistry; 276; 14884-14889; 2001  
"Evidence that the peptidylprolyl isomerase domain of the hsp90-binding immunophilin FKBP52 is involved in both dynein interaction and glucocorticoid receptor movement to the nucleus"
- Galigniana M.; Scruggs J.; Herrington J.; Welsh M.; Carter-Su C.; Hously P.; Pratt W.  
Molecular Endocrinology; 12 (12); 1903-1913; Dezember 1999  
"Heat shock protein 90-dependent (geldanamycin inhibited) movement of the glucocorticoid receptor through the cytoplasm to the nucleus requires intact cytoskeleton"
- Galy V.; Olivo-Marin JC; Scherthan H.; Doye V.; Rascalou N.; Nehrbass U.  
Nature; 403 (6765); 108-112; Januar 2000  
"Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin"
- Gant T.; Goldberg M.W.; Allen T.D.  
Current Opinion in Cell Biology; 10; 409-415; 1998  
"Nuclear envelope and nuclear pore assembly: analysis of assembly intermediates by electron microscopy"
- Gant T.; Wilson K.  
Annual Review of Cell and Developmental Biology; 13 (1); 669-695; 1997  
"Nuclear assembly"
- Garcia-Cardenia G.; Fan R.; Shah V.; Sorrentino R.; Cirino G.; Papapretopoulos A.; Sessa W.C.  
Nature; 392; 821-824; 1998  
"Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90"
- Garnier C.; Barbier P.; Gilli R.; Lopez C.; Peyrot V.; Briand C.  
Biochemical and Biophysical Research Communications; 250; 414-419; 1998  
"Heat-shock protein 90 (Hsp90) binds *in vitro* to tubulin dimer and inhibits microtubule formation"
- Ginistry H.; Sicard H.; Roger B.; Bouvet P.  
Journal of Cell Science; 112 (6); 761-772; März 1999  
"Structure and functions of nucleolin"
- Görlich D.; Dabrowski M.; Bischoff R.F.; Kutay U.; Bork P.; Hartmann E.; Prehn S.; Izaurralde E.  
The Journal of Cell Biology; 138; 65-80; 1997  
"A novel class of RanGTP binding proteins"
- Görlich D.; Kraft R.; Kostka S.; Vogel F.; Hartmann E.; Laskey R.A.; Mattaj I.W.; Izaurraide E.  
Cell; 87; 21-32; 1996  
"Importin provides a link between nuclear protein import and U snRNA export"

- Görlich D.; Kutay U.  
Annual Review of Cell and Developmental Biology; 15; 607-660; 1999  
"Transport between the cell nucleus and the cytoplasm"
- Görlich D.; Mattaj I.W.  
Science; 271; 1513-1518; 1996  
" Nucleocytoplasmic transport"
- Görlich D.; Pante N.; Kutay U.; Aebi U.; Bischoff F.R.  
EMBO Journal; 15; 5584-5594; 1996  
" Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import"
- Görlich D.; Prehn S.; Laskey R.A.; Hartmann E.  
Cell; 79; 767-778; 1994  
"Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import"
- Görner W.; Schüller C.; Ruis H.  
Biological Chemistry; 380; 147-150; 1999  
"Being at the right place at the right time: The role of nuclear transport in dynamic transcriptional regulation in yeast"
- Goldber M.W.; Allen T.D.  
Journal of Molecular Biology; 257; 848-865; 1996  
"The nuclear pore complex and lamina: Three-dimensional structures and interactions determined by field emission in-lens scanning electron microscopy"
- Goldberg M.W.; Solovei I.; Allen T.D.;  
Journal of Structural Biology; 119; 284-294 1997  
"Nuclear pore complex structure in birds"
- Goldfarb D.S.  
Current Biology; 7; R13-R16; 1997  
"Nuclear transport: Proliferating pathways"
- Gordon S.; Bharadwaj S.; Hnatov A.; Ali A.; Ovsenek N.  
Developmental Biology; 181; 47-63; 1997  
"Distinct stress-inducible and developmentally regulated heat shock transcription factors in *Xenopus* oocytes"
- Grankowski N.; Boldyreff B.; Issinger O.  
European Journal of Biochemistry; 198 (1); 25-30; Mai 1991  
"Isolation and characterization of recombinant human casein kinase II subunits alpha and beta from bacteria"
- Greber U.F.; Gerace L.  
Journal of Cell Biology; 128; 5-14; 1995  
" Depletion of calcium from the lumen of endoplasmic reticulum reversibly inhibits passive diffusion and signal-mediated transport into the nucleus"
- Greber U.F.; Senior A.; Gerace L.  
The EMBO Journal; 9; 1495-1502  
" A major glycoprotein of the nuclear pore complex is a membrane-spanning polypeptide with a large luminal domain and a small cytoplasmic tail"
- Grenert J.; Johnson B.; Toft D.  
The Journal of Biological Chemistry; 274 (25); 17525-17533; Juni 1999  
"The importance of ATP binding and hydrolysis by Hsp90 in Formation and function of protein heterocomplexes"
- Grimm C.; Lund E.; Dahlberg J.E.  
PNAS; 94; 10122-10127; 1997  
"Selection and nuclear immobilization of exportable RNAs"

- Gruenbaum Y.; Wilson K.L.; Harel A.; Goldberg M.; Cohen M.  
Journal of Structural Biology; 129; 313-323; 2000  
"Review: Nuclear lamins - structural proteins with fundamental functions"
- Gupta R.; Golding G.  
Trends in Biochemistry Science; 21 (5); 166-171; Mai 1996  
"The origin of the eukaryotic cell"
- Hamm J.; Huber J.; Lührmann R.  
PNAS; 94; 12839-12844; 1997  
"Anti-idiotypic RNA selected with an anti-nuclear export signal antibody is actively transported in oocytes and inhibits Rev and Cap-dependent RNA export"
- Haraguchi T.; Koujin T.; Hajakawa T.; Kaneda T.; Tsutsumi C.; Imamoto N.; Akazawa C.; Yoneda Y.; Hiraoka  
Journal of Cell Science; 113 (5); 779-794; 2000  
"Live fluorescence imaging reveals early recruitment of emerin, LBR, RanBP2, and Nup153 to reforming functional nuclear envelopes"
- Hartmann E.; Görlich D.  
Trends in Cell Biology; 5; 192-193; 1995  
"A Ran-binding motif in nuclear pore proteins"
- Harris M.E.; Gontarek R.R.; Derse D.; Hope T.J.  
Molecular and Cellular Biology; 18; 3889-3899; 1998  
"Differential requirements for alternative splicing and nuclear export function of equine infectious anemia virus rev protein"
- Heikkila J.J.; Ohan N.; Tam Y.; Ali A.  
Cellular and Molecular Life Science; 53; 114-121; 1997  
"Heat shock protein gene expression during *Xenopus* development"
- Helmbrecht K.; Zeise E.; Rensing L.  
Cell Proliferation; 33; 341-365; 2000  
"Chaperones in cell cycle regulation and mitogenic signal transduction: a review"
- Henderson B.R.; Percipalle P.  
Journal of Molecular Biology; 274; 693-707; 1997  
"Interactions between HIV Rev and nuclear import and export factors: The Rev nuclear localization signal mediates specific binding to human importin  $\beta$ "
- Herold A.; Truant R.; Wiegand H.; Cullen B.R.  
The Journal of Cell Biology; 143; 309-318; 1998  
"Determination of the functional domain organization of the importin  $\alpha$  nuclear import factor"
- Hessel-Peck A.; Raikhel N.V.  
Plant Molecular Biology; 38; 145-162; 1998  
"The nuclear pore complex"
- Hinshaw J.E.; Carragher B.O.; Milligan R.A.  
Cell; 69; 1133-1141; 1992  
"Architecture and design of the nuclear pore complex"
- Holaska J.M.; Paschal B.M.  
PNAS; 95; 14739-14744; 1998  
"A cytosolic activity distinct from CRM1 mediates nuclear export of protein kinase inhibitor in permeabilized cells"
- Holt S.E.; Aisner D.L.; Baur J.; Tesmer V.M.; Dy M.; Ouellette M.; Trager J.B.; Morin G.B.; Toft D.O. et al.  
Genes and Development; 13; 817-826; 1999  
"Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes"

- Ho J.H.N.; Johnson A.W.  
Molecular and Cellular Biology; 19; 2389-2399; 1999  
"NMD3 encodes an essential cytoplasmic protein required for stable 60S ribosomal subunits in *Saccharomyces Cerevisiae*"
- Ho J.H.N.; Kallstrom G.; Johnson A.W.  
The Journal of Cell Biology; 151; 1057-1066; 2000  
"Nmd3p is a Crm1-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit"
- Hood J.K.; Silver P.A.  
Current Opinion in Cell Biology; 11; 241-247; 1999  
"In or out? Regulating nuclear transport"
- Hopper A.K.  
Current Biology; 9; R803-R806; 1999  
"Nucleocytoplasmic transport: Inside out regulation"
- Hu J.; Seegers C.  
PNAS; 93; 1060-1064; 1996  
"Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase"
- Hurt E.  
Cell; 84 (4); 509-515; Februar 1996  
"Importins/karyopherins meet nucleoporins"
- Hurt E.; Hannus S.; Schmelzl B.; Lau D.; Tollervey D.; Simos G.  
The Journal of Cell Biology; 144; 389-401; 1999  
"A novel in vivo assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in Ran-cycle and nucleoporin mutants"
- Hurwitz ME; Strambio-de-Castillia C.; Blobel G.  
PNAS; 95 (19); 11241-11245; September 1998  
"Two yeast nuclear pore complex proteins involved in mRNA export form a cytoplasmically oriented subcomplex"
- Imamoto N.; Matsuoka Y.; Kurihara T.; Kohno K.; Mijagi M.; Sakiyama F.; Okada Y.; Tsunasawa S.; Yoneda Y.  
Journal of Cell Biology; 119; 1047-1061; 1992  
"Antibodies against 70-kDa heat shock cognate protein inhibit mediated nuclear import of karyophilic proteins"
- Imamoto N.; Shmamoto T.; Kose S.; Takao T.; Tachibana T.; Matsubae M.; Sekimoto T. et al.  
FEBS Letters; 368; 415-419; 1995  
"The nuclear pore targeting complex binds to nuclear pores after association with a karyophile"
- Itoh H.; Ogura M.; Komatsuda A.; Wakui H.; Miura AB; Tashima Y.  
Biochemical Journal; 343 (3); 697-703; November 1999  
"A novel chaperone-activity-reducing mechanism of the 90-kDa molecular chaperone Hsp90"
- Izaurrealde E.; Jarmolowski A.; Beisel C.; Mattaj I.W.; Dreyfuss G.; Fischer U.  
The Journal of Cell Biology; 137; 27-35; 1997  
"A role for the M9 transport signal of hnRNP A1 in mRNA nuclear export"
- Izaurrealde E.; Kutay U.; von Kobbe C.; Mattaj I.W.; Gorlich D.  
The EMBO Journal; 16; 6535-6547; 1997  
"The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus"
- Jacobsen F.  
Diplomarbeit; Johann Wolfgang Goethe Universität; Frankfurt am Main; 1998  
"Etablierung zweier Methoden zur Exportmessung von 60S ribosomalen Untereinheiten aus dem Zellkern"



- Jacobson M.R.; Pederson T.  
PNAS; 95; 7981-7986; 1998  
"Localization of signal recognition particle RNA in the nucleolus of mammalian cells"
- Jäkel S.; Görlich D.  
The EMBO Journal; 17; 4491-4502; 1998  
"Importin  $\beta$ , transportin, RanBP5, and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells"
- Jakel S.; Albig W.; Kutay U.; Bischoff F.R.; Schwamborn K.; Doenecke D; Görlich D.  
The EMBO Journal; 18 2411-2423; 1999  
"The importin  $\beta$ /importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1"
- Jenkins Y.; McEntee M.; Weis K.; Greene W.C.  
The Journal of Cell Biology; 143; 875-885; 1998  
"Characterization of HIV-1 Vpr nuclear import: Analysis of signals and pathways"
- Jeong JS; Kim IH; Lee HJ; Choi YC  
Experimental Molecular Medicine; 30 (4); 205-213; Dezember 1998  
"Nucleolus contains signal molecules that constitute membrane-nucleolus linked pathway"
- Jibard N.; Meng X.; Leclerc P.; Rajkowski K.; Fortin D.; Schweizer-Groyer; Catelli M; Baulieu E; Cadepond F.  
Experimental Cell Research; 247 (2); 461-474; März 1999  
"Delimitation of two regions in the 90-kDa heat shock protein (Hsp90) able to interact with the glucocorticosteroid receptor (GR)"
- Johnson B.D.; Chadli A.; Felts S.J.; Bouhouche I.; Catelli M.G.; Toft D.O.  
The Journal of Biological Chemistry; 275; 32499-32507; 2000  
"Hsp90 chaperone activity requires the full-length protein and interaction among its multiple domains"
- Johnson B.D.; Schumacher R.J.; Ross E.D.; Toft D.O.  
The Journal of Biological Chemistry; 273; 3679-3686; 1998  
"Hop modulates hsp70/hsp90 interactions in protein folding"
- Jullien D.; Görlich D.; Laemmli U.K.; Adachi Y.  
The EMBO Journal; 18; 4348-4358; 1999  
"Nuclear import of RPA in Xenopus egg extracts requires a novel protein XRIP  $\alpha$  but not Importin  $\alpha$ "
- Kalderon D.; Richardson W.D.; Markham A.F.; Smith A.E.  
Nature; 311; 33-38; 1984  
" Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen"
- Kang K.I.; Bogerd H.P.; Yang J.; Cullen B.R.  
Virology; 262; 200-209; 1999  
"Analysis of the RNA binding specificity of the human Tap protein, a constitutive transport element-specific nuclear RNA export factor"
- Kang K.I.; Cullen B.R.  
Genes and Development; 13; 1126-1139; 1999  
"The human Trp protein is a nuclear mRNA export factor that contains novel RNA-binding and nucleocytoplasmic transport sequences"
- Kang K.I.; Devine J.; Cadepond F.; Jibard N.; Guiochon-Mantel A.; Baulieu E.E.; Catelli M.G.  
PNAS; 91; 340-344; 1994  
"in-vivo functional protein-protein interaction: nuclear targeted Hsp90 shifts cytoplasmic steroid receptor mutants into the nucleus"
- Katahira J.; Straßer K.; Podtelejnikov A.; Mann M.; Jung J.U.; Hurt E.  
The EMBO Journal; 18; 2593-2609; 1999  
"The Mex67p mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human"

- Kehlenbach R.H.; Dickmanns A.; Gerace L.  
The Journal of Cell Biology; 141; 863-874; 1998  
"Nuclearcytoplasmic shuttling factors including Ran and CRM1 mediate nuclear export of NFAT *in vitro*"
- Keminer O.; Siebrasse J.P.; Zerf K.; Peters R.  
PNAS; 96; 11842-11847; 1999  
"Optical recording of single-mediated protein transport through single nuclear pore complexes"
- Khaitovitch P.; Mankin A.S.  
Journal of Molecular Biology; 291; 1025-1034; 1999  
"Effects of antibiotics on large ribosomal subunit assembly reveals possible function of 5S rRNA"
- Khanna-Gupta A; Ware V.C.  
PNAS; 86; 1791-1795; 1989  
"Nucleocytoplasmic transport of ribosomes in an eukaryotic system: Is there a facilitated transport process?"
- Kim J.M.; Cha J.Y.; Marshak D.R.; Bae Y.S.  
Biochemical and Biophysical Research Communications; 226; 180-186; 1996  
"Interaction of the  $\beta$  subunit of the casein kinase II with the ribosomal protein L5"
- Kiseleva E.; Goldberg M.W.; Cronshaw J.; Alle T.D.  
Critical Review of Eukaryotic gene expression; 10; 101-112; 2000  
" The nuclear pore complex: structure, function, and dynamics"
- Kiseleva E.; Goldberg M.W.; Daneholt B.; Alle T.D.;  
Journal of Molecular Biology; 260; 304-311; 1996  
" RNP export is mediated by structural reorganization of the nuclear pore basket"
- Kiseleva E.; Goldberg M.W.; Alle T.D.; Akey C.W.  
Journal of Cell Science; 111, 223-236; 1998  
"Active nuclear pore complexes in *Chironomus*: visualization of transporter configurations related to mRNP export"
- Klebe C.; Prinz H.; Wittinghofer A.; Goody R.S.  
Biochemistry; 34; 12543-12552; 1995  
"The kinetic mechanism of Ran-nucleotide exchange catalysed by RCC1"
- Klemm J.D.; Beals C.R.; Crabtree G.R.  
Current Biology; 7; 638-644; 1997  
"Rapid targeting of nuclear proteins to cytoplasm"
- Köhler M.; Haller H.; Hartmann E.  
Experimental nephrology; 7; 290-294; 1999  
"Nuclear protein transport pathways"
- Köhler M.; Speck C.; Christiansen M.; Bischoff F.R.; Prehn S.; Haller H.; Görlich D.; Hartmann E.  
Molecular and Cellular Biology; 19; 7782-7791; 1999  
"Evidence for distinct substrate specificities of importin  $\alpha$  family members in nuclear protein import"
- Kose S.; Imamoto N.; Tachibana T.; Yoshida M.; Yoneda Y.  
The Journal of Biological Chemistry; 274; 3946-3952; 1999  
" $\beta$  Subunit of nuclear pore targeting complex (importin-  $\beta$ ) can be exported from the nucleus in a Ran independent manner"
- Kosova B.; Panté N.; Rollenhagen C.; Hurt E.  
The Journal of Biological Chemistry; 274; 22646-22651; 1999  
"Nup192p is a conserved nucleoporin with a preferential location at the inner site of the nuclear membrane"

- Kosova B.; Panté N.; Rollenhagen C.; Podtelejnikov A.; Mann M.; Aeberli U.; Hurt E.  
The Journal of Biological Chemistry; 275 (1); 343-350; Januar 2000  
"Mlp2p, a component of nuclear pore attached intranuclear filaments, associates with Nic96p"
- Kraemer D.; Blobel G.  
PNAS; 94 9119-9124; 1997  
"mRNA binding protein mrnp 41 localizes in both nucleus and cytoplasm"
- Kudo N.; Matsumori N.; Taoka H.; Fujiwara D.; Schreiner E.P.; Wolff B.; Yoshida M.; Horinouchi S.  
PNAS; 96; 9112-9117; 1999  
"Leptomycin B inactivates CRM1/Exportin 1 by a covalent modification of a cysteine residue in the central conserved region"
- Kudo N.; Taoka H.; Toda T.; Yoshida M.; Horinouchi S.  
The Journal of Biological Chemistry; 274; 15151-15158; 1999  
"A novel nuclear export signal sensitive to oxidative stress in the fission yeast transcription factor Pap1"
- Kudo N.; Wolff B.; Sekimoto T.; Schreiner E.P.; Yoned Y.; Yanagida M.; Horinouchi S.; Yoshida M.  
Experimental Cell Research; 242; 540-547; 1998  
"Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1"
- Kumagai A.; Dunphy W.G.  
Genes and Development; 13; 1067-1072; 1999  
"Binding of 14-3-3 proteins and nuclear export control the intracellular localization of the mitotic inducer cdc25"
- Kutay U.; Izaurralde E.; Bischoff F.R.; Mattaj J.W.; Gorlich D.  
The EMBO Journal; 16; 1153-1163; 1997  
"Dominant-negative mutants of importin-beta block multiple pathways of import and export through the nuclear pore complex"
- Lange B.M.H.; Bachi A.; Wilm M.; Gonzalez C.  
The EMBO Journal; 19; 1252-1262; 2000  
"Hsp90 is a core centrosomal component and is required at different stages of the centrosome cycle in *Drosophila* and vertebrates"
- Langer T.  
Dissertation; Johann Wolfgang Goethe Universität; Frankfurt am Main; 2000  
"Untersuchungen zur Struktur und Funktion von Hsp90 - Beschleunigung des Kerntransports von 60S ribosomalen Untereinheiten"
- Laskey R.A.; Görlich D.; Madine M.A.; Makkerh J.P.S.; Romanowski P.  
Experimental Cell Research; 229; 204-211; 1996  
"Regulatory roles of nuclear envelope"
- Leclerc P.; Jibard N.; Meng X.; Schweizer-Groyer G.; Fortin D.; Rajkowski K.; Kang K.; Catelli M.G. et al.  
Experimental Cell Research; 242; 255-264; 1998  
"Quantification of the nucleocytoplasmic distribution of wild-type and modified proteins using confocal microscopy: interaction between 90-kDa heat shock protein (Hsp90 $\alpha$ ) and glucocorticoid receptor (GR)"
- Legouis R.; Ayer-Le Lievre C.; Leibovici M.; Lapointe F.; Petit C.  
PNAS; 90 2461-2465; 1993  
"Expression of the KAL gene in multiple neuronal sites during chicken development"
- Lehninger A.L.; Nelson D.L.; Cox M.M.  
Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg; 2. Auflage; 1994  
"Prinzipien der Biochemie"
- Li D.; Meier U.T.; Dobrowolska G.; Krebs E.G.  
The Journal of Biological Chemistry; 272; 3772-3779; 1997  
"Specific interaction between the casein kinase 2 and the nucleolar protein Nopp140"

- Liang P.; MacRae T.H.  
Journal of Cell Science; 110; 1431-1440; 1997  
"Molecular chaperones and cytoskeleton"
- Liang S.H.; Clarke M.F.  
The Journal of Biological Chemistry; 274; 32699-32703; 1999  
"A bipartite nuclear localization signal is required for p53 nuclear import regulated by a carboxyterminal domain"
- Liu J.; DeFranco D.  
Molecular Endocrinology; 13 (3); 355-365; März 1999  
"Chromatin recycling of glucocorticoid receptors: implications for multiple roles of heat shock protein 90"
- Longin A.S.; Mezin P.; Favier A.; Verdetti J.  
Biochemical and Biophysical Research Communications; 235; 236-241; 1997  
"Presence of zinc and calcium permeant channels in the inner membrane of the nuclear envelope"
- Lounsbury K.M.; Richards S.A.; Carey K.L.; Macara I.G.  
The Journal of Biological Chemistry; 271; 32834-32841; 1996  
"Mutations within the Ran/TC4 GTPase"
- Marshall I.C.B.; Wilson K.  
Trends in Cell Biology; 7; 69-74; 1997  
"Nuclear envelope assembly after mitosis"
- Mahajan R.; Delphin C.; Guan T.; Gerace L.; Melchior F.  
Cell; 88; 97-107; 1997  
"A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2"
- Mimnaugh E.G.; Worland P.J.; Whitesell L.; Neckers L.M.  
The Journal of Biological Chemistry; 270; 28654-28659; 1995  
"Possible Role for Serine/Threonine phosphorylation in the regulation of the heteroprotein complex between the Hsp90 stress protein and the pp60<sup>src</sup> tyrosine kinase"
- Marcu M.; Chadli A.; Bouhouche I.; Catelli M.; Neckers L.M.  
The Journal of Biological Chemistry; 275; 37181-37186; 2000  
"The heat shock protein 90 antagonist novobiocin interacts with a previously unrecognized ATP-binding domain in the carboxyl-terminus of the chaperone"
- Marcu M.; Schulte T.W.; Neckers L.M.  
Journal of the National Cancer Institute; 92; 242-248; 2000  
"Novobiocin and related coumarins and depletion of heat shock protein 90-dependent signaling proteins"
- Marelli M.; Aitchison J.D.; Wozniak R.W.  
The Journal of Cell Biology; 143; 1813-1830; 1998  
"Specific binding of the karyopherin Kap121p to a subunit of the nuclear pore complex containing Nup53p, Nup59p and Nup170p"
- Marshallsay C.; Dickmanns A.; Bischoff F.R.; Ponstingl H.; Fanning E.; Lührmann R.  
Nucleic Acid Research; 24; 1829-1836; 1996  
"*In vitro* and *in vivo* evidence that protein and U1 snRNP nuclear import in somatic cells differ in their requirement for GTP-hydrolysis, Ran/TC4, and RCC1"
- Maruya M.; Sameshima M.; Nemoto T.; Yahara I.  
Journal of Molecular Biology; 285; 903-907; 1999  
"Monomer arrangement in Hsp90 dimer as determined by decoration with N- and C-terminal region specific antibodies"

- Mayer M.P.; Bukau B.  
Current Biology; 9; 322-325; 1999  
"Molecular chaperones: The busy life of Hsp90"
- Meier U.T.; Blobel G.  
Cell; 70; 127-138; 1982  
"Nopp 140 shuttles on tracks between nucleolus and cytoplasm"
- Melchior F.; Gerace L.  
Trends in Cell Biology; 8 175-179; 1998  
"Two-way trafficking with Ran"
- Melton D.A.; DeRobertis E.M.; Cortese R.  
Nature; 284; 143-148; 1980  
"Order and intracellular location of the events involved in the maturation of a spliced tRNA"
- Michael WM  
Trend in Cell Biology; 10 (2); 46-50; Februar 2000  
"Nucleocytoplasmic shuttling signals: two for the price of one"
- Miyata Y.; Yahara I.  
The Journal of Biological Chemistry; 267 (10); 7042-7047; April 1992  
"The 90-kDa heat shock protein, HSP90, binds and protects casein kinase II from self-aggregation and enhances its kinase activity"
- Miyata Y.; Yahara I.  
Biochemistry; 34 (25); 8123-8129; Juni 1995  
"Interaction between casein kinase II and the 90-kDa stress protein, HSP90"
- Moore M.S.  
The Journal of Biological Chemistry; 273; 22857-22860; 1998  
"Ran and nuclear transport"
- Moreland R.B.; Nam H.G.; Hereford L.M.; Fried H.M.  
PNAS; 82; 6561-6565; 1985  
"Identification of a nuclear localization signal of a yeast ribosomal protein"
- Moroianu J.  
Journal of Cell Biochemistry; 32-33; 76-83; 1999  
"Nuclear import and export pathways"
- Moroianu L.; Blobel G.; Radu A.  
PNAS; 93; 7059-7062; 1996  
"Nuclear protein import: RanGTP dissociates the karyopherin  $\alpha/\beta$  heterodimer by displacing  $\alpha$  from an overlapping binding site on  $\beta$ "
- Moroianu J.; Blobel G.; Radu A.  
PNAS; 94; 9699-9704; September 1997  
"RanGTP-mediated nuclear export of karyopherin  $\alpha$  involves its interaction with the nucleoporin Nup153"
- Moy T.; Silver P.  
Genes & Development; 13 (16); 2118-2133; August 1999  
"Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the Ran-GTPase cycle and certain nucleoporins"
- Murdoch K.J.; Allison L.A.  
Experimental Cell Research; 227; 332-343; 1996  
"A role of ribosomal protein L5 in the nuclear import of 5S rRNA in *Xenopus* oocytes"

- Nakielny S.; Dreyfuss G.  
Current Opinion in Cell Biology; 9; 420-429; 1997  
"Nuclear export of proteins and RNAs"
- Nakielny S.; Dreyfuss G.  
Current Biology; 8; 89-95; 1997  
"Import and export of the nuclear protein import receptor transportin independent of GTP hydrolysis"
- Nakielny S.; Shaikh S.; Burke B.; Dreyfuss G.  
EMBO Journal; 18 (7); 1982-1995; April 1999  
"Nup153 is an M9-containing mobile nucleoporin with a novel Ran-binding domain"
- Nakielny S.; Siomi M.C.; Siomi H.; Michael W.M.; Pollard V.; Dreyfuss G.  
Experimental Cell Research; 229; 261-266; 1996;  
"Transportin: Nuclear transport receptor of a novel nuclear protein import pathway"
- Nardai G.; Sass B.; Eber J.; Orosz G.; Csermely P.  
Archives of Biochemistry and Biophysics; 384; 59-67; 2000  
"Reactive cysteines in the 90-kDa heat shock protein 90, Hsp90"
- Nachury M.V.; Weis K.  
PNAS; 96; 9622-9627; 1999  
"The direction of transport through the nuclear pore can be inverted"
- Neville M.; Rosbash M.  
The EMBO Journal; 18; 3746-3756; 1999  
"The NES-Crm1p export pathway is not a major mRNA export route in *Saccharomyces Cerevisiae*"
- Neville M.; Stutz F.; Lee L.; Davis L.I.; Rosbash M.  
Current Biology; 7; 767-775; 1997  
"The importin-beta family member CRM1 bridges the interaction between Rev and the nuclear pore complex during nuclear export"
- Nigg E.A.  
Nature; 386; 779-787; 1997  
"Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation"
- Nickerson J.A.  
Journal of Cell Science; 114; 463-474  
"Experimental observations of the nuclear matrix"
- Nishimoto T.  
Biochemical and Biophysical Research Communication; 262; 571-574; 1998  
"A new role of RanGTPase"
- Ohba T.; Nakamura M.; Nishitani H.; Nishimoto T.  
Science; 284; 1356-1358; 1999  
"Self-organization of microtubule asters induced in *Xenopus* egg extracts by GTP-bound Ran"
- Ohno M.; Fornerod M.; Mattaj I.W.  
Cell; 92; 327-336; 1998  
"Nucleocytoplasmic transport: the last 200 nanometers"
- Ohno M.; Segref A.; Bachi A.; Wilm M.; Mattaj I.W.  
Cell; 101; 187-198; 2000  
"PHAX, a mediator of U snRNA export whose activity is regulated by phosphorylation"
- Ohtsubo M.; Kai R.; Furuno N.; Sekiguchi T.; Sekiguchi M.; Hayashida H.; Kuma K.; Mijata T. et al.  
Genes and Development; 1; 585-593; 1987  
"Isolation and characterisation of the active cDNA of the human cell cycle gene (RCC1) involved in the regulation of onset of chromosome condensation"

- Ohtsubo M.; Okazaki H.; Nishimoto T.  
Journal of Cell Biology; 109; 1389-1397; 1989  
"The RCC1 protein, a regulator for the onset of chromosome condensation locates in the nucleus and binds DNA"
- Ossareh-Nazart B.; Dargemont C.  
Experimental Cell Research; 252; 236-241; 1999  
"Domains of CRM1 involved in the formation of the CRM1, RanGTP, and leucine-rich nuclear export sequences trimeric complex"
- Owens-Grillo J.K.; Stancato L.F.; Hoffmann K.; Pratt W.B.; Krishna P.  
Biochemistry; 35; 15249-15255; 1996  
"Binding of immunophilins to the 90-kDa heat shock protein (hsp90) via a tetratricopeptid repeat domain is a conserved protein interaction in plants"
- Paddy MR  
American Journal of Human Genetic; 63 (2); 305-310; August 1998  
"The Tpr protein: linking structure and function in the nuclear interior?"
- Paine P.L.; Moore L.C.; Horowitz S.B.  
Nature; 254; 109-114; 1975  
"Nuclear envelope permeability"
- Palacios I.; Izaurralde E.  
Trends in Cell Biology; 7; 81-83; 1997  
"An immersion in nucleocytoplasmic transport at the garda lake"
- Panté N.; Aebi U.  
Journal of Structural Biology; 113; 179-189; 1994  
" Toward the molecular details of the nuclear pore complex"
- Panté N.; Aebi U.  
Science; 273; 1729-1732; 1996  
" Sequential binding of import ligands to distinct nucleopore regions during their nuclear import"
- Panté N.; Aebi U.  
Critical Review in Biochemical and Molecular Biology; 31; 153-199; 1996  
" Molecular dissection of the nuclear pore complex"
- Pante N.; Bastos R.; McMorrow I.; Burke B.; Aebi U.  
Journal of Cell Biology; 126; 603-617; 1994  
" Interactions and three-dimensional localization of a group of nuclear pore complex proteins"
- Paraskeva E.; Izaurralde E.; Bischoff R.F.; Huber J.; Kutay U.; Hartmann E.; Lührmann R.; Görlich D.  
The Journal of Cell Biology; 145; 255-264; 1999  
" CRM-1 mediated recycling of snurportin-1 to the cytoplasm"
- Parker S.L.; Kane J.K.; Parker M.S.; Berglund M.M.; Lundell I.A.; Li M.D.  
European Journal of Biochemistry; 268; 877-886; 2001  
"Cloned neuropeptide Y (NPY) Y<sub>1</sub> and pancreatic polypeptide Y<sub>4</sub> receptors expressed in chinese hamster ovary cells show considerable agonist-driven internalization, in contrast to the NPY Y<sub>2</sub> receptor"
- Paschal B.M.; Fritze C.; Guan T.; Gerace L.  
The Journal of Biological Chemistry; 272; 21534-21539; 1997  
"High levels of the GTPase Ran/TC4 relieve the requirement for nuclear protein transport factor 2"
- Pasquinelli A.E.; Powers M.A.; Lund E.; Forbes D.; Dahlberg J.E.  
PNAS; 94; 14394-14399; 1997  
"Inhibition of mRNA export in vertebrate cells by nuclear export signal conjugates"

- Pederson T.  
Nucleic Acid Research; 26; 3871-3878; 1998  
"The plurifunctional nucleolus"
- Pederson T.  
Molecular Biology of the Cell; 11 (3); 799-805; März 2000  
"Half a century of the nuclear matrix"
- Pemberton L.F.; Blobel G.; Rosenblum J.S.  
Current Opinion in Cell Biology; 10; 392-399; 1998  
"Transport routes through the nuclear pore complex"
- Pemberton L.F.; Rosenblum J.S.; Blobel G.  
The Journal of Cell Biology; 139; 1645-1653; 1997  
"A distinct and parallel pathway for the nuclear import of an mRNA-binding protein"
- Pemberton L.F.; Rosenblum J.S.; Blobel G.  
The Journal of Cell Biology; 145; 1407-1417; 1999  
"Nuclear import of the TATA-binding protein: mediation by the karyopherin Kap114p and a possible mechanism for intranuclear targeting"
- Percipalle P.; Clarkson W.D.; Kent H.M.; Rhodes D.; Steward M.  
Journal of Molecular Biology; 266; 722-732; 1998  
"Molecular interaction between the importin  $\alpha/\beta$  heterodimer and proteins involved in vertebrate nuclear protein import"
- Perez-Terzic C.; Pyle J.; Jaconi M.; Stehno-Bitel L.; Clapham D.E.  
Science; 273; 1875-1877; 1996  
"Conformational states of the nuclear pore complex induced by depletion of nuclear  $\text{Ca}^{2+}$ -stores"
- Pinol-Roma S.  
Molecular Biology of the Cell; 10; 77-90; 1999  
"Association of nonribosomal nucleolar proteins in ribonucleoprotein complexes during interphase and mitosis"
- Pittman R.H.; Andrews M.T.; Setzer D.R.  
The Journal of Biological Chemistry; 274; 33198-33202; 1999  
"A Feedback loop coupling 5S rRNA synthesis to accumulation of a ribosomal protein"
- Pollard V.W.; Michael W.M.; Nakielny S.; Siomi M.C.; Wang P.; Dreyfuss G.  
Cell; 88; 985-994; 1996  
"A novel receptor mediated nuclear protein import pathway"
- Powers M.A.; Forbes D.J.; Dahlberg J.E.; Lund E.  
The Journal of Cell Biology; 136; 241-250; 1997  
"The vertebrate GLFG nucleoporin, is an essential component of multiple RNA export pathways"
- Pratt W.B.  
Bioessays; 14; 841-848; 1992  
"Control of steroid receptor function and cytoplasmic-nuclear transport by heat shock proteins"
- Pratt W.B.; Toft D.O.  
Endocrine Reviews; 18; 306-360; 1997  
"Steroid receptors interaction with heat shock protein and immunophilin chaperones"
- Prima V.; Depoix C.; Masselot B.; Formstecher P. Lefebvre P.  
Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology; 72 (1-2); 1-12; Januar/Februar 2000  
"Alteration of the glucocorticoid receptor subcellular localization by non steroidal compounds"



- Prodromou C.; Panaretou B.; Chohan S.; Siligardi G.; O'Brien R.; Ladbury J.; Roe M.; Piper P.; Pearl L.  
The EMBO Journal; 19 (16); 4383-4392; 2000  
"The ATPase cycle of Hsp90 drives a molecular 'clamp' via transient dimerization of the N-terminal domain"
- Prodromou C.; Roe S.M.; O'Brien R.; Ladbury J.E.; Piper P.W.; Pearl L.H.  
Cell; 90; 65-75; 1997  
"Identification and structural characterization of the ADP/ATP binding site in the Hsp90 molecular chaperon"
- Prodromou C.; Siligardi G.; O'Brien R.; Woolfson DN; Regan L.; Panaretou B.; Ladbury JE; Piper PW; Pearl L  
EMBO Journal; 18 (3); 754-762; Februar 1999  
"Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain co-chaperones"
- Radu A.; Blobel G.; Moore M.S.  
PNAS; 92; 1769-1773; 1995a  
"Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins"
- Radu A.; Moore M.S.; Blobel G.  
Cell; 81; 215-222; 1995b  
"The peptid repeat domain of nucleoporin Nup98 functions as a docking site in transport across the nuclear pore complex"
- Ramsey A.J.; Russel L.C.; Whitt S.R.; Chinkers M.  
The Journal of Biological Chemistry; 275; 17857-17862; 2000  
"Overlapping sites of tetratricopeptide repeat protein binding and chaperone activity in heat shock protein 90"
- Rappsilber J.; Siniosoglou S.; Hurt EC, Mann M.  
Analytical Chemistry; 72 (2); 267-275; Januar 2000  
"A generic strategy to analyse the spatial organization of multi-protein complexes by cross-linking and mass spectrometry"
- Reddy RK; Kurek I.; Silverstein AM; Chinkers M.; Breiman A.; Krishna P.  
Plant Physiology; 118 (4); 1395-1401; Dezember 1998  
"High molecular-weight FK506-binding proteins are components of heat-shock protein 90 heterocomplexes in wheat germ lysate"
- Rexach M.; Blobel G.  
Cell; 83; 683-692; 1995  
"Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins"
- Richards S.A.; Lounsbury K.M.; Macara I.G.  
The Journal of Biological Chemistry; 270; 14405-14411; 1995  
"The C-terminus of the nuclear Ran/TC4 GTPase stabilizes the GDP-bound state and mediates interactions with RCC1, RanGAP and HTF9/RanBP1"
- Ribbeck K.; Görlich D.  
The EMBO Journal; 20; 1320-1330; 2001  
"Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes"
- Ribbeck K.; Kutay U.; Paraskeva E. Görlich D.  
Current Biology; ); 47-50; 1999  
"The translocation of transportin-cargo complexes through the nuclear pores is dependent on both Ran and energy"
- Ribbeck K.; Lipowsky G.; Kent H.M.; Steward M.; Görlich D.  
The EMBO Journal; 17; 6587-6598; 1998  
"NTF2 mediates nuclear import of Ran"

- Riedel N.; Bachmann M.; Prochnow D.; Richter H.p.; Fasold H.  
PNAS; 84; 3540-3544; 1987  
"Permeability measurements with closed vesicles from rat liver nuclear envelopes"
- Riedel N.; Fasold H.  
Biochemical Journal; 241; 203-212; 1987a  
"Preparation and characterization of nuclear envelope vesicles from rat liver nuclei"
- Riedel N.; Fasold H.  
Biochemical Journal; 241; 213-219; 1987b  
"Nuclear envelope vesicles as a model system to study nucleocytoplasmic transport. Specific uptake of nuclear proteins"
- Ris H.  
Scanning; 19 (5); 368-375; August 1997  
"High-resolution field-emission scanning electron microscopy of nuclear pore complex"
- Robbins J.; Dilworth S.M.; Laskey R.A.; Dingwall C.  
Cell; 64; 615-623; 1991  
"Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence"
- Roe S.M.; Prodromou C.; O'Brien R.; Ladbury J.E.; Piper P.W.; Pearl L.H.  
Journal of Medical Chemistry; 42; 260-266; 1999  
"Structural basis for inhibition of the Hsp90 molecular chaperone by the antitumor antibiotics radicicol and geldanamycin"
- Rosenblum JS; Blobel G.  
PNAS; 96 (20); 11370-11375; September 1999  
"Autoproteolysis in nucleoporin biogenesis"
- Rosenblum JS; Pemberton LF; Bonifaci N.; Blobel G.  
The Journal of Cell Biology; 143 (4); 887-899; November 1998  
"Nuclear import and the evolution of a multifunctional RNA-binding protein"
- Rosmus S.  
Dissertation; Johann Wolfgang Goethe Universität; Frankfurt am Main; 2000  
"Etablierung eines in vivo Meßsystems zur Untersuchung des nukleocytoplasmatischen Transports ribosomaler Untereinheiten - der Einfluss von Hsp90"
- Rosorius O.; Fries B.; Stauber R.H.; Hirschmann N.; Bevec D.; Hauber J.  
The Journal of Biological Chemistry; 275; 12061-12068; 2000  
"Human ribosomal protein L5 contains defined nuclear localization and export signals"
- Rout M.P.; Aitchison J.D.; Suprpto A.; Hjertaas K.; Zhao Y.; Chait B.T.  
The Journal of Cell Biology; 148 (4); 635-652; Februar 2000  
"The yeast nuclear pore complex. Composition, architecture, and transport mechanism"
- Rout M.P.; Blobel G.; Aitchison J.D.  
Cell; 89; 715-725; 1997  
"A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins"
- Rout M.P.; Wente S.R.  
Trends in Cell Biology; 4; 357-365; 1994  
"Pores for Thought: Nuclear pore complex proteins"
- Rutherford S.A.; Goldberg M.W.; Allen T.D.  
Experimental Cell Research; 232; 146-160; 1997  
"The three-dimensional visualization of the route of protein import: The role of nuclear pore complex substructures"

- Rutherford S.A.; Lindquist S.  
Nature; 396; 335-342; 1998  
"Hsp90 as a capacitor for morphological evolution"
- Ruoff J.  
Dissertation; Johann Wolfgang Goethe Universität; Frankfurt am Main; 1998  
"Isolierung und Identifizierung Poly(A)-bindender Proteine aus der Kernhülle von Rattenhepatozyten"
- Ryan K.J.; Wentz S.R.  
Current Opinion in Cell Biology; 12; 361-371; 2000  
"The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm"
- Sabbah M.; Radanyi C.; Redeuilh G.; Baulieu E.E.  
Biochemical Journal; 314; 205-213; 1996  
"The 90-kDa heat shock protein 90 (Hsp90) modulates the binding of the oestrogen receptor to its cognate DNA"
- Sachdev S.; Bagchi S.; Zhang D.D.; Mings A.C.; Hannink M.  
Molecular and Cellular Biology; 20; 1571-1582; 2000  
"Nuclear import of I $\kappa$ B $\alpha$  accomplished by a Ran-independent transport pathway"
- Saphire A.; Guan T.; Schirmer E.; Nemerow G.; Gerace L.  
The Journal of Biological Chemistry; 275 (6); 4298-4304; Februar 2000  
"Nuclear import of adenovirus DNA *in vitro* involves the nuclear protein import pathway and Hsc70"
- Savory J.G.A.; Hsu B.; Laquian I.R.; Giffin W.; Reich T.; Haché R.J.G.; Lefebvre Y.A.  
Molecular and Cellular Biology; 19; 1025-1037; 2000  
"Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor"
- Scheer U.; Hock R.  
Current Opinion in Cell Biology; 11; 385-390; 1999  
"Structure and function of the nucleolus"
- Scheibel T.; Neuhofer S.; Weikel T.; Mayr C.; Reinstein J.; Vogel P.; Buchner J.  
The Journal of Biological Chemistry; 272; 18608-18613; 1997  
"ATP-binding properties of human Hsp90"
- Scheibel T.; Siegmund H.; Jaenicke R.; Ganz P.; Lilie H.; Buchner J.  
PNAS; 96 (4); 1297-1302; Februar 1999  
"The charged region of Hsp90 modulates the function of the N-terminal domain"
- Scheufler C.; Brinker A.; Bourenkov G.; Pegoraro S.; Moroder L.; Bartunik H.; Hartl F.U.; Moarefi I.  
Cell; 101; 199-210; 2000  
"Structure of TPR domain-peptide complexes: critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine"
- Schlatter H.  
Dissertation; Johann Wolfgang Goethe Universität; Frankfurt am Main; 1997  
"Export von ribosomalen Untereinheiten aus wiederversiegelten Kernmembranen: der Effekt von Hsp90"
- Schlenstedt G.; Smirnova E.; Deane R.; Solsbacher J.; Kutay U.; Görlich D.; Ponstingl H.; Bischoff F.R.  
The EMBO Journal; 16; 6237-6249; 1997  
"Yrb4p, a yeast Ran-GTP-binding protein involved in import of ribosomal protein L25 into the nucleus"
- Schmidt-Zachmann M.S.; Dargemont C.; Kuhn L.C.; Nigg E.A.  
Cell; 74; 493-504; 1993  
"Nuclear export of proteins: the role of the nuclear retention"

- Schmitt C.; von Kobbe C.; Bachi A.; Panté N.; Rodrigues J.P.; Boscheron C.; Rigaut G.; Wilm M. et al.  
The EMBO Journal; 18; 4332-4347; 1999  
"Dbp5, a DEAD-box protein required for mRNA export, is recruited to the cytoplasmic fibrils of nuclear pore complex via a conserved interaction with CAN/Nup159p"
- Schulte T.W.; Blagosklonny M.V.; Ingui C.; Neckers L.  
The Journal of Biological Chemistry; 270; 24585-24588; 1995  
"Disruption of the Raf-1-Hsp90 molecular complex results in destabilization of Raf-1 and loss of Raf-1 Ras association"
- Schumacher R.J.; Hansen W.J.; Freeman B.C.; Alnemri E.; Litwack G.; Toft D.O.  
Biochemistry; 35; 14889-14898; 1996  
"Cooperative action of Hsp70, Hsp90, and DnaJ protein in protein renaturation"
- Seedorf M.; Damelin M.; Kahana J.; Taura T.; Silver P.A.  
Molecular Cell Biology; 19; 1547-1557; 1999  
"Interactions between a nuclear transporter and a subset of nuclear pore complex proteins depend on Ran GTPase"
- Seedorf M.; Silver P.A.  
PNAS; 94; 8590-8595; 1997  
"Importin/karyopherin protein family members required for mRNA export from the nucleus"
- Shah S.; Forbes DJ  
Current Biology; 8 (25); 1376-1386; Dezember 1998  
"Separate nuclear import pathways converge on the nucleoporin Nup153 and can be dissected with dominant-negative inhibitors"
- Shah S.; Tugendreich S.; Forbes D.  
The Journal of Cell Biology; 141 (1); 31-49; April 1998  
"Major binding sites for the nuclear import receptor are the internal nucleoporin Nup153 and the adjacent nuclear filament protein Tpr"
- Shulga N.; James P.; Craig E.A.; Goldfarb D.S.  
The Journal of Biological Chemistry; 274; 16501-16507; 1999  
"A nuclear export signal prevents *Saccharomyces Cerevisiae* Hsp70 Ssb1p from stimulating nuclear localization signal-directed nuclear transport"
- Shulga N.; Mosammaparast N.; Wozniak R.; Goldfarb D.S.  
The Journal of Cell Biology; 149; 1027-1038; 2000  
"Yeast nucleoporins involved in passive nuclear envelope permeability"
- Silverstein AM; Grammatikakis N.; Cochran BH; Chinkers M.; Pratt WB  
The Journal of Biological Chemistry; 273 (32); 20090-20095; August 1998  
"p50(cdc37) binds directly to the catalytic domain of Raf as well as to a site on Hsp90 that is topological adjacent to the tetratricopeptide repeat binding site"
- Simos G.; Hurt E.C.  
FEBS Letters; 369; 107-112; 1995  
"Nucleocytoplasmic transport: Factors and mechanism"
- Singh B.B.; Patel H.H.; Roepman R.; Schick D.; Ferreira P.A.  
Journal of Biological Chemistry; 274; 37370-37378; 1999  
"The zinc finger cluster domain of RanBP2 is a specific docking site for the nuclear export factor, exportin-1"
- Siomi M.C.; Eder P.S.; Kataoka N.; Wan L.; Liu Q.; Dreyfuss G.  
The Journal of Cell Biology; 138; 1181-1192; 1997  
"Transportin-mediated nuclear import of heterogeneous nuclear RNP proteins"

- Sleeman JE; Lamond AI  
Current Biology; 9 (19); 1065-1074; Oktober 1999  
"Newly assembled snRNPs associate with coiled bodies before speckles, suggesting a nuclear snRNP maturation pathway"
- Slot J.W.; Geuze H.J.  
European Journal of Cell Biology; 38; 87-93; 1985  
"A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry"
- Soderqvist H, Imreh G, Kihlmark M, Linnman C, Ringertz N, Hallberg E  
European Journal of Biochemistry; 250; 808-813; 1997  
"Intracellular distribution of an integral nuclear pore membrane protein fused to green fluorescent protein--localization of a targeting domain"
- Solsbacher J.; Maurer P.; Bischoff F.R.; Schlenstedt G.  
Molecular and Cellular Biology; 18; 6805-6815; 1998  
"Csp1p is involved in export of yeast importin  $\alpha$  from the nucleus"
- Strahm Y.; Fahrenkrog B.; Zenklusen D.; Rychner L.; Kantor J.; Rosbash M.; Stutz F.  
The EMBO Journal; 18; 5761-5777; 1999  
"The RNA export factor Gle1p is located on the cytoplasmic fibrils of the NPC and physically interacts with the FG-nucleoporin Rip1p, the DEAD-box protein Rat8p/Dbp5p, and a new protein Ymr255p"
- Stage-Zimmermann T.; Schmidt U.; Silver P.A.  
Molecular Biology of the Cell; 11; 3777-3789; 2000  
"Factors affecting nuclear export of the 60S ribosomal subunit *in vivo*"
- Stebbins C.E.; Russo A.A.; Schneider C.; Rosen N.; Hartl F.U.; Pavletich N.P.  
Cell; 89; 239-250; 1997  
"Crystall structure of a Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent"
- Stehno-Bitel L.; Perez-Terzic C.; Clapham D.E.  
Science; 270; 1835-1838; 1995  
"Diffusion across the nuclear envelope inhibited by depletion of the nuclear  $\text{Ca}^{2+}$ -store"
- Strambio-de-Castillia C.; Blobel G.; Rout M.  
The Journal of Cell Biology; 144 (5); 839-855; März 1999  
"Proteins connecting the nuclear pore complex with the nuclear interior"
- Stoffler D.; Fahrenkrog B.; Aebi U.  
Current Opinion in Cell Biology; 11; 391-401; 1999a  
"The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics"
- Stoffler D.; Goldie K.N.; Feja B.; Aebi U.  
Journal of Molecular Biology; 287; 741-752; 1999b  
"Calcium-mediated structural changes of native nuclear pore complexes monitored by time-lapse atomic force microscopy"
- Stommel J.M.; Marchenko N.D.; Jimenez G.S.; Moll U.M.; Hope T.J.; Wahl G.M.  
The EMBO Journal; 18; 1660-1672; 1999  
"A-leucine rich nuclear export signal in the p53 tetramerization domain: regulation of subcellular localization and p53 activity by NES masking"
- Stutz F.; Kantor J.; Zhang D.; McCarthy T.; Neville M.; Rosbash M.  
Genes and Development; 11; 2857-2868; 1997  
"The yeast nucleoporin Rip1p contributes to multiple export pathways with no essential role for its FG-repeat region"
- Stutz F.; Rosbash M.  
Genes and Development; 12; 3303-3319; 1998  
"Nuclear RNA export"

- Sukegawa J.; Blobel G.  
Cell; 72; 29-38; 1993  
"A nuclear pore complex protein that contains zinc finger motifs, binds DNA, and faces the nucleoplasm"
- Suyama M.; Doerks T.; Braun I.C.; Sattler M.; Izaurralde E.; Bork P.  
EMBO Reports; 1; 53-58; 2000  
"Prediction of structural domains of TAP reveals details of its interaction with p15 and nucleoporins"
- Sullivan W.; Stensgard B.; Caucutt G.; Bartha B.; McMahon N.; Alnemri E.S.; Litwack G.; Toft O.D.  
The Journal of Biological Chemistry; 272; 8007-8012; 1997  
"Nucleotides and two functional states of Hsp90"
- Sundeeep S.; Tugendreich S.; Forbes D.  
The Journal of Cell Biology; 141 (1); April 1998  
"Major binding sites for the nuclear import receptor are the internal nucleoporin Nup153 and the adjacent nuclear filament protein Tpr"
- Sweet D.J.; Gerace L.  
Trends in Cell Biology; 5; 444-447; 1995  
"Taking from the cytoplasm and giving to the pore: Soluble transport factors in nuclear protein import"
- Talcott B.; Moore M.S.  
Trends in Cell Biology; 9; 312-318; 1999  
"Getting across the nuclear pore complex"
- Teixeira M.T.; Siniosoglou S.; Podtelejnikov S.; Benichou J.C.; Mann M.; Dujon B.; Hurt E.; Fabre E.  
The EMBO Journal; 16; 5086-5097; 1997  
"Two functionally distinct domains generated by in vivo cleavage of Nup145p: a novel biogenesis pathway for nucleoporins"
- Tiganis T.; Flint A.J.; Adam S.A.; Tonks N.K.  
The Journal of Biological Chemistry; 272; 21548-21557; 1997  
"Association of the T-cell protein tyrosin phosphatase with nuclear import factor p97"
- Titov AA; Blobel G.  
The Journal of Cell Biology; 147 (2); 235-246; Oktober 1999  
"The karyopherin Kap122p/Pdr6p imports both subunits of the transcription factor IIA into the nucleus"
- Truant R.; Kang Y.; Cullen B.R.  
The Journal of Biological Chemistry; 274; 32167-32171; 1999  
"The human Tap nuclear RNA export factor contains a novel transportin-dependent nuclear localization signal that lacks nuclear export signal function"
- Tseng S.I.S.; Weaver P.L.; Liu Y.; Hitomi M.; Tartakoff A.M.; Chang T.H.  
The EMBO Journal; 17; 2651-2662; 1998  
"Dbp5p, a cytosolic RNA helicase, is required for poly(A)+ RNA export"
- Turpin P.; Hay R.T.; Dargemont C.  
The Journal of Biological Chemistry; 274; 6804-6812; 1998  
"Characterization of IκBα nuclear import pathway"
- Tyagi R.K.; Amazit L.; Lescop P.; Milgrom E.; Guiochon-Mantel A.  
Molecular Endocrinology; 12; 1684-1695; 1998  
"Mechanisms of progesterone receptor export from nuclei: Role of nuclear localization signal, nuclear export signal, and Ran Guanosine triphosphate"
- Ullman K.; Sundeeep S.; Powers M.; Forbes D.  
Molecular Biology of the Cell; 10 (3); 649-664; März 1999  
"The Nucleoporin Nup153 Plays a Critical Role in Multiple Types of Nuclear Export"

- van Beekvelt C.A.; Kooi; E.A.; de Graaf-Vincent M.; van't Riet J.; Venema J.; Raue H.A.  
Journal of Molecular Biology; 295; 7-17; 2000  
"Domain III of *Saccharomyces Cerevisiae* 25S ribosomal RNA: Its role in binding of ribosomal Protein L25 and 60S subunit formation"
- Vancurova I.; Vancura A.; Lou W.; Paine P.L.  
Biochemical and Biophysical Research Communication; 235; 19-25; 1997  
"A domain distinct from nucleoplasm's nuclear localization sequence influences its transport"
- Van der Spuy J.; Kana B.D.; Dirr H.W.; Blatch D.W.  
Biochemical Journal; 345; 645-651; 2000  
"Heat shock cognate protein 70 chaperone-binding is the co-chaperone murine stress-inducible protein 1 maps within three consecutive tetratricopeptid repeat motifs"
- Vetter I.R.; Nowak C.; Nishimoto T.; Kuhlmann J.; Wittinghofer A.  
Nature; 398; 39-46; 1999  
"Structure of a Ran-binding domain complexed with Ran bound to a GTP analogue: implications of nuclear transport"
- Wada A.; Fukuda M.; Mishima M.; Nishida E.  
The EMBO Journal; 17; 1635-1641; 1998  
"Nuclear export of actin: A novel mechanism regulating the subcellular localization of a major cytoskeletal protein"
- Warner J.R.  
Trends in Biochemical Science; 24; 437-440; 1999  
"The economics of ribosome biosynthesis in yeast"
- Watkins J.I.; Murphy R.; Emtage J.L.T.; Wente S.R.  
PNAS; 95; 6779-6784; 1998  
"The human homologue of *Saccharomyces Cerevisiae* Gle1p is required for Poly(A)<sup>+</sup> RNA export"
- Weaver A.J.; Sullivan W.P.; Felts S.J.; Owen B.A.L.; Toft D.O.  
The Journal of Biological Chemistry; 275; 23045-23052; 2000  
"Crystal-structure and activity of human p23, a heat shock protein 90 Co-chaperone"
- Weikl T.; Abelmann K.; Buchner J.  
Journal of Molecular Biology; 293 (3); 685-691; Oktober 1999  
"An unstructured C-terminal region of the Hsp90 cochaperone p23 is important for its chaperone function"
- Weikl T.; Muschler P.; Richter K.; Veit T.; Reinstein J.; Buchner J.  
Journal of Molecular Biology; 303; 583-592; 2000  
"C-Terminal regions of Hsp90 are important for trapping nucleotide during the ATPase-cycle"
- Weis K.  
Trends in Biochemical Science; 23; 185-189; 1998  
"Importins and exportins: how to get in and out of the nucleus"
- Wen W.; Meinkoth J.L.; Tsien R.Y.; Taylor S.S.  
Cell; 82; 463-473; 1995  
"Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus"
- Wiech H.; Buchner J.; Zimmermann M.; Zimmermann R.; Jakob U.  
Nature; 358; 169-170; 1992  
"Hsp90 chaperones protein folding *in vitro*"
- Wilson K.  
Trends in Cell Biology; 10 125-129; 2000  
"The nuclear envelope, muscular dystrophy and gene expression"

- Wojda I.; Cytrynska M.; Frajnt M.; Jakubowicz T.  
Acta Biochimica Polandia; 46 (1); 211-215; 1999  
"Phosphorylation of yeast ribosomal proteins by CKI and CKII in the presence of heparin"
- Wood P.N.  
Journal of Theoretical Biology; 185; 97-118; 1997  
"A Functional model of the ribosome"
- Wool I.G.  
Trends in Biochemical Science; 21; 164-165; 1996  
"Extraribosomal function of ribosomal proteins"
- Wozniak R.W.; Rout M.P.; Aitchison J.D.  
Trends in Cell Biology; 8; 184-188; 1998  
"Karyopherins and kissing cousins"
- Wu J.; Matunis M.J.; Kraemer D.; Blobel G.; Coutavas E.  
The Journal of Biological Chemistry; 9;270:14209-13;1995  
"Nup358, a cytoplasmically exposed nucleoporin with peptide repeats, Ran-GTP binding sites, zinc fingers, a cyclophilin A homologous domain, and a leucine-rich region"
- Yahara I.  
Genes to Cell; 4; 375-379; 1999  
"The role of Hsp90 in evolution"
- Yang J.; Bardes E.S.G.; Moore J.D.; Brennan J.; Powers M.A.; Kornbluth S.  
Genes and Development; 12; 2131-2143; 1998  
"Control of cyclin B1 localization through regulated binding of the nuclear export factor CRM1"
- Yang J.; Liu J.; DeFranco D.B.  
The Journal of Cell Biology; 137; 524-539; 1997  
"Subnuclear trafficking of glucocorticoid receptors in vitro: chromatin recycling and nuclear export"
- Yaseen NR; Blobel G  
PNAS; 96 (10); 5516-5521; Mai 1999  
"Two distinct classes of Ran-binding sites on the nucleoporin Nup358"
- Yaseen NR; Blobel G.  
The Journal of Biological Chemistry; 274 (37); 26493-26502; September 1999  
"GTP hydrolysis links initiation and termination of nuclear import of the nucleoporin Nup358"
- Yokoya F.; Imamoto N.; Tachibana T.; Yoneda Y.  
Molecular Biology of the Cell; 10; 1119-1131; 1999  
"β-catenin can be transported into the nucleus in a Ran-unassisted manner"
- Yokoyama .; Hayashi .; Seki N.; Pante N.; Ohba T.; Nishii K.; Kuma K.; Hayashida T.; Miyata T.; Aebi U. et al.  
Nature 376; 184-188; 1995  
"A giant nucleopore protein that binds Ran/TC4"
- Yonehara M.; Minami Y.; Kawata Y.; Nagai J.; Yahara I.  
The Journal of Biological Chemistry; 271; 2641-2645; 1996  
"Heat-induced chaperone activity of Hsp90"
- Young J.C.; Hartl F.U.  
The EMBO Journal; 19; 5930-5940; 2000  
"Polypeptide release by Hsp90 involves ATP hydrolysis and is enhanced by the co-chaperone p23"
- Young J.C.; Obermann W.M.J.; Hartl F.U.  
The Journal of Biological Chemistry; 273; 18007-18010; 1998  
"Specific binding of tetratricopeptide repeat proteins to the C-terminal 12-kDa domain of hsp90"



---

Zasloff M.

PNAS; 80; 6436-6440; 1983

"tRNA transport from the nucleus in an eukaryotic cell: Carrier-mediated translocation process

Zhang H.; Grishin NV

Protein Science; 8; 1658-1667; 1999

"The alpha-subunit of protein prenyltransferases is a member of the tetratricopeptide repeat family"

Zhao Y.G; Gilmore R.; Leone G.; Coffey M.C.; Weber B.; Lee W.K.

The Journal of Biological Chemistry; Manuscript 105562200; July 2001

"Hsp90 phosphorylation is linked to its chaperoning function: assembly of the reovirus cell attachment protein"

Zolotukhin AS; Felber BK

Journal of Virology; 73; 120-127; 1999

"Nucleoporins Nup98 and Nup214 participate in nuclear export of human immunodeficiency virus type 1 Rev"

## Danksagungen

---

Die Liste derer, denen man an dieser Stelle seine Dankbarkeit bekunden möchte ist natürlicherweise schrecklich lang und erfüllt dennoch nur selten den Anspruch auf Vollständigkeit, dafür im vorhinein schon mal meine Entschuldigung.

Vor allen anderen muss natürlich der geistige Vater des Ganzen herausgehoben werden. Als letzter Doktorand einer langen Ära durfte auch ich mich glücklich schätzen von Prof. Dr. Dr. H. Fasold betreut und unterstützt zu werden. Nicht nur indem er mich mit einem interessanten Thema betraute, sondern durch seinen stets ungebremsten Optimismus, was das Resultat der Arbeit anging, verstand er es stets einen von der Richtigkeit des eigenen Tuns zu überzeugen.

An zweiter Stelle stehen da natürlich diejenigen, die im Hinblick auf diese Arbeit unmittelbar von mir betroffen waren. Da sind natürlich alle Institutsangehörige zu nennen, mit denen ich in diesen knapp drei Jahren gemeinsam arbeiten durfte, Diskussionen über Sinn und Unsinn des Daseins (mit der daraus resultierenden Erkenntnissen, dass man nicht mit jedem über alles diskutieren kann und dass manch einen ein Topftreffer wesentlich mehr beglückt als alles andere auf dieser Welt) und natürlich die vielen Gelegenheiten, bei denen man Geburtstage, Disputationen oder einfach nur sich selbst feierte. Dank an: Susann, Eva, Bine, Silke, Gudrun, Christa, Iris, Marlies, Thomas, Achim, Jürgen, Roger, Thorsten, Gerhard und Hans.

Ganz besonders hilfreich waren aber auch die Vertreter des Nachbararbeitskreises von Prof. Dr. B. Ludwig, die zum einen dazu beitrugen, dass jede Pharmaparty zu etwas besonderem wurde, einen vom rein passiven wieder in einen aktiven Fußballer verwandelten und viele Male als Gesprächspartner für einen sterbenden Arbeitskreis erhielten. Dank hier an: Anna, Vicky, Juuuule (oder kurz Ute), Olli, Ole, Thomas, Klaus und Werner.

Des weiteren gibt es einige Stellen ohne die diese Arbeit noch ärmer an Resultaten wäre. Nennen möchte ich hier den Arbeitskreis von PD. Dr. Schmalzing, der mich stets mit frischen Oocyten für die in vivo Messungen versorgte. Dank hier besonders auch an Mark Lohmann, der auch schon im Studium über einen langen Zeitraum hinweg ein wichtiger Begleiter war. Einen besonderen Dank möchte ich der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. U. Aebi aussprechen, welche mir die EM-Aufnahmen ermöglichte. Ein Dankeschön an Birthe Fahrenkrog und im Besonderen an Ursula Sauder für die hervorragende Betreuung, Unterbringung und natürlich Arbeit.

Neben den Menschen, welche mir unmittelbar über die Arbeit nahe standen, gab es natürlich viele, denen mein persönliches Befinden näher lag, als mache Absurdität mit der man tagsüber im Labor gequält wurde.

Daher, Dank allen Freunden und Bbr.Bbr. die mich bei Zeiten abzulenken verstanden, dennoch stets ein offenes Ohr für alle Probleme hatten, und mit denen man sich auf allerlei Festen wiedertraf, ganz egal wo diese stattfanden. Stellvertretend für alle möchte ich an dieser Stelle Martin hervorheben, auf den das vorherige auf besondere Weise zutrifft.

Einen herausragenden Platz nimmt an dieser Stelle jedoch immer noch die eigene Familie ein, die einem persönlich immer den größten Halt geben konnte und immer für einen da war.

Hierzu zählen die "Kölner" Ingeborg und Walter, die alles stets mit großem Interesse verfolgten und mich immer, manchmal auch ungefragt, unterstützten.

Zur Familie darf ich seit einiger Zeit auch eine Niederlassung am linken Niederrhein zählen, Marlies, Birgit und Henn standen uns, wo sie nur konnten, mit Rat und Tat zur Seite und taten alles um uns das Leben zu erleichtern.

Natürlich gilt meiner Mutter Jutta und meiner Schwester Birgit ein besonderer Dank, da sie entscheidenden Anteil an allem haben, was mich betrifft und somit auch an dieser Arbeit.

Abschließend gilt mein Dank allerdings Kirsten, da sie am stärksten von allen betroffen war und als mein Lebensmittelpunkt auch die größte Gravitation aufwenden musste, um mich auf der Bahn zu halten.

Lebenslauf von

Frank Jacobsen

geboren am 19.11.1970 in Wesel am Niederrhein

derzeit wohnhaft in der

**Hedderner Landstraße 15, 60439 Frankfurt am Main**

und erreichbar unter

Telefon: 069 / 99993047

mobil: 0179 / 2027104

E-Mail: [frank\\_jacobsen@gmx.de](mailto:frank_jacobsen@gmx.de)

**Schulbildung**

Konrad-Duden Gymnasium in Wesel (Nordrhein-Westfalen)

**Erlangung der Allgemeinen Hochschulreife 1990**

**Wehrdienst**

1990-92 als Soldat auf Zeit mit Ausbildung zum Reserveoffizier

**Studium**

**Immatrikulation im Wintersemester 1992/93**

an der Johann-Wolfgang Goethe Universität Frankfurt am Main

im Fachbereich Biologie mit Ziel Diplombiologe

**Vordiplom im Sommersemester 1994**

Wechsel in den Fachbereich Biochemie mit Ziel Diplombiochemiker

Zwischenprüfung im Fach Biochemie im Wintersemester 1994/95

**Diplom im Juli 1998**

Thema der Arbeit: „Etablierung zweier Meßsysteme für den

Transport von Ribosomen aus dem Zellkern.“

Promotionsbeginn im August 1998

Thema der Arbeit: „ Partnerproteine von Heat Shock Protein 90 in der Kernmembran“

voraussichtlicher Abschluß der Arbeit im August 2001

Frankfurt am Main, den 1. Februar 2002

