

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von
Diplom-Biologin Denise Mirjam Lau
aus Heilbronn

Tag der mündlichen Prüfung:

Thema
Genetische und biochemische Charakterisierung
von Nup192p –
ein essentielles zentrales Nukleoporin
des Kernporenkomplexes

Gutachter: Prof. Dr. Eduard C. Hurt
Prof. Dr. Christine Clayton

Danksagung

Herrn Professor Ed Hurt danke ich für die Bereitstellung Themas, für die ausgezeichneten Arbeitsmöglichkeiten in seiner Gruppe und für seine Anregungen und Ratschläge. Frau Professor Christine Clayton möchte ich für die Übernahme des Koreferats danken. Daniela Strauß und Karin Bologna danke ich für die Bereitstellung mehrerer TAP-markierter Hefestämme. Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Hurt bin ich für das gute Arbeitsklima und für ihre Hilfsbereitschaft dankbar. Mein besonderer Dank gilt Katja Sträßer, Thomas Gerstberger und Jochen Baßler für ihre Hilfe bei meiner Arbeit. Meiner Familie danke ich für ihre Geduld und ihre Unterstützung.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	6
1. Einleitung	7
1.1. Nukleozytoplasmatischer Transport.....	8
1.1.1. <i>Der RanGTPase Zyklus</i>	8
1.1.2. <i>Die Karyopherin-Familie und ihre Funktion</i>	9
1.1.3. <i>Energetik des nukleozytoplasmatischen Transportes</i>	12
1.1.4. <i>Export von ribosomalen Untereinheiten</i>	13
1.1.5. <i>Export von tRNA</i>	14
1.1.6. <i>Export von mRNA</i>	15
1.2. Struktureller Aufbau des Kernporenkomplexes (NPC)	16
1.3. Biogenese des Kernporenkomplexes	19
1.4. Nukleoporine.....	23
1.5. Lokalisierung der Nukleoporine im Kernporenkomplex	27
1.6. Translokation durch den Kernporenkomplex.....	28
2. Nup192p - Das größte bekannte essentielle Hefe-Nukleoporin	32
3. Ziel der Arbeit	35
4. Ergebnisse	36
4.1. Nup192p ist weder am aktiven Transport noch an der Diffusion durch den NPC beteiligt.....	36
4.1.1. <i>Die nup192-15-Mutante zeigt einen normalen nukleozytoplasmatischen Transport</i>	36
4.1.2. <i>Die passive Diffusion durch den NPC ist in nup192-15-Mutanten normal</i>	38
4.2. Lokalisierung von Nukleoporin-Reporterproteinen in <i>nup192-15</i> -Mutanten.....	41
4.3. Suche nach genetischen Interaktionspartnern von Nup192p im NPC	44
4.3.1. <i>Die Bedeutung der synthetischen Letalität</i>	45
4.3.2. <i>Genetische Interaktionen zwischen NUP192 und anderen Nukleoporin-Genen</i> ...	46
4.4. Biochemische Isolierung von Nup192p aus <i>S. cerevisiae</i>	62
4.4.1. <i>Nup192p kann für weitere biochemische Studien aus Hefe isoliert werden</i>	63
4.4.2. <i>Nup192p – ein Multimer ?</i>	64
4.5. Biochemische Bestätigung genetischer Interaktionen	65
5. Diskussion	73
5.1. Die biochemischen Eigenschaften von Nup192p	75

5.2. Die direkten Nachbarn von Nup192p im Kernporenkomplex sind der Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Nic96p-Komplex und Nup188p.....	76
5.3. Nup192p interagiert genetisch und funktionell mit dem Nup84p-Komplex	77
5.4. Lokalisierung von Nup192p im Kernporenkomplex	78
6. Ausblick	80
7. Material und Methoden	81
7.1. Verwendete Plasmide.....	81
7.2. Hefestämme	82
7.3. Herstellung des <i>nsp1::KAN nup192::HIS3</i> -Doppeldeletionsstamms	83
7.4. Herstellung der <i>nup192-15 – nupx</i> Doppelmutanten	84
7.5. Wachstumsanalyse von Hefezellen (Dotspot-Analyse).....	85
7.6. Integration des HA-Epitops ins Hefegenom	85
7.7. Herstellung eines Hefezellenextraktes	86
7.8. Methoden und Medien für <i>S. cerevisiae</i>	86
7.9. Lokalisierung von GFP-Reporterproteinen.....	87
7.10. Affinitätsaufreinigung von Nup192p-TEV-ProteinA	87
7.11. Affinitätsaufreinigung von NUPX-TAP	88
7.12. Gelfiltration von Nup192p-TEV-Eluat	90
7.13. TCA-Fällung von Proteinen.....	90
7.14. Molekularbiologische Methoden	91
7.15. Allgemeine Arbeiten mit <i>E. coli</i>	91
8. Literaturverzeichnis	92
9. Abkürzungsverzeichnis	111

Zusammenfassung

In der eukaryotischen Zelle erfordert die räumliche Trennung von Transkription und Translation durch die Kernmembran einen regulierten Molekülaustausch zwischen Zellkern und Zytoplasma. Die einzige Verbindung zwischen diesen beiden Kompartimenten stellen die in der Kernhülle liegenden Kernporenkomplexe (NPC) dar. In der Hefe *S. cerevisiae* sind vermutlich alle am Aufbau des NPCs beteiligten Nukleoporine identifiziert, aber nur teilweise in ihrer Struktur und Funktion charakterisiert. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit Nup192p, das nicht nur eines der größten, sondern auch eines der wenigen essentiellen Nukleoporine der Hefe *S. cerevisiae* ist. Um mehr über Funktion, Lage und Struktur von Nup192p im Kernporenkomplex zu erfahren, wurden genetische und biochemische Analysen durchgeführt. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass Nup192p auf genetischer Ebene spezifisch mit dem essentiellen Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Nic96p-Komplex, dem essentiellen Nup84p-Komplex sowie mit Nup188p interagiert. Die genetischen Interaktionen zwischen Nup192p und Nup188p bzw. zwischen Nup192p und dem Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Nic96p wurden auf biochemischer Ebene bestätigt. Mittels Affinitätschromatographie der einzelnen Nukleoporine konnte eine direkte Interaktion zwischen Nup192p und Nup188p bzw. Nup192p und dem Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Nic96p-Komplex nachgewiesen werden. Zwar kann Nup192p biochemisch auch an Nup84p, Nup85p, Nup120p und Nup133p binden, aber diese Interaktionen sind nicht so deutlich wie die Bindung von Nup192p an Nup188p, Nsp1p, Nic96p oder Nup49p. Dies könnte bedeuten, dass die beobachteten genetische Interaktionen zwischen Nup192p und vier der sieben Mitglieder des Nup84p-Komplex auf eine aufeinanderfolgende oder überlappende Funktion in der Kernporenkomplex-Biogenese zurückgeführt werden kann.

Die Ergebnisse unterstützen das Modell, dass Nup192p im Kernporenkomplex einen zentralen und essentiellen strukturellen Bestandteil der Speichen-Ring-Struktur darstellt: dabei könnte Nup192p den Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Komplex, einen Bestandteil des zentralen Transportkanals, über Nic96p und Nup188p mit in der Kernmembran lokalisierten Kernporenproteinen, z.B. Pom152p verbinden. Nup192p könnte in dieser Umgebung als Teil des zentralen Speichen-Ring-Komplexes eine stabilisierende Funktion besitzen. Während der NPC-Biogenese könnte Nup192p außerdem als ein Gerüst fungieren und das Einfügen der mit Nup192p interagierenden Nukleoporine in den entstehenden Kernporenkomplex am richtigen Ort ermöglichen oder erleichtern.

1. Einleitung

Das Hauptmerkmal eukaryontischer Zellen ist der das genetische Material umschließende Nukleus. Dies bedeutet, dass die im Zellkern stattfindende DNA-Replikation und die RNA-Biogenese von der zytoplasmatischen Proteinsynthese-Maschinerie räumlich getrennt sind. Deshalb müssen alle im Zytoplasma benötigten RNAs von ihrem Transkriptionsort im Kern zu ihrem Zielort transportiert werden, während Kernproteine vom Zytoplasma zu ihrem Funktionsort in den Zellkern importiert werden.

Der Nukleus ist durch eine Doppelmembran vom Zytoplasma abgegrenzt. Die äußere, mit Ribosomen besetzte Kernmembran geht ins Endoplasmatische Retikulum (ER) über. Die Kernhülle ist von zahlreichen Kernporen durchbrochen. In den Kernporen verbinden sich die Lipidschichten der äußeren und inneren Kernmembran.

Die Kommunikation zwischen Zytoplasma und Zellkern erfolgt durch in der Kernhülle verankerte Multiproteinkomplexe, sogenannte Kernporenkomplexe (NPCs). Diese bilden einen hydrophoben Transportkanal für den aktiven Transport und hydrophile Kanäle, durch die kleine Moleküle passiv diffundieren können. Die Passage größerer Moleküle, z.B. der meisten Proteine und RNAs, durch den Transportkanal der Kernporenkomplexe ist nur möglich, wenn die zu transportierenden Substrate spezifische Kernlokalisierungs- oder Kernexportsequenzen tragen. Den makromolekularen Transport zwischen Zellkern und Zytoplasma vermitteln lösliche, durch die Kernporenkomplexe pendelnde Transportrezeptoren. Das gesamte Kerntransportsystem besteht aus mehr als 30 Nukleoporinen, dem RanGTPase System, zahlreichen Kerntransportrezeptoren und der Kernhülle.

1.1. Nukleozytoplasmatischer Transport

Der Kernporenkomplex ermöglicht den Transport von Molekülen bis zu einem Durchmesser von 25 nm (Feldherr *et al.*, 1984). Ionen, Metabolite, kleine Moleküle, und Makromoleküle mit einem Molekulargewicht bis zu 60 kDa können passiv durch die 9 nm großen Diffusionskanäle des Kernporenkomplexes diffundieren. Die meisten Proteine, auch solche unter 60 kDa, wie z.B. die Histone, werden an Transportrezeptoren gebunden und aktiv unter Energieverbrauch in ihr Zielkompartiment transportiert. Dasselbe gilt für alle bisher bekannten transportierten RNAs, wie z.B. tRNAs, mRNAs und UsnRNPs, sowie die ribosomalen Untereinheiten.

1.1.1. Der RanGTPase Zyklus

Ein wichtiger Effektor vieler aktiver Transportprozesse ist die kleine GTPase Ran, Gsp1p in der Hefe *S. cerevisiae*, ein Mitglied der Superfamilie Ras-ähnlicher GTPasen. Ran ist die einzige Ras-ähnliche GTPase mit einer überwiegend nukleären Lokalisierung (Bischoff und Ponstingl, 1991; Lau *et al.*, 2000). Es existiert wie die anderen Mitglieder dieser Familie in zwei Formen, als RanGTP und als RanGDP (Belhumeur *et al.*, 1993; Moore und Blobel, 1993; Azumo und Dasso, 2000). Ran ist im von Transportrezeptoren der Karyopherin-Familie vermittelten nukleozytoplasmatischen Transport, an der Ausbildung von Exportkomplexen und an der Auflösung von Importkomplexen, beteiligt (siehe: Azuma und Dasso, 2000; Dasso, 2001; Vasu und Forbes, 2001). Gebunden in Exportkomplexen oder zusammen mit Importrezeptoren verlässt Ran den Zellkern. Damit es nicht im Zytoplasma akkumuliert, wird Ran durch Ntf2p wieder in den Kern importiert (Ribbeck *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 1998).

Ran besitzt, wie viele Mitglieder der Ras-GTPasen-Superfamilie, eine geringe intrinsische GTP-Hydrolyse- und Nukleotidaustauschaktivität. Die GTP-Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP wird durch das zytoplasmatische, teilweise an den zytoplasmatischen Filamenten der Kernporen lokalisierte, GTPase-aktivierende Protein RanGAP (Rna1p in *S. cerevisiae*) katalysiert und durch Ran-bindende Proteine, wie RanBP1 (Yrb1p in *S. cerevisiae*), verstärkt. Die Umwandlung von RanGDP zu RanGTP wird durch den ausschließlich im Zellkern lokalisierten Guaninaustauschfaktor RanGEF

(RCC1 bzw. Prp20p in *S. cerevisiae*) katalysiert (siehe: Azuma und Dasso, 2000; Dasso, 2001; Vasu und Forbes, 2001). Die unterschiedliche Lokalisierung der Ran-Effektoren führt dazu, dass Ran im Zellkern vorwiegend in der GTP-Form vorliegt, während es im Zytoplasma hauptsächlich in der GDP-Form zu finden ist. Es wird diskutiert, dass dadurch zwischen Zellkern und Zytoplasma ein RanGTP/RanGDP-Gradient ausgebildet wird, der die Transportrichtung festlegt (siehe: Dasso, 2001; Vasu und Forbes, 2001). Für dieses Modell spricht, dass eine Umkehrung dieses Gradienten *in vitro* zu einer teilweisen Umkehrung der Transportrichtung führt (Nachury und Weis, 1999). Demnach könnte RanGTP in Interphasezellen ein molekularer Marker zur Unterscheidung zwischen Nukleoplasma und Zytoplasma darstellen. Da aber die lokalen RanGTP- und RanGDP-Konzentrationen schwer zu bestimmen sind, ist es schwierig, dieses Modell zu beweisen (Clarke und Zhang, 2001).

Einige Faktoren des RanGTPase Systems sowie einige Transportrezeptoren sind, vermutlich unabhängig von ihrer Rolle im nukleozytoplasmatischen Transport, an der Mikrotubuli- und Spindelorganisation sowie am Aufbau der Kernhülle beteiligt (siehe: Clarke und Zhang, 2001; Dasso, 2001; Vasu und Forbes, 2001). Da Ran nicht das Hauptthema der vorliegenden Arbeit ist, wird auf diese Funktionen von Ran hier nicht weiter eingegangen.

1.1.2. Die Karyopherin-Familie und ihre Funktion

Die Mitglieder der Karyopherin-Familie sind Transportrezeptoren, die den Transport der meisten zwischen Nukleus und Zytoplasma ausgetauschten Substrate, mit Ausnahme einiger mRNAs von Vertebraten, vermitteln (Adam *et al.*, 1999; Görlich und Kutay, 1999, Ohno *et al.*, 1998). Je nach Transportrichtung wird dabei zwischen Importinen und Exportinen unterschieden. In der Hefe *S. cerevisiae* sind 14 Karyopherine bekannt (Tabelle I), während *H. sapiens* mindestens 22 besitzt (Görlich *et al.*, 1997; Görlich und Kutay, 1999). Die Karyopherin-Familie wurde nach Importin benannt, das als erster Transportrezeptor dieser Art identifiziert und charakterisiert wurde (Görlich *et al.*, 1995). Alle Mitglieder dieser Familie pendeln zwischen Zellkern und Zytoplasma und besitzen eine schwach homologe N-terminale RanGTP-Bindedomäne. Die Karyopherine können gleichzeitig ihre Lokalisierungssequenzen enthaltenden Substrate binden und mit

Nukleoporinen interagieren. Außerdem besitzen sie eine ähnliche Primärstruktur, die aus mehreren 40 Aminosäuren langen sogenannten HEAT-Repeat-Motiven mit hydrophoben Aminosäuren an konservierten Stellen aufgebaut ist. Eine einzelne HEAT-Repeat-Domäne bildet zwei gegeneinander gebogene Helices, die durch eine kurze Windung voneinander getrennt sind. Die bekannten dreidimensionalen Gesamtstrukturen einzelner Karyopherine sind trotz gemeinsamer HEAT-Repeat-Domänen verschieden. (Cingolani *et al.*, 1999; Chook und Blobel, 1999; Vetter *et al.*, 1999; Bayliss *et al.*, 2000; Conti und Izaurralde, 2001).

Importine binden ihre Substrate im Zytoplasma in Abwesenheit von RanGTP. Die dadurch gebildeten Importkomplexe durchqueren die Kernpore vermutlich durch sequentielle Bindung der Karyopherine/Importine an die Proteine des Kernporenkomplexes (siehe 1.6.). Im Zellkern wird der Importkomplex durch die Bindung von RanGTP an das Importin aufgelöst. Manche Substrate benötigen zu ihrer Freisetzung neben RanGTP noch die Bindung weiterer nukleärer Faktoren, wie z.B. DNA oder RNA, an den Importkomplex (Senger *et al.*, 1998; Pemberton *et al.*, 1999). Die Importine kehren an RanGTP gebunden wieder ins Zytoplasma zurück. (Abb. 1) (Details siehe: Mattaj und Englmeier, 1998; Görlich und Kutay, 1999; Vasu und Forbes, 2001; Conti und Izaurralde, 2001).

Exportine dagegen binden ihre Substrate im Kern bei gleichzeitiger Bindung von RanGTP und unter Ausbildung eines trimeren Exportkomplexes. Dieser interagiert auf seinem Weg ins Zytoplasma mit den Proteinen der Kernpore. Dort verursacht die durch RanGAP und RanBP1 katalysierte Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP die Auflösung des trimeren Exportkomplexes und die Freisetzung des exportierten Substrates (Abb. 1).

Eine besondere Stellung unter der Karyopherinen nehmen Hefe-Msn5p und humanes Importin13 ein, die als bisher einzige Karyopherine sowohl den Export als auch den Import verschiedener Substrate vermitteln können (Yoshida und Blobel, 2001; Mingot *et al.*, 2001).

Tabelle I – Mitglieder der Karyopherin-Familie

<i>S. cerevisiae</i> KARYOPHERIN	HOMOLOGE IN HÖHEREN EUKARYONTEN	SUBSTRATE
Kap60p/Srp1p	Importin	zusammen mit Kap95p: Import von Proteinen mit klassischer NLS
Kap95p	Importin	zusammen mit Kap60p: Import von Proteinen mit klassischer NLS
Kap104p	Transportin	Import von mRNA-bindenden Proteinen (Nab2p, Hrp1p)
Kap108p/Sxm1p	RanBP7, RanBP8	Import von Lhp1p und evtl. von ribosomalen Proteinen
Kap111p/Mtr10p	Importin13	Import des mRNA-bindenden Proteins Npl3p
Kap114p/Tds2p		Import von Spt15p/Tbp1p
Kap119p/Nmd5p	RanBP7, RanBP8	Import von Hog1p und evtl. am Export der großen ribosomalen Untereinheit beteiligt
Kap120p/Lph2p		evtl. am Export der großen ribosomalen Untereinheit beteiligt
Kap121p/Pse1p	Karyopherin 3	Import von ribosomalen Proteinen und Pho4p, Yra1p, Yra2p, Spo12p, Yap1p
Kap122p/Pdr6p		Import der beiden Untereinheiten des TOA-Komplexes, Toa1p und Toa2p
Kap123p/Yrb4p	Karyopherin 3	Import mehrerer ribosomaler Proteine
Kap124p/Xpo1p	Crml	Export von Proteinen mit einer Leucin-reichen NES
Kap142p/Msn5p		Export einiger phosphorylierter Proteine, z.B. Pho4p, Far1p, Mig1p Import des trimeren Replikationsprotein A
Los1p	Exportin-t	Export von tRNA
Cse1p	Cse1	Export von Kap60p

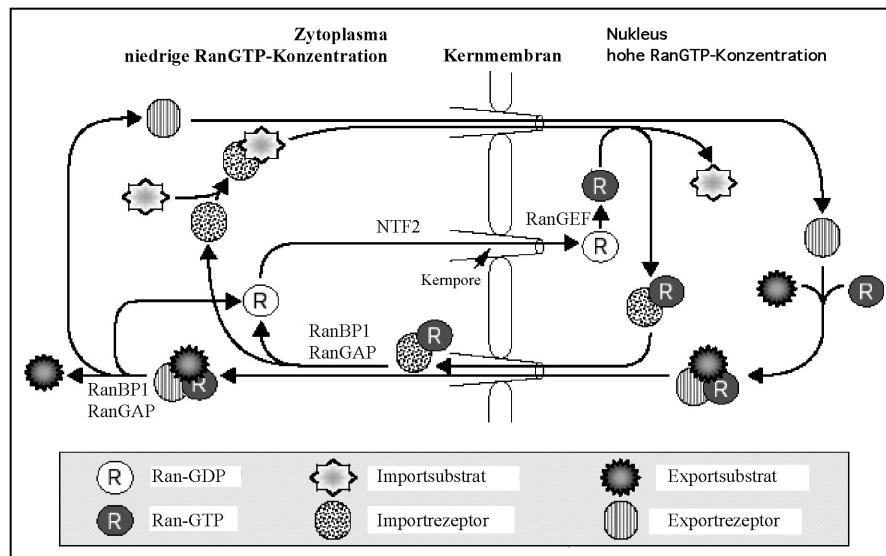


Abb.1: Nukleozytoplasmatischer Transport.

Schematische Darstellung der durch Ran regulierten und von Transportrezeptoren der Karyopherin-Familie vermittelten Import- und Exportreaktionen (Azumo und Dasso, 2000). Nähere Erläuterungen siehe Text.

1.1.3. Energetik des nukleozytoplasmatischen Transportes

Es ist ungeklärt, über welchen Mechanismus die für den nukleozytoplasmatischen Transport benötigte Energie bereitgestellt wird. Früher wurde vermutet, dass für eine Translokation durch den Kernporenkomplex die Hydrolyse von Nucleotidtriphosphaten ATP oder GTP (NTPs), benötigt wird. Inzwischen konnte jedoch gezeigt werden, dass dies nicht der Fall ist (siehe: Görlich und Kutay, 1999). Allerdings hemmt die Inkubation von Hefezellen in 2-Desoxyglucose- und Natriumazid-haltigem Medium alle Rezeptor-vermittelten Transportprozesse in der Zelle, u.a. auch den aktiven nukleozytoplasmatischen Transport. Es ist bekannt, dass Natriumazid die mitochondriale Atmung hemmt und 2-Desoxyglucose die Glycolyse negativ beeinflusst. Die zahlreichen dadurch hervorgerufenen Effekte sind in lebenden Zellen noch nicht vollständig aufgeklärt. Beide Substanzen blockieren die Synthese von Nucleotidtriphosphaten und damit die Regeneration von RanGTP. Dadurch wird indirekt auch der nukleozytoplasmatische Transport gehemmt (Shulga *et al.*, 1996; Shulga *et al.*, 2000).

Die RanGTP-Hydrolyse ist die bisher einzige bekannte mit der Translokation durch die Kernpore gekoppelte NTP-verbrauchende Reaktion. Die einfache Translokation durch die Kernpore scheint aber energieunabhängig zu sein, da sie auch ohne RanGTP-Hydrolyse stattfindet (Ribbeck und Görlich, 2001). Die Auflösung der Transport-

komplexe am Ende der Transportreaktion und die Rückführung der Karyopherine in ihre Ausgangskompartimente benötigt die Umwandlung von RanGTP zu RanGDP. Die beim nukleozytoplasmatischen Transport benötigte Energie könnte also indirekt für jeweils einen Import- oder Exportkomplex aus der Hydrolyse eines RanGTPs im Zytoplasma bereitgestellt werden. Der Export großer Substrate, wie z.B. ribosomale Untereinheiten oder mRNPs, könnte bei einer Entwindung der RNAs zusätzliche Energie erfordern, die möglicherweise durch Helikasen unter ATP-Verbrauch bereitgestellt wird (siehe: Adam, 1999; Görlich und Kutay, 1999; Vasu und Forbes, 2001). Es wird diskutiert, dass die durch Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP gewonnene Energie auch dazu benötigt wird, den Ran-Gradienten über der Kernhülle aufzubauen und aufrecht zuhalten (Vasu und Forbes, 2001).

1.1.4. Export von ribosomalen Untereinheiten

Die Biogenese der Ribosomen beginnt im Nukleolus, einem definierten Zellkernbereich, in dem vorwiegend rRNA synthetisiert und prozessiert wird. An die rRNA-Primärtranskripte binden sowohl ribosomale als auch nicht-ribosomale Proteine. Sie bilden prä-ribosomale Partikel aus, die vor ihrem Export ins Zytoplasma mehreren RNA-Prozessierungs- und Protein-Umlagerungsschritten unterworfen sind. Während die Prozessierung der rRNAs aus dem Vorläufertranskript relativ gut aufgeklärt ist (Venema und Tollervey, 1999; Kressler *et al.*, 1999), gab es bis vor kurzem wenig Informationen über die am Export der prä-ribosomalen Partikel aus dem Zellkern beteiligten Faktoren. Einige dieser Faktoren/Proteine wurden durch Lokalisierungsstudien verschiedener Reporterproteine in unterschiedlichen Mutanten identifiziert. Im Fall der ribosomalen 40S Untereinheit wurden als Reporter das im Zytoplasma prozessierte 3'-Ende der 20S rRNA bzw. das GFP-markierte ribosomale Protein der kleinen Untereinheit Rps2p verwendet (Moy *et al.*, 1999; Gleizes *et al.*, 2001; D. Strauss, persönliche Kommunikation). Für die Analyse von Exportdefekten der ribosomalen 60S Untereinheit wurde die nukleäre Akkumulation GFP-markierter Proteine der großen Untereinheit, Rpl25p oder Rpl11p, untersucht (Gadal *et al.*, 2001a; Gadal *et al.*, 2001b; Stage-Zimmermann *et al.*, 2000). Diese und weitere Untersuchungen zeigen, dass für den Export beider ribosomaler Untereinheiten RanGTP und bestimmte Nukleoporine benötigt

werden (Hurt *et al.*, 1999; Moy *et al.*, 1999). Zusätzliche am Export der beiden ribosomalen Untereinheiten beteiligte Faktoren wurden durch Affinitätschromatographie von Proteinen mit bekannter ribosomaler Funktion und der Analyse assoziierter Proteine und RNAs identifiziert (Baßler *et al.*, 2001; Harnpicharnchai *et al.*, 2001; Saveanu *et al.*, 2001; Gavin *et al.*, 2002; Fatica *et al.*, 2002; Ho *et al.*, 2002; Grandi *et al.*, 2002; Nissan *et al.*, zur Publikation eingereicht).

Ein wichtiger Schritt für den Export der ribosomalen 60S Untereinheit ist die Interaktion von Rpl10p, einem Protein der großen Untereinheit, mit dem zwischen Nukleus und Zytoplasma pendelnden Protein Nmd3p. Nmd3p bindet als Adapter wiederum an das Exportin Xpo1p, das den Export vieler Substrate vermittelt (Milkereit *et al.*, 2001; Baßler *et al.*, 2001; Gadai *et al.*, 2001a; Gadai *et al.*, 2001b).

1.1.5. Export von tRNA

Die im Zellkern synthetisierte und prozessierte tRNA ist ein zentraler Bestandteil der zytoplasmatischen Translation. Reife tRNA wird durch direkte Bindung an ihr Exportin, Hefe-Los1p bzw. Vertebraten-Xpo-t, zusammen mit RanGTP in einem trimeren Exportkomplex ins Zytoplasma transportiert. Los1p ist das bisher einzige bekannte Karyopherin, das direkt mit einer RNA interagiert (Arts *et al.*, 1998a; Hellmuth *et al.*, 1998, Kutay *et al.*, 1998). Es ist nicht nur am Export der tRNA ins Zytoplasma beteiligt, sondern spielt auch eine Rolle beim für den Export wichtigen Spleißen der prä-tRNA (Simos *et al.*, 1996; Hellmuth *et al.*, 1998). Am effizienten, durch Los1p vermittelten Export von tRNA, sind die Aminoacylierung der tRNA und ein Translationsfaktor (eEF-1A) beteiligt. Sie prüfen möglicherweise die korrekte Struktur der tRNA und/oder koppeln die Proteinsynthese mit dem Export von tRNA (Lund und Dahlberg, 1998; Arts *et al.*, 1998b; Großhans *et al.*, 2000a). Für den durch Xpo-t vermittelten Export von tRNA werden eine intakte dreidimensionale Faltung und korrekt gereifte 5'- und 3'-Enden benötigt (Arts *et al.*, 1998b; Lipowsy *et al.*, 1999).

Da Los1p in *S. cerevisiae* nicht für das Wachstum der Zellen essentiell ist (Hurt *et al.*, 1987), muss es entweder einen alternativen tRNA Exportweg geben oder die tRNAs können durch Diffusion vom Zellkern ins Zytoplasma gelangen (Großhans *et al.*, 2000a).

Das die Nukleotidabfolge -CCA- an das 3'-Ende der tRNAs anhängende Cca1p-Protein könnte zwischen Kern und Zytoplasma pendeln. Wird es überproduziert, kann Cca1p den tRNA-Exportdefekt einer *los1Δ* Deletionsmutante unterdrücken. Somit könnte Cca1p Bestandteil eines Los1p-unabhängigen tRNA-Exportweges sein (Großhans *et al.*, 2000a; Feng und Hopper, 2002).

1.1.6. Export von mRNA

Im Zellkern werden mRNAs nach ihrer Transkription verschiedenen Prozessierungs- und Modifizierungsschritten unterworfen bevor sie im Zytoplasma während der Translation in Proteine übersetzt werden. Die prozessierten und modifizierten mRNAs werden als RNP-Partikel aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert. Mögliche Exportsignale könnten sowohl in den mRNAs selbst, als auch in assoziierten Proteinen enthalten sein. Für den mRNA-Export werden allerdings weder Transportrezeptoren der Karyopherin-Familie noch Ran benötigt. Die Richtung des mRNA-Exports wird vermutlich durch einen Gradienten mit höherer mRNA-Konzentration im Zellkern festgelegt, so dass der Export einem Rezeptor-vermittelten Diffusionsmechanismus folgen könnte.

Zentrale am Export von mRNAs beteiligte Faktoren sind die konservierten Proteine Mex67p in Hefe bzw. Tap/NXF in höheren Metazoen sowie Mtr2p in Hefe bzw. p15/Nxt, die ein Heterodimer bilden (Segref *et al.*, 1997; Grüter *et al.*, 1998; Santos-Rosa *et al.*, 1998; Katahira *et al.*, 1999). Beide konservierten Heterodimer-Komplexe pendeln zwischen Zellkern und Zytoplasma und interagieren mit zu exportierenden mRNP-Partikeln sowie mit FG-Repeat-haltigen Proteinen des Kernporenkomplexes (Santos-Rosa *et al.*, 1998; Katahira *et al.*, 1999; Bear *et al.*, 1999; Bacchi *et al.*, 2000; Sträßer *et al.*, 2000; Schmitt und Gerace, 2001).

Die verschiedenen Stufen der Genexpression wie Transkription, Spleißen u.a., sind mit dem mRNA Export gekoppelt. Erste am mRNA-Export beteiligte Faktoren scheinen schon während der Transkription an die prä-mRNA zu binden (Lei *et al.*, 2001; Sträßer *et al.*, 2002). Das Spleißen der prä-mRNA ist sowohl physisch als auch funktionell mit dem Kernexport der mRNAs gekoppelt. Das nukleäre Sub2p/UAP56, ein Mitglied der DEAD-Box Familie ATP-abhängiger ATPasen, wird in höheren Metazoen im Spleißosom für die Bindung des U2 snRNP an die prä-mRNA benötigt. Sub2p/UAP56 rekrutiert schon

während des Spleißens das mRNA-bindende Protein Yra1p/Aly. Yra1p/Aly fördert spezifisch den Export von mRNA und interagiert mit dem Mex67p/Tap-Mtr2p/p15 Heterodimer (Gatfield *et al.*, 2001; Luo *et al.*, 2001; Sträßer und Hurt, 2001). Sub2p und das Mex67p/Mtr2p Heterodimer konkurrieren um die Bindung an Yra1p, d.h. Mex67p-Mtr2p kann an Yra1p binden und dadurch Sub2p vor dem mRNA Export aus dem mRNP-Partikel entfernen (Sträßer und Hurt, 2001). Sowohl Sub2p/UAP56 und Yra1p/Aly werden allerdings nicht nur für den Export gespleißter mRNAs benötigt, sondern auch für den Export nicht-gespleißter mRNAs. Welche Signalsequenzen Sub2p/UAP56 und Yra1p/Aly in den nicht-gespleißten mRNAs erkennen, ist noch unbekannt (Sträßer und Hurt, 2001; Gatfield *et al.*, 2001; Reed und Hurt, 2002).

Andere möglicherweise am Export von mRNAs beteiligte Faktoren sind z.B. Dbp5p und Npl3p. Dbp5p ist eine pendelnde, mit Nup159p, Gle1p und Yra1p interagierende DEAD-Box Helikase. Sie könnte an der Entwindung der RNAs bei der Translokation durch den Kernporenkomplex eine Rolle spielen (Hodge *et al.*, 1999; Schmitt *et al.*, 1999). Das pendelnde Npl3p ist mit der Polyadenylierungsmaschinerie verbunden (Singleton *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1996).

1.2. Struktureller Aufbau des Kernporenkomplexes (NPC)

Der aus den Nukleoporinen aufgebaute Kernporenkomplex (NPC) setzt sich in Vertebraten bei einer molekularen Größe von ca. 125 MDa aus ca. 50 Nukleoporinen (Nups) zusammen. Bei der Hefe *S.cerevisiae* besteht er aus ca. 30 bekannten Nups und ist ca. 60 MDa groß. Vergleicht man die Größe des Kernporenkomplexes von Vertebraten mit der Größe von 4 MDa des aus ca. 80 verschiedenen Proteinen zusammengesetzten Ribosoms, so ist der NPC 30-mal größer als das Ribosom (Yang *et al.*, 1998; Stoffler *et al.*, 1999).

Alle bisher untersuchten Kernporenkomplexe sind aus dem gleichen Grundgerüst aufgebaut. Sie bestehen aus einem zytoplasmatischem und einem nukleärem Ring zwischen denen sich acht Speichen spannen. Die beiden Ringe umschließen einen zentralen Kanal, in dessen Inneren der zentrale Transporter liegt. Die von den Speichen und dem zentralen Transporter gebildete Struktur wird auch Speichen-Ring-Komplex genannt (Akey und Rademacher, 1993; Goldberg *et al.*, 1996; Goldberg *et al.*, 1997;

Stoffler *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2000). Der innere Speichenring, der vermutlich das zentrale Grundgerüst aller Kernporenkomplexe darstellt und an dem der zentrale Transporter aufgehängt sein könnte, ist bei den Kernporenkomplexen von Hefe und höheren Eukaryoten konserviert (siehe: Yang *et al.*, 1998; Stoffler *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2000). Vom zytoplasmatischen Ring gehen acht 35-50 nm lange zytoplasmatische Filamente aus, während sich an den nukleären Ring ein 50-100 nm ins Nukleoplasma ragender sogenannter Kernkorb anschließt (Yang *et al.*, 1998; Stoffler *et al.*, 1999; Ryan und Went, 2000; Allen *et al.*, 2000; Fahrenkrog *et al.*, 2001; Vasu und Forbes, 2001). (Abb. 2A).

Vergleicht man den Kernporenkomplex der Hefe mit dem von höheren Eukaryoten, findet man bei *S. cerevisiae* eine einfacher gebaute Struktur mit einem kleineren Durchmesser (96 nm versus 145 nm), einer geringeren Gesamtdicke (ca. 35 nm versus ca. 80 nm) und einem kleineren Volumen (Abb. 2B und 2C; Stoffler *et al.*, 1999). Ein weiterer Unterschied der Kernporenkomplexe zwischen *S. cerevisiae* und Vertebraten ist die Komplexität des Speichen-Ring-Komplexes. Dieser ist in Hefe insgesamt einfacher aufgebaut als der von höheren Metazoen. Er besteht aus dem Speichenring, der den zentralen Transporter umgibt, und einem äußeren mit der Membran interagierenden Ring (Yang *et al.*, 1998; Stoffler *et al.*, 1999). Bei Vertebraten sind außerdem der durch die Kernhülle ragende Lumenring und der innere Speichenring Bestandteile des Speichen-Ring-Komplexes (Goldberg *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2000). Lumenring und innerer Speichenring sind durch senkrecht zur Kernhüllenebene ausgerichtete Speichen mit dem zytoplasmatischen und nukleären Ring verbunden (Goldberg *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2000). Die äußeren mit dem Lumenring interagierenden Speichen reichen durch die Kernhülle und stabilisieren den Kernporenkomplex durch Verankerung in der Kernporenmembran. Die Hefe *S. cerevisiae* besitzt zur Verankerung einen Membranring. Dieser wird von einem linearen zwischen benachbarten Speichen gelegenen Arm und einer Speichendomäne gebildet (Yang *et al.*, 1998; Stoffler *et al.*, 1999). Innere und zentrale Speichendomänen sind sowohl bei Hefe als auch Vertebraten zu finden. Zytoplasmatische und nukleäre dünne Ringe mit den davon ins Kernporeninnere reichende Speichen kommen jedoch nur in NPCs von höheren Eukaryoten vor (Akey und

Rademacher, 1993; Goldberg *et al.*, 1996; Goldberg *et al.*, 1997; Stoffler *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2000).

In der Mitte der Kernpore befindet sich ein ringförmiger, ca. 40 nm weiter, vom zentralen Transporter umgebener Transportkanal. Durch diesen Kanal findet die Translokation von Makromolekülen statt. Er kann vermutlich aktiv geöffnet und geschlossen werden (Akey, 1990; Goldberg *et al.*, 1999; Stoffler *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2000; Fahrenkrog *et al.*, 2001). Die rotationssymmetrische Struktur des zentralen Transporters besitzt eine ringähnliche Gestalt, die sich radial vergrößern kann. Während der zentrale Transporter in Hefe als ein verkürzter Zylinder erscheint, weist er in Vertebraten eher die dreiteilige Form einer Sanduhr auf. Im Scanning- und in der Transmissionselektronenmikroskopie (EM) ist der zentrale Transporter als eine klare zentrale Einheit zu sehen. Die Funktion des Transporters könnte der kontrollierte Transport durch die Kernporen sein (Akey, 1989). Das Vorhandensein der zentralen Transporterstruktur ist wahrscheinlich, aber bis heute umstritten (Stoffler *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2000). Allerdings kann eine konstant gleich aussehende Struktur in vielen sorgfältig präparierten Kernporenkomplexen sichtbar gemacht werden. Es wird noch diskutiert, ob es sich dabei um eine dynamische Änderung der Kernporenstruktur, um einen Transportkomplex auf seinem Weg durch die Kernpore oder aber um ein durch Fixierung und/oder Aufbereitung verursachtes Artefakt (der EM) handelt (Stoffler *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2000). Im Zentrum der Kernporen gibt es zusätzlich zu diesem Transportkanal noch acht kleinere, hydrophile Randkanäle mit einem Durchmesser von ca. 10 nm, durch welche möglicherweise Ionen und kleine Moleküle passiv diffundieren können (Hinshaw *et al.*, 1992).

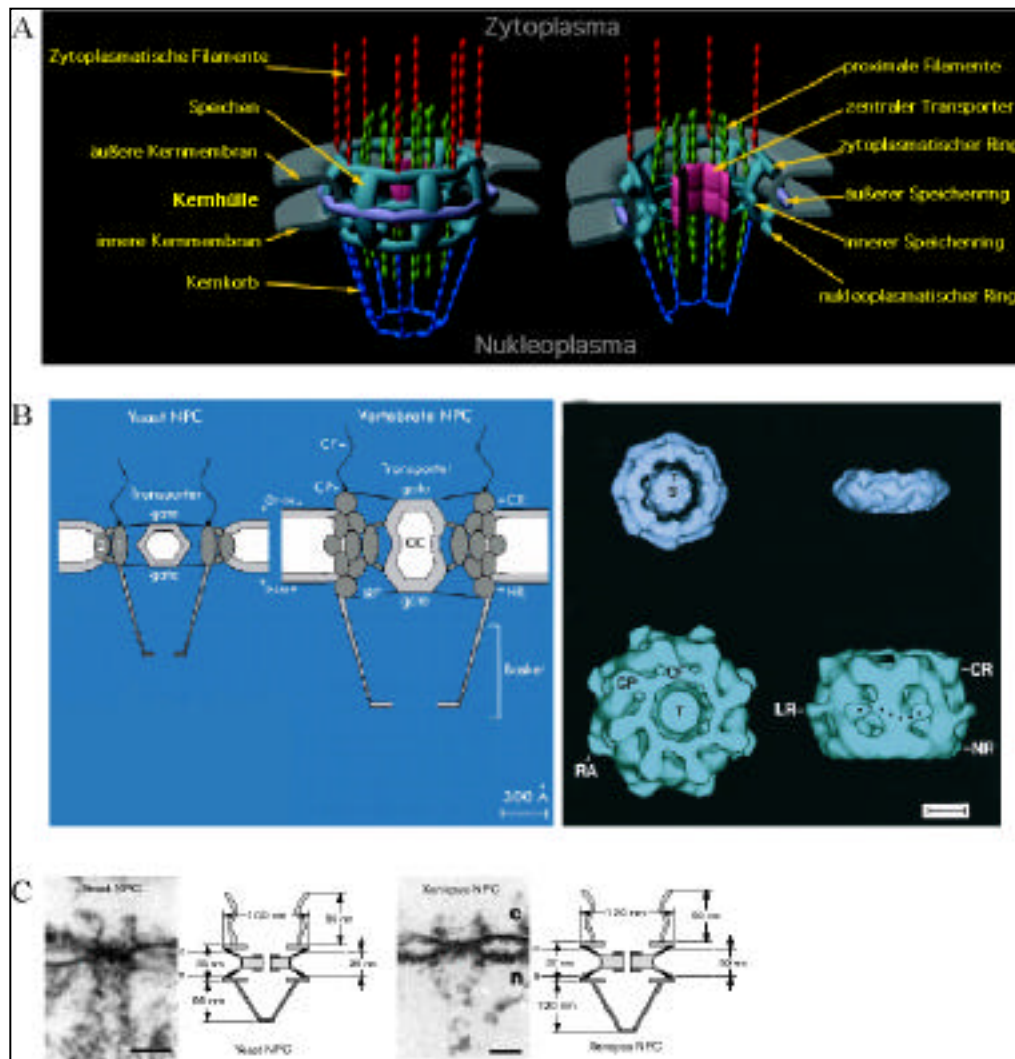


Abb.2: Struktureller Aufbau des Kernporenkomplexes.

(A). Kernporenkomplex von Vertebraten. Die einzelnen Elemente sind mit Pfeilen gekennzeichnet (Rout und Aitchison, 2001).

(B). **links** - Idealisierter vertikaler Querschnitt durch Kernporenkomplexe von Hefe und Vertebraten.

(1 und 2 = radiale Speichendomänen im Hefe-NPC; CF = zytosolische Filamente; CP = zytosol. Partikel; CR = zytosol. Ring; IFR = innere Ringfilamente; CC = zentraler Kanal; NR = nukleärer Ring; ONM/INM = äußere und innere Kernmembran; V_i/V_o = vertikale innere und äußere Domäne; LS = Lumenspeichendomäne; IS/CS = innere und zentrale Speichendomäne. (nach Yang *et al.*, 1998)

(B). **rechts** - Vergleichende 3D-Ansichten von oben und von der Seite des Hefe-NPCs (oben) und des Vertebraten-NPCs (unten). (T = Transporter; S = mögliche Substrate; CF = zytosolische Filamente; CP = zytosolische Partikel; CR = zytosolischer Ring; RA = radiale Arme; NR = nukleärer Ring; LR = Lumenring; Maßstabslinie = 30nm) (Yang *et al.*, 1998).

(C). Elektronenmikroskopischer Querschnitt durch die Kernhülle von Hefe und *Xenopus* Oocyten und ein schematischer Vergleich der Kernporenkomplexe beider Organismen (Stoffler *et al.*, 1999) (c = Zytosol; n = Zellkern; Maßstabslinie = 100nm).

1.3. Biogenese des Kernporenkomplexes

Die Hefe *S. cerevisiae* vermehrt sich durch eine geschlossene Mitose, d.h. bei der Zellteilung bleibt die Kernmembran intakt. Im Gegensatz dazu haben höhere Eukaryoten eine offene Mitose, bei der nicht nur die Chromosomen kondensieren, sondern zusätzlich die Kernlamina zerfällt und die Kernmembran teilweise (*Drosophila*) oder ganz (Vertebraten) zusammen mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) in Vesikeln zerfällt.

In der Mitose höherer Metazoen startet vermutlich die Phosphorylierung einiger Nukleoporine den schrittweisen Abbau der Kernporenkomplexe und die Freisetzung der meisten Nukleoporine als lösliche Untereinheiten (Dabauvalle *et al.*, 1990; Finlay *et al.*, 1991; Macaulay *et al.*, 1995). Integrale Kernporenproteine werden zusammen mit der Kernporenmembran in ER-Kernmembran-Vesikeln verteilt (Ellenberg *et al.*, 1997; Yang *et al.*, 1997). Am Ende der Mitose schließt sich die Kernhülle um das dekodensierende Chromatin und die Kernporenkomplexe werden schrittweise - von innen nach außen - aus den gelösten Untereinheiten wieder aufgebaut (Goldberg *et al.*, 1995). Am Zusammenbau des Kernporenkomplexes sind keine direkten Interaktionen zwischen Kernporenproteinen und Chromatin oder Laminaproteinen beteiligt. Die Lamina wird aber vermutlich für die richtige Orientierung des Kernporenkomplexes benötigt (Goldberg *et al.*, 1995). Der Aufbau einer vollständigen Kernpore dauert in höheren Eukaryoten (*Xenopus*-Oocyten) *in vitro* ca. sechs bis acht Minuten. In *S. cerevisiae* werden während des gesamten Zellzykluses Kernporenkomplexe neu gebildet. Ein verstärkter Einbau wird während der G1-Phase und in der Mitose beobachtet (Mutvei *et al.*, 1992; Fabre und Hurt, 1997). Es wird angenommen, dass die Biogenese der Kernporenkomplexe in Hefe mit der NPC-Biogenese höherer Eukaryoten vergleichbar ist (Goldberg *et al.*, 1995; Goldberg und Allen, 1996; Goldberg *et al.*, 1997).

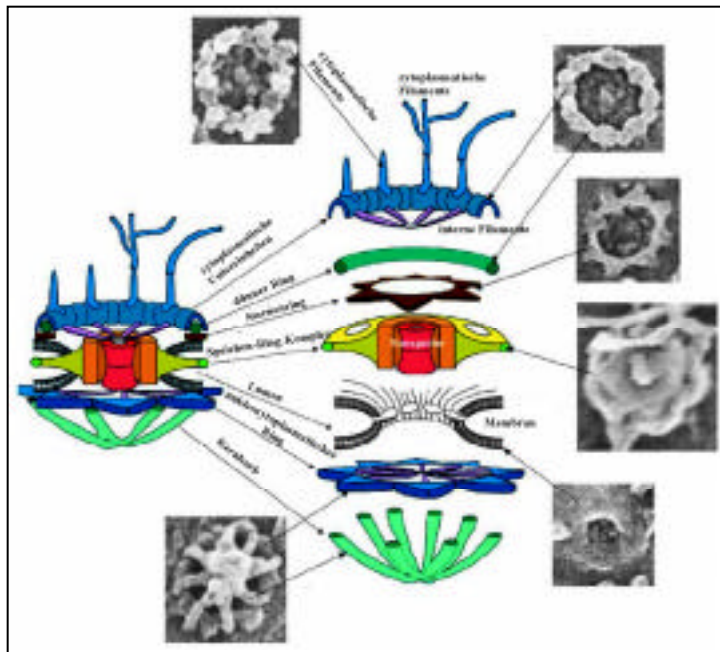


Abb.3: Aufbau des Vertebraten-NPC.

Schematische Darstellung der Zusammensetzung eines Vertebraten-NPC. Einige Strukturen sind direkt durch FEISEM (field emission in-lens scanning EM) sichtbar gemacht (Allen *et al.*, 2000). Ausführliche Beschreibung siehe Text.

Nach dem derzeitigen Modell wird ein neuer Kernporenkomplex Schritt für Schritt aus verschiedenen Elementen aufgebaut. In induzierten *Xenopus*-Oocytenextrakten konnten unter verschiedenen Bedingungen bei der Neubildung von Kernporenkomplexen mehrere aufeinanderfolgende Strukturelemente beobachtet werden (Goldberg *et al.*, 1995; Goldberg und Allen, 1996; Goldberg *et al.*, 1997) (Abb. 3). Das erste Stadium eines Kernporenkomplexes ist eine kleine Delle in der äußeren Kernhülle. Dadurch interagieren innere und äußere Kernhülle miteinander und bilden die Kernporenmembran. An dieser Eindellung sind vermutlich integrale Membranproteine, wie z.B. Pom121 oder gp210 beteiligt. Wann und wie die innere und die äußere Kernmembran miteinander fusionieren, ist noch unbekannt. Größere Dellen könnten schon Vorstufen der Kernporen darstellen (Goldberg und Allen, 1996; Kiseleva *et al.*, 2001; Drummond und Wilson, 2002). Als nächstes Stadium werden sogenannte „stabilisierende Poren“ beschrieben. Sie zeichnen sich durch scharfe Kanten und eine unregelmäßige, oft eckige Form aus. Die Formenvielfalt dieser Poren könnte bedeuten, dass sie sowohl auf der zytoplasmatischen Seite als auch im Lumen der Membran durch ein vernetztes Grundgerüst aus Proteinstrukturen stabilisiert werden. In ihrem Zentrum wird oft weiteres

elektronendichtes Material gefunden. Ob es sich dabei um Aufbau-Zwischenstufen des Speichen-Ring-Komplexes, des zentralen Transporters oder um temporäre Filter, die ein Leck während des NPC Aufbaus verhindern, handelt, ist nicht geklärt. Eine bisher nur bei *Xenopus* entdeckte Struktur ist der aus acht dreieckigen Untereinheiten bestehende, direkt der Membran aufliegenden Sternenring (Goldberg und Allen, 1996). Die acht Ecken des Sternenringes ragen in die Pore. Der Aufbau des Sternenringes geschieht wahrscheinlich durch die sequentielle Einlagerung der dreieckigen Untereinheiten in den wachsenden Ring. Direkt über den Sternenringen bilden sich die dünnen Ringe, die manchmal eine oder mehrere sperrige Untereinheiten tragen. Der dünne Ring scheint eine eigene Unterstruktur zu sein, die als Grundlage für den Zusammenbau des zytoplasmatischen Ringes dient. Vollständig aufgebaute Kernporenkomplexe zeigen in elektronenmikroskopischen Analysen einen ca. 105 nm großen Außendurchmesser, einen zytoplasmatischen Ring mit acht aufgesetzten globulären Partikeln und elektronendichtes Material im Zentrum der Pore (Goldberg *et al.*, 1995; Goldberg und Allen, 1996; Kiseleva *et al.*, 2001).

Inzwischen ist von einigen Nukleoporinen die Reihenfolge ihres Einbaus in den wachsenden Kernporenkomplex bekannt: Bevor eine der Membrankomponenten, wie Pom121 oder gp210, nachgewiesen werden kann, bindet Nup153 als eines der ersten Nukleoporine an Chromatin. Dann finden sich nacheinander Pom121, p62 und Nup214/CAN im wachsenden NPC (Bodoor *et al.*, 1999).

Bisher konnte die Kernporenbiogenese nur auf der zytoplasmatischen Seite der Kernhülle beobachtet werden. Da der Kernporenkomplex aber mit Ausnahme der zytoplasmatischen Filamente und des Kernkorbs auf beiden Seiten der Kernhülle symmetrisch aufgebaut ist, werden auf der nukleären Seite der Kernhülle vermutlich ähnliche Untereinheiten in der gleichen Abfolge zusammengelagert.

1.4. Nukleoporine

Der Kernporenkomplex wird von Nukleoporinen aufgebaut (Tabelle II) (Wente, 2000; Rout *et al.*, 2000). Nur wenige der 30 Hefe-Nukleoporine sind essentiell. Der Kernporenkomplex scheint also in einer stark redundanten Art und Weise zu arbeiten, d.h. viele Nukleoporine üben ähnliche Funktionen aus und können bei Ausfall/Fehlen leicht ersetzt werden.

Fast die Hälfte aller Nukleoporine gehören zur FG-Nukleoporin Familie (Doye und Hurt, 1997; Rout *et al.*, 2000). Die Mitglieder dieser Familie enthalten Wiederholungen (Repeats) der Aminosäureabfolge -GLFG-, -FXFG- oder -FG-, diese sind durch charakteristische, geladene oder polare Aminosäure-Sequenzen getrennt. Bei Vertebraten tragen einige FG-Nukleoporine N-Acetylglucosamin-Modifizierungen an Serin- oder Threoninresten, deren Funktion unbekannt ist. Da sie in den Nukleoporinen zwischen den FG-Repeat-Domänen und coiled-coil-Domänen liegen, wird vermutet, dass sie der Stabilisierung dieser beiden Domänen dienen. Alternativ könnten sie potentielle Phosphorylierungsstellen reversibel maskieren (Davis, 1995). Die Tatsache, dass die FG-Nukleoporine von *S. cerevisiae* keine solchen N-Acetylglucosamin-Modifikationen besitzen, deutet darauf hin, dass sie wahrscheinlich nicht für die Grundstruktur und -funktion des Kernporenkomplexes notwendig sind. Pro Hefe-Kernporenkomplex sind ca. 160 Kopien der FG-Repeat Domänen vorhanden, von denen die Hälfte in symmetrisch lokalisierten und die andere in sieben der neun unsymmetrisch lokalisierten Nukleoporinen zu finden ist (Abb. 4) (Rout *et al.*, 2000). Allerdings werden die Repeat-Motive selbst in den essentiellen Nukleoporinen weder für die Lokalisierung der Proteine noch für das Wachstum der Zellen benötigt. Zusammen mit der Tatsache, dass die FG-Repeats zwischen den Spezies hochkonserviert sind, lässt diese Beobachtung vermuten, dass die FG-Repeats eine redundante aber wichtige Funktion im Kernporenkomplex ausüben (Doye und Hurt, 1997; Rout *et al.*, 2000). Weitere direkte Hinweise auf die Funktion der FG-Nukleoporine im Kernporenkomplex liefern neuere Studien. Diese konnten zeigen, dass die FG-Nukleoporine mit verschiedenen Transportrezeptoren interagieren können und dass die Affinitäten dieser Interaktionen teilweise durch Ran beeinflusst werden (Seedorf *et al.*, 1999; Sträßer *et al.*, 2000; Ryan und Wente, 2000;

Allen *et al.*, 2001; Vasu und Forbes, 2001). Beispielsweise enthalten Nsp1p, Nup49p und Nup57p in ihren N-terminalen und teilweise auch zentralen Regionen FXFG- oder GLFG-Repeats, die mit mehreren verschiedenen Transportrezeptoren interagieren können (Hellmuth *et al.*, 1998; Marelli *et al.*, 1998; Seedorf *et al.*, 1999; Sträßer *et al.*, 2000). Die FXFG-Repeats von Nup159p stellen wahrscheinlich die ersten Bindungsstellen am Kernporenkomplex für Importkomplexe und die letzten für Exportkomplexe dar (Krämer *et al.*, 1995; Sträßer *et al.*, 2000). Daraus lässt sich ableiten, dass die FG-Nukleoporine im nukleozytoplasmatischen Transport an der Translokation durch den Kernporenkomplex beteiligt sind.

Nukleoporine ohne FG-Repeat Domänen scheinen beim nukleozytoplasmatischen Transport wahrscheinlich keine direkte Rolle zu spielen. Mit Ausnahme von Nup159p gehören die meisten sehr großen Nukleoporine in diese Gruppe. Außerdem besteht etwa 25% der Masse isolierter Kernporenkomplexe aus den Nukleoporinen Nup192p, Pom152p, Nup170p, Nup157p, Nup188p und Nic96p, die alle keine FG-Repeats enthalten. Es wird diskutiert, dass die "nicht-FG-Nukleoporine" das essentielle Grundgerüst des Kernporenkomplexes ausbilden, auf dem die FG-Nukleoporine organisiert sind (Doye und Hurt, 1997). Beispielsweise sind die beiden Nukleoporine Nup170p und Nup180p am Aufbau der Diffusionskanäle durch den Kernporenkomplex beteiligt (Shulga *et al.*, 2000). Andere Nukleoporine und Nukleoporin-Komplexe, wie z.B. der Nup84p-Komplex, Nsp1p, Nic96p und Nup192p, werden für die Kernporenbiogenese und/oder den korrekten Aufbau des Kernporenkomplexes benötigt (Mutvei *et al.*, 1992; Siniosoglou *et al.*, 1996; Zabel *et al.*, 1996; Kosova *et al.*, 1999; Gomez-Spinosa *et al.*, 2000). Auch an der Verteilung der Kernporenkomplexe in der Kernhülle spielen nicht-FG-Nups wie z.B. Nup133p und Nup120p eine wichtige Rolle (Doye *et al.*, 1994; Aitchison *et al.*, 1995).

Tabelle II – *S. cerevisiae* Nukleoporine

<i>S. cerevisiae</i> NUKLEOPORIN	DELETION	EUKARYONTEN- HOMOLOGE	DOMÄNEN/MOTIVE
Nup192p	letal	hNup205	coiled-coil Domänen
Nsp1p	letal	p62	FXFG-Repeats/coiled-coil Domänen
Nup49p	letal	p58	GLFG-Repeat/coiled-coil Domäne
Nup57p	letal	p54/p45	GLFG-Repeats/coiled-coil Domäne
Nic96p	letal	hNup93	coiled-coil Domänen
Nup188p	-	hNup188	-
Nup84p	ts	Nup107	-
Nup85p/Rat9p	ts		-
Nup120p/Rat2p	ts		Leucin-Zipper/coiled-coil Domänen
Nup133p/Rat3p	ts	hNup133	-
Nup159p/Rat7p	letal		XXFG-Repeats/coiled-coil Domänen
Yrb2p/Nup36p	cs	RanBP3	FG-Repeats/RanBD/NLS
Seh1p	cs		WD-40 Repeats
Gle2p/Nup40p	ts	hRae1p	4 WD-40 Repeats
Nup42p/Rip1p	-	hRip/Rab	XXFG-Repeats
Nup53p	-		FG-Repeats
Nup59p	-		-
Nup2p	-		FXFG-Repeats/Ran-BD
Nup82p	letal		coiled-coil Domäne
Nup100p	-	Nup98	GLFG-Repeats / NRM
Nup116p	ts	Nup98	GLFG-Repeats/GLEBS / NRM
Nup1p	ts	hNup1	FXFG-Repeats
Nup145p/Rat10p	letal	Nup98+Nup96	GLFG-Repeats/ Protease in N-Terminus/ NRM
Nup170p	-	hNup155	-
Mlp1p	-	Tpr	coiled-coil Domänen
Mlp2p/Nup195p	-	Tpr	coiled-coil Domänen
Nup157p	-	Nup155	-
Pom152p	-		TM-Domäne

ts = thermosensitiv

Die Identität zwischen Nukleoporinen von Hefe und Vertebraten beträgt nur ca. 30 %, trotzdem besitzen mindestens 65 % aller Hefe-Nukleoporine eindeutige Orthologe im Vertebratengenom, die allerdings meist größer sind als die entsprechenden Nukleoporine von Hefe. Einige bekannte Nukleoporin-Komplexe sind sowohl in Hefe als auch in

Vertebraten aus ähnlichen Proteinkomponenten aufgebaut. Beispielsweise besteht der im zentralen Kanal des Kernporenkomplexes lokalisierte, am nukleozytoplasmatischen Transport beteiligte Nup49p-Komplex von *S. cerevisiae* aus den Nukleoporinen Nsp1p, Nup49p, Nup57p und Nic96p (Grandi *et al.*, 1995). Der entsprechende Komplex bei Vertebraten besteht aus p62 (= Nsp1p), p58 (= Nup49p), p45 und p54 (= Nup57p) (Hu *et al.*, 1996). Ein weiterer konservierter Komplex ist der Nup84p-Komplex von Hefe mit den Mitgliedern Nup84p, Nup85p, Nup145p-C, Nup120p, Nup133p, Sec13p und Seh1p (Siniosoglou *et al.*, 1996), dem der Vertebraten-Komplex aus Nup107 (=Nup84p), Nup96 (=Nup145pC), Nup133 (= Nup133p), Nup160 (=Nup120p), Sec13 (=Sec13p), und einem Sec13-verwandtes Protein (=Seh1p) entspricht (Belgareh *et al.*, 2001). Eine Übersicht der Hefe-Nukleoporine und ihre Vertebraten-Homologe zeigen Tabelle II und Abb. 4.

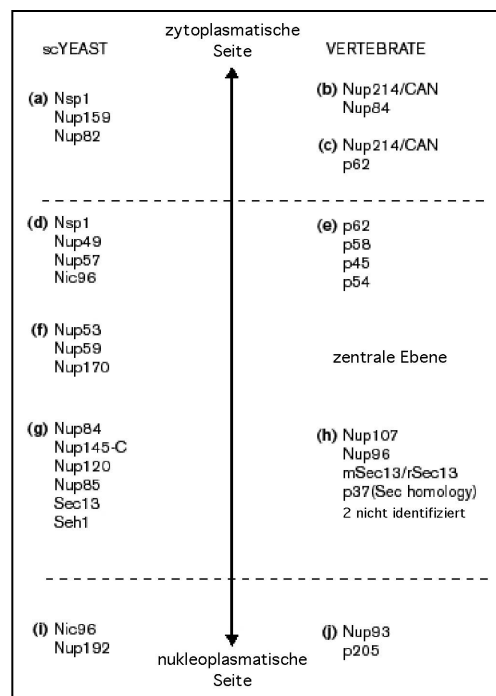


Abb.4: Konservierte Nukleoporinkomplexe und ihre Lokalisierung im Kernporenkomplex (nach Ryan und Wentz, 2000). Nähere Erläuterungen siehe Text.

1.5. Lokalisierung der Nukleoporine im Kernporenkomplex

Die meisten Hefe-Nukleoporine wurden in verschiedenen Studien auf ihre Lokalisierung im Kernporenkomplex untersucht (siehe: Fabre und Hurt, 1997; Ryan und Wentz, 2000; Rout *et al.*, 2000). Die Ergebnisse dieser Studien stimmen allerdings nicht immer überein (vergleiche auch Abb. 4 und Abb. 5).

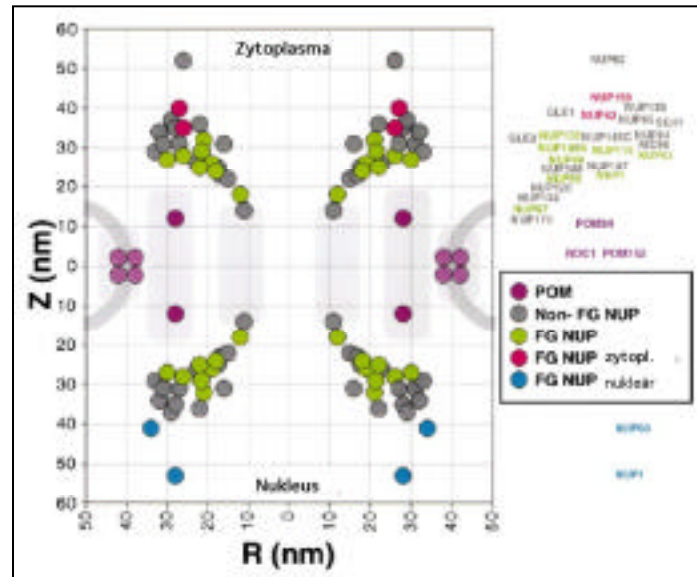


Abbildung 5: Nukleoporin-Verteilung im Hefe-NPC (nach Rout *et al.*, 2000).

Weitere Informationen zu Nukleoporinen siehe Text.

Nach einer neueren Studie von Rout *et al.* (2000) scheinen die meisten der 30 Nukleoporine symmetrisch auf beiden Seiten des Kernporenkomplexes verteilt zu sein (Abb. 5). Die Nukleoporine Nup57p, Nup170p, Nup188p und Nup192p befinden sich nach dieser Studie in der zentralen Ebene des NPCs. Nur neun der 30 Nukleoporine zeigen entweder eine eindeutig asymmetrische Lokalisierung (nukleär: Nup2p, Nup1p, Nup60p; zytoplasmatisch: Nup159p, Nup42p und Nup82p) oder eine verstärkte Lokalisierung auf einer Seite des Kernporenkomplexes (nukleär: Nup145p-N; zytoplasmatisch: Nup116p, Nup100p und Gle1p) (Rout *et al.*, 2000). Diese asymmetrisch lokalisierten Nukleoporine, alles Mitglieder der FG-Nukleoporin-Familie, sollen nach Rout *et al.* (2000) für die strukturellen Unterschiede zwischen zytoplasmatischer und nukleärer Seite des Kernporenkomplexes verantwortlich sein. Allerdings ist dieses Modell noch umstritten, da in der tatsächlichen zentralen Ebene des NPCs keinerlei

Nukleoporine lokalisiert werden konnten und außerdem so unterschiedliche Komplexe Strukturen, wie der Kernkorb aus den drei bis vier nukleär lokalisierten Nukleoporinen aufgebaut sein sollen (Vasu und Forbes, 2001).

Da bei Vertebraten der Kernporenkomplex größer ist, scheint es hier leichter als für den Hefe-NPC zu sein, die Lokalisierung der bekannten Nukleoporine zu bestimmen (Abb.4). An den zytoplasmatischen Filamenten lokalisieren neben Nup214/CAN und Nup358/RanBP2 auch noch Nup88 und das über SUMO an Nup358/RanBP2 gebundene RanGAP1-Protein (Krämer *et al.*, 1994; Wilken *et al.*, 1995; Fornerod *et al.*, 1997; Mahajan *et al.*, 1997). Mögliche Bestandteile des zentralen Speichen-Ring-Komplexes von Vertebraten (und ihre Hefeorthologen) sind vNup93 (yNic96p), vNup205 (yNup192p), vNup188 (yNup188p) und vNup155 (yNup170p) (Aitchison *et al.*, 1995; Grandi *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2000). Auf der nukleären Seite wurden die Nukleoporine bzw. Nukleoporinkomplexe Nup153, Nup98-Gle2 und Nup160-Nup58-Nup96-Nup107 gefunden (Nakienly *et al.*, 1999; Pitchard *et al.*, 1999; Belgareh *et al.*, 2001). Von einigen der asymmetrisch lokalisierten Vertebraten-Nukleoporinen, z.B. vNup98, vNup153 und vNup214 wurde berichtet, dass sie sich im Kernporenkomplex von einer Seite zur anderen bewegen können (Boer *et al.*, 1997; Zolotukhin und Felber, 1999; Nakienly *et al.*, 1999).

1.6. Translokation durch den Kernporenkomplex

Die Translokation durch den Kernporenkomplex kann in drei Schritte unterteilt werden: Erstens Andocken des Transportkomplexes an die FG-Repeats der peripheren Strukturen des Kernporenkomplexes, zweitens FG-Repeat-vermittelte Translokation durch den zentralen Kanal der Kernpore und drittens Substratfreisetzung von FG-Nukleoporinen im anderen Kompartiment.

Nach Ribbeck und Görlich (2001) erlaubt ein einzelner Kernporenkomplex den Durchtritt von 1000 Transportinmolekülen pro Sekunde. Es wird diskutiert, dass die Transportrezeptoren/Transportkomplexe auf ihrem Weg durch den Kernporenkomplex mit verschiedenen aufeinanderfolgenden FG-Nukleoporinen interagieren. Der Transportkomplex, an dem der Transportrezeptor beteiligt ist, scheint dabei intakt zu bleiben (Ryan und Wentz, 2000; Vasu und Forbes, 2001). Die Richtung der Translokation eines

Transportkomplexes durch den Kernporenkomplex wird dem heutigen Modell nach durch eine asymmetrische RanGTP/RanGDP-Konzentration über der Kernhülle (Mattaj und Englmeier, 1998; Görlich und Kutay, 1999) und durch asymmetrisch lokalisierte Nukleoporine, die unterschiedliche Bindungsaffinitäten für Transportkomplexe zeigen, festgelegt (Allen *et al.*, 2000).

In den letzten Jahren wurde der Translokationsmechanismus einiger Transportrezeptoren durch den Kernporenkomplex teilweise aufgeklärt. Ein Importkomplex auf dem Weg vom Zytoplasma in den Zellkern interagiert zuerst mit Nukleoporinen der zytoplasmatischen Filamente, die sich möglicherweise in das Zentrum der Kernpore biegen können, wodurch der Importkomplex in die Nähe zentraler FG-haltiger Bestandteile des Kernporenkomplex gelangt (Allen *et al.*, 2000; Ryan und Wentz, 2000; Vasu und Forbes, 2001). Auf der nukleären Seite des Kernporenkomplexes binden Importkomplexe, wie z.B. ein Importin-Importin-Substrat-Komplex, sehr stark an die am Kernkorb des Kernporenkomplexes lokalisierten FG-Nukleoporine. (Rexach und Blobel, 1995; Shah und Forbes, 1998; Shah *et al.*, 1998; Hood *et al.*, 2000; Solsbacher *et al.*, 2000). Durch die Bindung des Importkomplexes an nukleär lokalisierte Nukleoporine sowie die Bindung von RanGTP an das Importin wird der Importkomplex aufgelöst und das NLS-haltige Substrat freigesetzt. Die Translokation eines Exportkomplexes, wie z.B. des Xpo1p-Exportkomplexes, nimmt den umgekehrten Weg durch den Kernporenkomplex, beginnend mit Interaktionen FG-haltiger Nukleoporine des Kernkorbes. An den zytoplasmatischen Filamenten angelangt, wird der Exportkomplex durch RanGTP-Hydrolyse aufgelöst. Importin-RanGTP-Komplexe werden auf die gleiche Weise wieder ins Zytoplasma zurück exportiert (Allen *et al.*, 2000; Vasu und Forbes, 2001). Mehrere Studien berichten, dass die Interaktion zwischen verschiedenen Mitgliedern der Karyopherin-Familie mit FG-Nukleoporinen unterschiedlich stark ist und dass sie teilweise durch Ran kontrolliert werden können (Seedorf *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2000). Auch andere Transportrezeptoren, wie z.B. der Importrezeptor von Ran, NTF2 und der mRNA-Exportrezeptor Mex67p-Mtr2p können mit den FG-Repeats verschiedener Nukleoporine interagieren (Chaillan-Huntingdon *et al.*, 2000; Sträßer *et al.*, 2000; Strawn *et al.*, 2001; Bayliss *et al.*, 2002; Katahira *et al.*, 2002).

Schon lange sind Veränderungen des Kernporenkomplexes bekannt, die durch die Translokation von Transportkomplexen verursacht werden könnten. Beispielsweise wurden offene (beim Durchlass) und geschlossene Kernporen beobachtet (Akey, 1990). In den letzten Jahren wurde bekannt, dass sich der funktionelle Durchmesser des zentralen Kanals von Kernporenkomplexen in späten Stadien der Oozyten-Entwicklung in *Xenopus* vergrößert und durch die Mikroinjektion des Ran-Importrezeptors NTF2 verändert werden kann (Feldherr *et al.*, 1998). Kiseleva *et al.* (1998) fanden, dass sich in *Chironomus tentans* beim Export der großen mRNPs die Lage des Transporters relativ zu anderen Bestandteilen des Kernporenkomplexes ändert. Weitere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Kernkorbstruktur durch Ca^{2+} -Ionen bzw. durch den beginnenden mRNP Export in *Chironomus* reversibel verändert werden kann (Kiseleva *et al.*, 1998; Stoffler *et al.*, 1999b).

Die eigentliche Translokation durch den Kernporenkomplex benötigt keine durch Nukleotid-Hydrolyse bereitgestellte Energie (Wente, 2000; Vasu und Forbes, 2001). In den letzten Jahren wurden mehrere Modelle für den Translokationsmechanismus durch die Kernpore entwickelt. Die meisten dieser Modelle gehen von einer erleichterten Diffusion aus, die durch Assoziation und Dissoziation der Transportkomplexe mit FG-Repeats enthaltenden Nups kontrolliert wird (Wente, 2000).

Das Assoziations- Dissoziationsmodell (Allen *et al.*, 2000):

In diesem Modell wird die Translokation eines Transportkomplexes durch die Kernpore von einem System aus mehreren Bindungsstellen für den Transportkomplex im Kernporenkomplex ermöglicht. An diesen Bindestellen kann sich der Transportkomplex durch wiederholtes Anheften bzw. Ablösen fortbewegen. Die Richtung des Transports wird durch unterschiedliche Bindungsaffinitäten der Transportkomplexe zu den Bindestellen in verschiedenen Bereichen des Kernporenkomplexes festgelegt. In der gleichen Kernpore könnten sowohl Import- als auch Exportrouten vorhanden sein, die gleichzeitig benutzt werden könnten (Allen *et al.*, 2000). Allerdings spricht die symmetrische Verteilung der meisten Nukleoporine im Kernporenkomplex gegen dieses Modell (Wente, 2000).

Andere Modelle setzen ein dichtes, den zentralen Kanal des Kernporenkomplexes durchziehendes Netz aus filamentösen, FG-Repeats enthaltenden Nukleoporinen voraus.

Dieses Netz stellt eine Grenze für die passive Diffusion von Makromolekülen dar (Conti und Izzaurrealde, 2000; Vasu und Forbes, 2001).

Das Modell der erleichterten Diffusion/Brown's Affinitätsmodell (Rout *et al.*, 2000):

Dieses Modell beruht auf der Annahme, dass der Transporter aus vielen wogenden, unstrukturierten FG-Nukleoporin-Filamenten besteht. Transportkomplexe könnten aufgrund ihrer Affinität zu den FG-Repeats ihre Aufenthaltszeit im durch Transporter-Filamente gebildeten Eingangsbereich des Zentralkanals erhöhen und so in diesen Kanal gelangen. Dagegen werden Proteine, die nicht zwischen Zellkern und Zytoplasma transportiert werden, durch ungerichtete Bewegungen der Transporter-Filamenten abgelenkt und am Eintritt in den zentralen Kanal gehindert. Bei diesem Modell ist der zentrale Kanal eine Art Tor, das nicht mit Nukleoporinen interagierende Moleküle entropisch ausschließt.

Das (dynamische) Sieb-Modell (Ribbeck und Görlich, 2001 und 2002).

Bei diesem Modell bilden die FG-Nukleoporine im zentralen Kanal durch die gegenseitige Anziehung der hydrophoben FG-Repeats ein Netzwerk bzw. eine Permeabilitätsgrenze über der zentralen Kernporen-Ebene aus. Dieses „FG-Netz“ stellt eine undurchlässige Grenze für hydrophile Proteine dar, die nicht durch die Kernpore transportiert werden. Für Transportkomplexe wird dagegen das „FG-Netz“ durch spezifische, hydrophobe Wechselwirkungen der Transportrezeptoren mit den FG-Repeats der Nukleoporine durchlässig, so dass sie durch die Kernporen gelangen können und auf der anderen Seite der Kernpore wieder auftauchen. Transportkomplexe können also den zentralen Kanal gezielt öffnen und darin „gelöst“ werden. Dadurch können sie die Permeabilitätsgrenze des Kernporenkomplexes überwinden und die Kernpore schnell durchqueren.

2. Nup192p - Das größte bekannte essentielle Hefe-Nukleoporin

Nach der Beschreibung der Strukturen und Funktionen der am nukleozytoplasmatischen Transports durch die Kernpore beteiligten Bausteine, soll im folgenden das größte essentielle Nukleoporin der Hefe *S. cerevisiae* Nup192p vorgestellt werden.

Grandi *et al.* (1997) identifizierten in *Xenopus* ein 205 kDa großes Protein, das mit Nup93, dem Vertebraten-Homologen zum Hefe-Nukleoporin Nic96p, biochemisch interagiert. Das heute Nup205 genannte Protein kann mit gegen Nup93 gerichteten Antikörpern aus einem *Xenopus*-Extrakt gefällt werden; dies bedeutet, dass Nup205 und Nup93 aneinander binden (Miller *et al.*, 2000). Auf der Suche nach möglichen Hefe-Homologen dieses 205 kDa großen Proteins wurde in der Hefe *S. cerevisiae* ein noch nicht charakterisiertes Gen *YLJ039c* gefunden. Dieses Gen kodiert für ein 192 kDa großes essentielles, Nup192p genanntes Protein (Kosova *et al.*, 1999). Mittels Western-Blot-Analyse konnte auch in Hefe eine Interaktion zwischen Nic96p und Nup192p beobachtet werden (Kosova *et al.*, 1999).

Das Nup192p-Protein enthält mehrere Heptad-Repeats, die vermutlich coiled-coil-Domänen ausbilden können. Über diese in anderen Proteinen an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligten coiled-coil-Domänen, könnte Nup192p mit anderen Heptad-Repeats enthaltenden Nukleoporinen, wie z.B. Nic96p, interagieren.

Nup192p-GFP zeigt ein für Nukleoporine typisches Ring-Fluoreszenz-Signal um den Zellkern. In Nukleoporin-Mutanten, die alle Kernporenkomplexe an wenigen Stellen der Kernhülle angehäuft aufweisen, findet man das Nup192p-GFP-Signal genau an diesen Anhäufungspunkten (Kosova *et al.*, 1999). In elektronenmikroskopischen Analysen wurde eine Nup192p-Lokalisierung stärker auf der nukleären Seite der Kernporen (Kosova *et al.*, 1999) bzw. symmetrisch auf beiden Seiten der Kernpore (Rout *et al.*, 2000) beobachtet.

Die relative Nup192p-Menge wird auf 24 oder 32 Kopien je Kernporenkomplex geschätzt (Rout *et al.*, 2000). Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass 25% der Masse isolierter Kernporen aus den Nukleoporinen Nup192p, Nic96p, Nup188p, Pom152p, Nup170p und Nup157p zusammengesetzt ist (Doye und Hurt, 1997). Nup192p

ist somit nicht nur das größte essentielle, sondern auch ein sehr abundantes Protein des Kernporenkomplexes.

Zur weiteren Charakterisierung von Nup192p wurde das mutierte, thermosensitive (ts) *nup192-15*-Allel hergestellt und analysiert: Hefezellen, die als einzige Nup192p-Kopie das *nup192-15*-ts-Allel tragen, stellen bei restriktiver Temperatur (37°C) nach 8-10 Stunden Inkubation ihr Wachstum ein. In diesem Zeitraum zeigen *nup192-15*-Zellen, wie auch ts-Mutanten in *NIC96* (*nic96-1*) (Grandi *et al.*, 1995; Zabel *et al.*, 1996), sowohl einen normalen Kernimport von Proteinen mit klassischer NLS als auch einen intakten poly(A)⁺RNA Export (Kosova *et al.*, 1999). Allerdings wurde in *nup192-15*-Mutanten schon nach vier Stunden eine deutliche Abnahme der Signalintensität verschiedener GFP-Nukleoporin-Reporter, wie z.B. Nup49p-GFP und Nup82p-GFP, beobachtet (Kosova *et al.*, 1999). Bei der elektronenmikroskopischen Analyse der Kernporenzahl in *nup192-15* und *nic96-1* Mutanten zeigte sich eine deutliche Reduktion der Gesamt-Kernporenzahl je Zellkern (Gomez-Ospina *et al.*, 2000): Während Wildtyp-Hefezellen ca. 100 Kernporen pro Zellkern besitzen, reduziert sich bei *nup192-15*-Hefezellen die Gesamtporenanzahl bei permissiver Temperatur (23°C) auf ca. 80 (Abb. 6). Nach Inkubation für vier Stunden bei restriktiver Temperatur (37°C) sinkt in *nup192-15*-Zellen die Kernporenzahl je Kern sogar auf nur 30, d.h. diese Zellen weisen pro Kern bei sonst normaler Verteilung der Poren über der Kernhülle nur noch 30% der Kernporenzahl der Wildtyp-Zellen auf (Gomez-Ospina *et al.*, 2000). Bei permissiver Temperatur scheint demnach die Neubildung der Kernporen und/oder Kernporenkomplexe bei *nup192-15*-Zellen nur eingeschränkt möglich zu sein, während sie bei restriktiver Temperatur blockiert ist. In diesem Fall könnten nur noch die bereits existierenden Kernporen an die Tochterzellen vererbt werden. Bei Zellen, die das *nic96-1*-ts-Allel tragen (Zabel *et al.*, 1996) bzw. Zellen, die kein neues Nsp1p mehr produzieren können (Mutvei *et al.*, 1992), sinkt die Gesamtzahl der Kernporen pro Zellkern ebenfalls signifikant ab. Das bedeutet, dass die drei Nukleoporine Nup192p, Nic96p und Nsp1p eine klare Rolle am Aufbau des Kernporenkomplexes spielen.

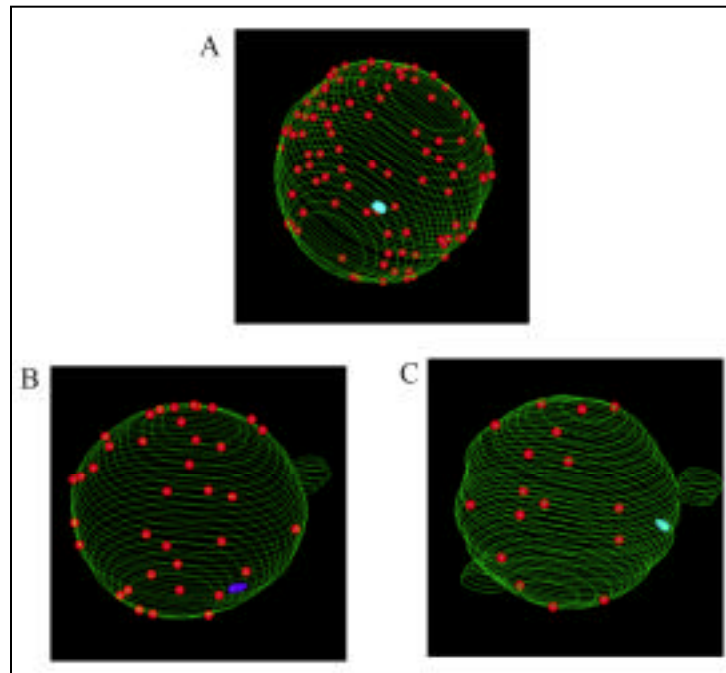


Abb.6: In *nup192-15*-Mutanten ist die Gesamt-Kernporenzahl reduziert

A. Ein aus mehreren Dünnschnitten zusammengesetztes Modell eines Zellkerns von einer *nic96-1*-Mutanten bei permissiver Temperatur.

B. Ein aus mehreren Dünnschnitten zusammengesetztes Modell eines Zellkerns von einer *nup192-15*-Mutanten bei restriktiver Temperatur;

C. Ein aus mehreren Dünnschnitten zusammengesetztes Modell eines Zellkerns von einer *nic96-1*-Mutanten bei restriktiver Temperatur.

Die Umrisse der Kernhülle in den Dünnschnitten sind **grün**, das Spindelpol-Körperchen **blau** und Kernporenkomplexe sind **rot** dargestellt.

(Gomez-Ospina *et al.*, 2000)

3. Ziel der Arbeit

Zytoplasma und Zellkern sind durch die Kernhülle voneinander getrennt. Der regulierte Stoffaustausch zwischen den beiden Kompartimenten erfolgt durch die in der Kernhülle verankerten Kernporenkomplexe. Bisher sind vom Kernporenkomplex viele der beteiligten Komponenten sowie seine grobe Struktur bekannt. Wie sich die einzelnen Kernporenproteine in diese elektronenmikroskopische NPC-Struktur einfügen bzw. welche Funktion sie im NPC haben, war und ist Gegenstand zahlreicher Studien.

Eines der wenigen essentiellen Proteine im Kernporenkomplex der Hefe *S. cerevisiae* ist Nup192p, das zudem zu den größten Nukleoporinen gehört. Zusammen mit einigen anderen großen Nukleoporinen u.a. Nic96p, mit dem Nup192p biochemisch interagiert, stellt Nup192p die Hauptmasse des NPCs dar (Doye und Hurt, 1997). Nup192p spielt, wie mehrere andere essentielle Nukleoporine bzw. Nukleoporin-Komplexe eine wichtige Rolle am Aufbau des Kernporenkomplexes (Kosova *et al.*, 1999; Gomez-Ospina *et al.*, 2000). Im Gegensatz zu den meisten dieser essentiellen Nukleoporine scheint Nup192p direkt weder am poly(A)⁺ RNA-Export noch an einigen untersuchten Kernprotein-Importreaktionen beteiligt zu sein (Kosova *et al.*, 1999). Um eine mögliche Rolle von Nup192p in speziellen Transportreaktionen zu finden, wird in der vorliegenden Arbeit der Transport weiterer Substrate untersucht.

Weitere Interaktionspartner von Nup192p sind bisher ebenso wenig bekannt wie die NPC-Strukturen, an denen Nup192p beteiligt ist. Aufgrund der Tatsache, dass Nup192p ein essentielles und zugleich eines der größten Nukleoporine ist, wird erwartet, dass Nup192p außer mit Nic96p noch mit weiteren, für die Struktur und die Funktion des Kernporenkomplexes wichtigen Nukleoporinen interagiert. Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist es, die direkten Interaktionspartner von Nup192p im Kernporenkomplex zu identifizieren, um dadurch mehr Informationen über die Lage und die Funktion von Nup192p im NPC zu erhalten. Darüber hinaus wurde versucht, die Struktur dieses 192 kDa großen Proteins mittels biochemischer Analysen und Elektronenmikroskopie zu bestimmen. Hierdurch soll ein Beitrag zur Klärung der Frage geliefert werden, mit welchen Nukleoporinen Nup192p interagiert, ob Nup192p an höhergeordneten Komplexen beteiligt ist und wie Nup192p in NPCs eingebaut wird.

4. Ergebnisse

4.1. Nup192p ist weder am aktiven Transport noch an der Diffusion durch den NPC beteiligt

Bislang konnten in der untersuchten *nup192*-Mutante, dem *nup192-15*-Allel, keine Veränderungen im Import von Proteinen mit klassischer NLS und im Export von poly(A)⁺ RNA beobachtet werden (Kosova *et al.*, 1999). Es besteht allerdings durchaus die Möglichkeit, dass Nup192p nur an bestimmten Transportprozessen oder an der passiven Diffusion von Molekülen durch den NPC beteiligt ist. Deshalb wurde das Verhalten mehrerer aktiver Transportprozesse und die Diffusionsrate bestimmter Reporterproteine in der *nup192-15*-Mutante bei restriktiver Temperatur beobachtet.

Alle untersuchten Zellkulturen enthalten als einzige *NUPI92*-Kopie das *nup192-15-ts*-Allel sowie verschiedene mit *GFP* markierte Reporterproteine. Diese Hefezellen stellen nach acht bis zehn Stunden Inkubation bei restriktiver Temperatur (37°C) ihr Wachstum ein. Es wird angenommen, dass der Grund für den Wachstumsstopp in dieser Mutante eine auf ein Minimum abgesunkene Kernporenzahl ist (Kosova *et al.*, 1999; Gomez-Ospina *et al.*, 2000).

4.1.1. Die *nup192-15*-Mutante zeigt einen normalen nukleozytoplasmatischen Transport

Lokalisierung von Transportsubstraten mit unterschiedlicher NLS in der *nup192-15*-Mutante

Stellvertretend für den von Mtr10p- bzw. Kap123p-vermittelten Proteinimport wurde der Import von Npl3p bzw. Rpl25p untersucht. Das RNA-bindende Protein Npl3p pendelt zwischen Zytoplasma und Kern. Es spielt eine Rolle am Export von mRNA aus dem Kern (Lee *et al.*, 1996). Npl3p wird durch das zur Karyopherin-Familie gehörende Importin Mtr10p/Kap111p in den Kern importiert und dort durch Binden von RanGTP und Mtr10p in Anwesenheit von RNA freigesetzt (Senger *et al.*, 1998). Rpl25p ist Bestandteil der großen ribosomalen Untereinheit und wird im Nukleolus durch die direkte Bindung an die rRNA in den Ribosomen-Vorläufer eingebaut (Van Beekvelt *et*

al., 2000). Rpl25p wird durch das Karyopherin Kap123p/Yrb4p in den Kern importiert (Schlenstedt *et al.*, 1997).

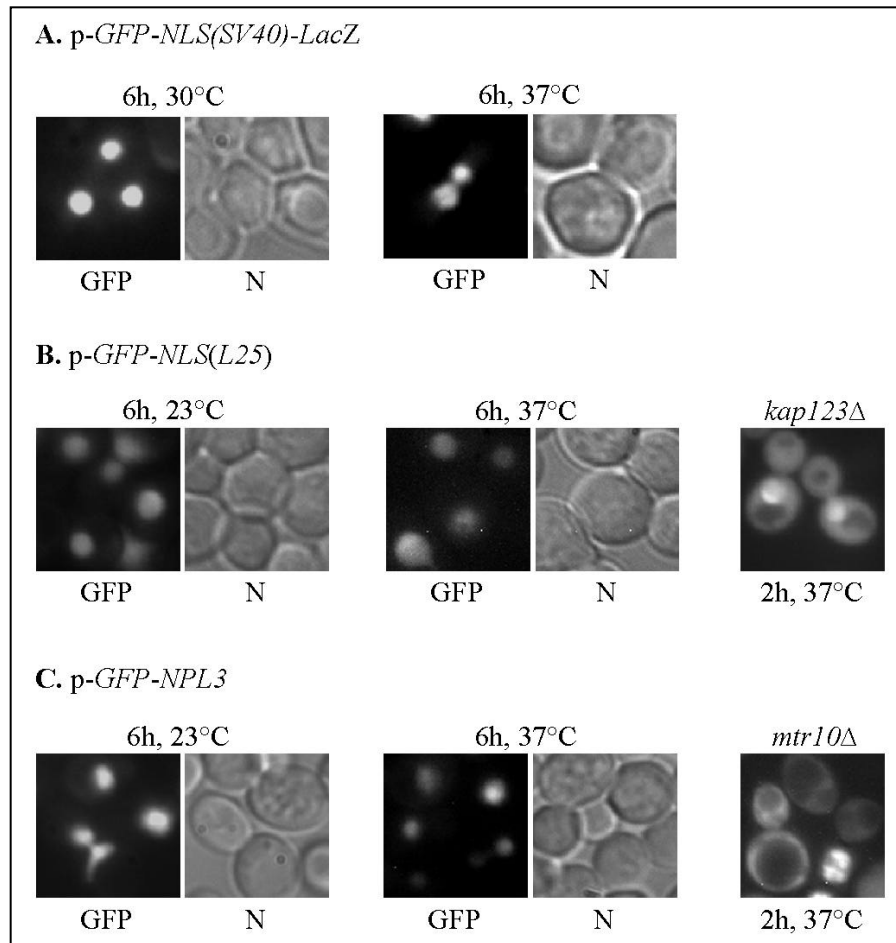


Abb.7: Die Lokalisierung mehrerer in den Kern importierter Reporterproteine in *nup192-15*-Zellen ist normal

Lokalisierung dreier nukleärer Reporterproteine bei permissiver und restriktiver Temperatur in *nup192-15*-Zellen:

(A) p-GFP-NLS_{SV40}-LacZ (pADH-NLS-GFP-lacZ), (B) p-GFP-NLS_{L25} (YEplac195-ADE3-URA3-GFP-NLS_{L25}) und (C) p-GFP-NPL3 (pNOPGFPA1A-NLS-NPL3).

Drei untersuchte Reporterproteine, die verschiedene Kernlokalisierungssequenzen tragen, zeigen bei restriktiver Temperatur in der *nup192-15*-Mutante ein ausschließlich nukleäres Signal und keine Misslokalisierung im Zytoplasma. Dagegen misslokalisiert p-GFP-NLS_{L25} in *kap123Δ*-Zellen (B) und p-GFP-NPL3 in *mtr10* (C) schon nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C stark im Zytoplasma. Die untersuchten Kulturen werden bis zur log-Phase (OD_{600nm} 0.4-0.5) bei 23° gezogen und danach für sechs Stunden bei restriktiver (37°C) und permissiver (23°C) Temperatur weiter inkubiert. Die Lokalisierung der Reporterproteine bei permissiver und restriktiver Temperatur in *nup192-15*-Zellen wird unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. (GFP=GFP-Reporter-Signal; N=Nomarski).

Um die in diesem Experiment verwendeten Bedingungen zu kontrollieren, wurde die bereits bekannte Lokalisierung eines Reporters, der die klassische NLS des großen T-Antigens von SV40 trägt, beobachtet (Kosova *et al.*, 1999). Dieser nukleäre Reporter zeigt wie erwartet (Abb. 7A) sowohl bei permissiver als auch bei restriktiver Temperatur nach sechs Stunden keine zytoplasmatische Misslokalisierung in der *nup192-15*-Mutante, sondern lokalisiert weiterhin im Kern. Ebenso zeigen die untersuchten nukleären GFP-Reporterproteine, p-*GFP-NLS_{L25}* und p-*GFP-NPL3*, in *nup192-15*-Zellen bei restriktiver Temperatur keine Änderung der Lokalisierung im Zellkern (Abb. 7B und Abb. 7C). In den gleichzeitig als Positivkontrollen untersuchten Importin-Mutanten *mtr10Δ* bzw. *kap123Δ* sieht man dagegen eine deutliche Misslokalisierung der Reporterproteine im Zytoplasma.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass keines der untersuchten Reporterproteine in *nup192-15*-Zellen eine Misslokalisierung zeigt. Nup192p scheint weder am Proteinimport von Npl3p, von ribosomalen Proteinen oder von Proteinen mit klassischer NLS noch am Transport pendelnder Proteine wie z.B. Mtr10p, Kap104p oder Gsp1p (nicht gezeigte Daten) direkt beteiligt zu sein.

4.1.2. Die passive Diffusion durch den NPC ist in *nup192-15*-Mutanten normal

Ionen, Metabolite und kleine Moleküle, wie z.B. kleine Proteine, werden durch passive Diffusion durch den NPC zwischen Zellkern und Zytoplasma ausgetauscht. Shulga *et al.* (2000) konnten zeigen, dass Nup170p und Nup188p, zwei große und häufig im Kernporenkomplex vorkommende Nukleoporine, Bestandteile des Diffusionskanals im Kernporenkomplex von *S. cerevisiae* sind. Demnach wird der 10 nm messende Diffusionskanal der Kernporen von Nup170p und von Nup188p eingeschränkt. Dies wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Rate des passiven Transports in *nup170Δ*- und *nup188Δ*-Disruptionen im Vergleich zu Wildtypzellen signifikant erhöht ist. Außerdem ist in *nup170Δ*-Zellen die maximale Größe von GFP-Reporterproteinen, welche die Kernhülle durch passive Diffusion durchqueren können, von ca. 50 kDa in Wildtypzellen auf bis zu 126 kDa erhöht (Shulga *et al.*, 2000).

Nup192p könnte aufgrund seiner Größe ähnlich wie Nup188p und Nup170p ebenfalls am Bau des Diffusionskanals beteiligt sein. Deshalb wurde die Rate der passiven Diffusion

in *nup192-15*-Mutanten mit der Diffusionsrate in Wildtypzellen bzw. in *nup170Δ*- und *nup188Δ*-Mutanten verglichen. Um die Diffusionseigenschaften der Kernhülle von Hefe zu untersuchen, verwendeten Shulga *et al.* (2000) eine Methode, die es erlaubt, den passiven Transport ohne Störung durch den Rezeptor-vermittelten Transport zu beobachten. Durch Inkubation der Hefezellen in Natriumazid- und 2-Desoxyglucose-haltigem Medium für 45 min auf Eis wird der Rezeptor-vermittelte Transport, u.a. auch der aktive nukleozytoplasmatische Transport der Hefezelle gehemmt, während passive Diffusionsprozesse normal ablaufen (siehe 1.1.3., Seite 11/12). In Anwesenheit der beiden Inhibitoren verteilt sich ein ursprünglich nur im Kern vorhandener, ca. 40 kDa großer NLS_{Rpl25p}-GFP-Reporter rasch und gleichmäßig in Kern und Zytoplasma, da er nun frei durch die Kernporen diffundieren kann. Die zelluläre Verteilung kleiner Polypeptide (bis zu 50 kDa) erfolgt vermutlich unabhängig von Zeit und Temperatur durch den aktiven Rezeptor-vermittelten Transport, der mit der passiven Diffusion konkurriert (Shulga *et al.*, 1996; Shulga *et al.*, 2000).

In $\Delta nup192$ p-*NUP192*-, *nup170*-, *nup188*- und $\Delta nup192$ p-*nup192-15*-Zellen, die ein GFP-NLS_{Rpl25p}-Reporter-Plasmid tragen, wurden wie oben beschrieben alle Transportprozesse blockiert. Dieser normalerweise aktiv in den Zellkern importierte ca. 40 kDa große GFP-NLS_{Rpl25p}-Reporter diffundiert in 45 Minuten durch die Kernporen bis eine Gleichverteilung des Reporters zwischen Nukleus und Zellkern erreicht ist. Nach Waschen der Zellen wurden durch Zugabe von Glucose-haltigem Medium die blockierten Transportprozesse wieder gestartet. 10 Minuten später ist die nukleäre Ausgangslokalisierung des GFP-NLS_{Rpl25p}-Reporters in Wildtypzellen wiederhergestellt (Abb. 8B) (Shulga *et al.*, 1996; Shulga *et al.*, 2000). Wie erwartet, beobachtet man in Wildtypzellen schon eine Minute nach erneutem Starten der aktiven Transportreaktionen in fast allen Zellen wieder eine nukleäre Akkumulation des GFP-NLS_{Rpl25p}-Reporters und schon nach ca. 10 min ist die Ausgangslokalisierung des Reporters wieder hergestellt (vergleiche Abb. 8B 10 min mit Abb. 8B “-“). In *nup170*-Zellen, die einen erweiterten Diffusionskanal besitzen, ist der Re-Import des GFP-NLS_{Rpl25p}-Reporters verzögert (vergleiche Abb. 8A 3 min mit Abb. 8B 3 min), aber nach 10 min ist auch in diesen Zellen kaum noch ein zytoplasmatisches Signal zu erkennen, d.h. es wurden fast alle zytoplasmatischen GFP-NLS_{Rpl25p}-Reporter-Moleküle aktiv in den Kern zurück-

importiert. 30 Minuten nach Aufheben des Transportblocks ist allerdings wieder eine Verstärkung des zytoplasmatischen Signals des Reporters zu beobachten. In *nup170Δ*-Zellen diffundiert der Reporter vermutlich insgesamt schneller aus dem Kern ins Zytoplasma als er durch das Karyopherin-Heterodimer Kap95p-Kap60p in den Kern importiert wird (Abb. 8A).

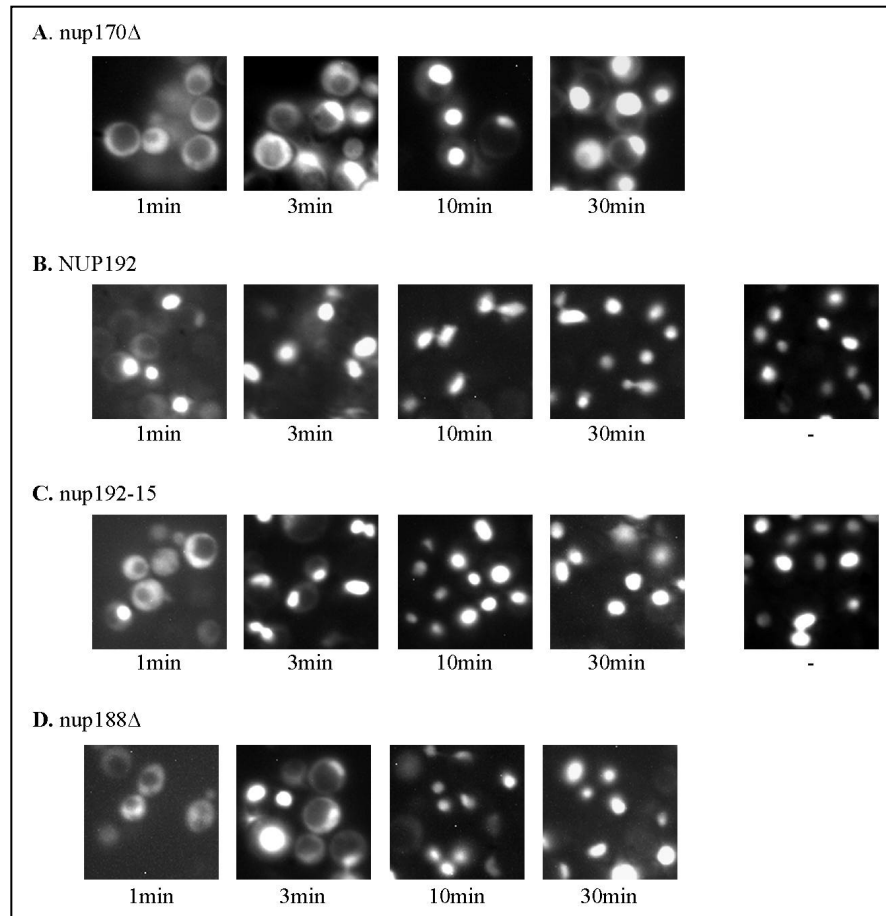


Abb.8: Der Re-Import eines GFP-NLS-Reporters nach Aufhebung des Transportblocks zeigt in *nup192-15*-Zellen eine normale Kinetik

Alle aktiven Transportprozesse in *nup170*-, *nup188*-, *nup192* p-*NUP192*- (*Ycplac22-NUP192*), und p-*nup192-15*- (*Ycplac22-nup192-15*) Zellen werden durch Inkubation der Zellen mit Natriumazid und 2-Deoxyglucose blockiert. Nach Aufhebung des Transportblocks = 0min wird die Lokalisierung eines GFP-NLS_{Rpl25p}-Reporters beobachtet. (A). In *nup170*-Zellen misslokalisiert der GFP-NLS_{Rpl25p}-Reporter nach 30min im Zytoplasma, d.h. die Diffusionsrate ist erhöht (siehe auch Shulga *et al.*, 2000). (B). *nup192* p-*NUP192*-Wildtypzellen: 10min nach Starten der Transportprozesse ist die Ausgangsverteilung des Reporterproteins wieder hergestellt. (C). Die *nup192-15*-Mutante zeigt eine ähnliche Importkinetik wie *Nup192p*-Wildtypzellen. (D). In *nup188*-Zellen scheint die Diffusionsrate leicht erhöht, da der zytoplasmatische Anteil des GFP-NLS_{Rpl25p}-Reporters nach 3min im Vergleich zu Wildtypzellen (C) immer noch erhöht und erst nach 10min die nukleäre Ausgangslokalisierung wieder zu beobachten ist.

In *nup188*-Zellen verläuft der Re-Import des GFP-NLS_{Rpl25p}-Reporters leicht verzögert, da wie bei *nup170Δ*-Zellen drei Minuten nach Starten der Transportprozesse immer noch ein zytoplasmatisches Signal beobachtet werden kann (Abb. 8D). Allerdings ist nach 10 min die nukleäre Ausgangslokalisierung des Reporters wieder hergestellt und im Gegensatz zu *nup170Δ*-Zellen bleibt diese auch über einen längeren Zeitraum konstant. Dies stimmt mit der von Shulga *et al.* (2000) gemachten Beobachtung überein, dass bei *nup188*-Zellen der Diffusionskanal weniger erweitert zu sein scheint als in *nup170*-Zellen. In der *nup192-15*-Mutanten wird der verwendete GFP-NLS_{Rpl25p}-Reporter nach Aufhebung des Transportblocks ähnlich schnell wie in den Nup192p-Wildtypzellen wieder in den Kern importiert (vergleiche Abb.8B mit Abb. 8C). D.h. die *nup192-15*-Mutante scheint einen Diffusionskanal mit normalem Durchmesser von ca. 10 nm zu besitzen und nicht, wie Nup170p und Nup188p, am Aufbau des Diffusionskanals im Kernporenkomplex der Hefe *S. cerevisiae* beteiligt zu sein.

4.2. Lokalisierung von Nukleoporin-Reporterproteinen in *nup192-15*-Mutanten

Früher wurde schon beobachtet, dass Hefezellen, die das mutierte thermosensitive *nup192-15*-Allel tragen, nach längerer Inkubation (bis zu 10 Stunden) bei restriktiver Temperatur (37°C) einen starken Abfall der Signalintensität von GFP-markierten Kernporenreportern wie z.B. GFP-Nup49p zeigen (Kosova *et al.*, 1999). Außerdem wurde bei den meisten dieser Zellen eine Anhäufung der untersuchten Kernporen-Reporter an einem einzigen im Zytoplasma in der Nähe des Zellkerns gelegenen Punkt beobachtet. Es wird diskutiert, ob bei restriktiver Temperatur in *nup192-15*-Mutanten der Einbau dieser GFP-Nukleoporin-Reporter in den Kernporenkomplex nur eingeschränkt möglich ist (Kosova *et al.*, 1999). Mit dem folgenden Experiment sollte der Grund für die beobachtete Signalreduktion des Nukleoporin-Reporters untersucht werden. Die GFP-Nukleoporin-Reporter könnten ins Zytoplasma misslokalisieren statt in die Kernporen eingebaut zu werden. Dies hätte zur Folge, dass das GFP-Signal des Reporters aufgrund des vergleichsweise höheren Zytoplasmavolumens stärker „verdünnt“ wird. Dadurch könnte es zu einer scheinbaren Signalintensitätsabnahme kommen, ohne dass eine tatsächliche Verminderung des vorhandenen Reporterproteins stattgefunden hat. Oder die beobachtete Reduktion der Signalstärke könnte einer tatsächlichen Abnahme des

vorhandenen Reporterproteins in den Zellen entsprechen. Die Frage nach der Ursache lässt sich durch Visualisierung und Vergleich der GFP-Reporter-Proteinmengen von *nup192-15*-Zellen, die bei permissiver bzw. restriktiver Temperatur gezogen wurden, beantworten. Hierzu wurden aus den jeweiligen Zellen die löslichen Hefeproteine isoliert und die Reporterproteine durch gegen GFP-gerichtete Antikörper sichtbar gemacht.

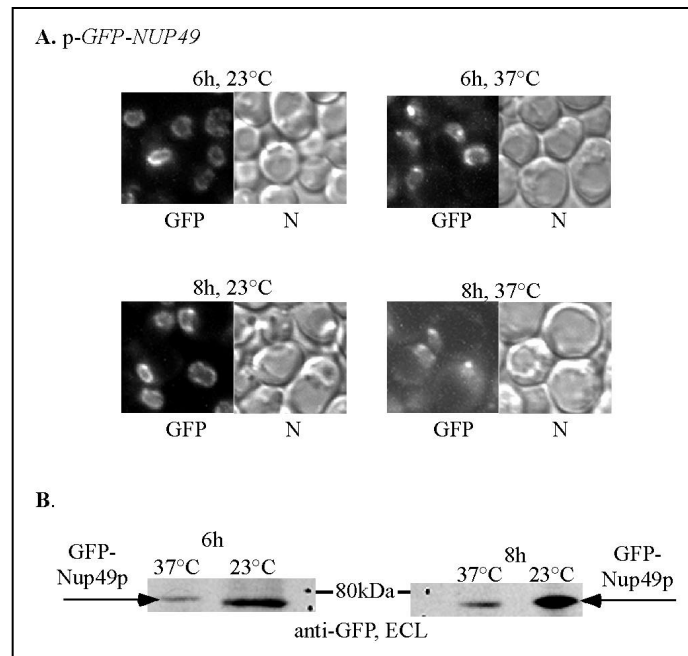


Abb.9: Reduktion von GFP-Nup49p in *nup192-15* Zellen

(A). Lokalisierung von GFP-Nup49p (pASZ11-GFP-NUP49) in *nup192-15*-Zellen. Das GFP-Nup49p-Signal am Kernporenkomplex ist bei restriktiver Temperatur (37°C) reduziert und aggregiert in einem Punkt. Die untersuchten Zellen werden für sechs bzw. acht Stunden bei restriktiver (37°C) und permissiver (23°C) Temperatur inkubiert. Das GFP-Signal des Reporterproteins wird unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. (GFP=GFP-Reporter-Signal; N=Nomarski).

(B). Von den in (A) gezeigten Zellen werden jeweils gleichviele Hefezellen (10 OD = ca. 3×10^8 Zellen) geerntet und aufgeschlossen. Die daraus erhaltenen Zellextrakte werden mittels Western-Blot-Analyse und einem gegen GFP gerichtete Antikörper analysiert und mit chemischer Lumineszenz sichtbar gemacht

Abb. 9 zeigt das Ergebnis einer solchen Untersuchung für den GFP-Nup49p-Reporter: Der Vergleich der GFP-Nup49p-Mengen in *nup192-15*-Zellen, die für sechs bzw. acht Stunden bei restriktiver bzw. permissiver Temperatur gezogen wurden, zeigt unter restriktiven Bedingungen eine deutlich reduzierte GFP-Nup49p-Menge, die *in vivo* in wenigen Punkten lokalisiert ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in *nup192-15*-Mutanten, die einen Rückgang der Kernporezahl zeigen (Gomez-Ospina *et al.*, 2000), durch *in vivo*-Lokalisierung und/oder biochemischer Analyse der gebildeten Reporter-Proteinmenge eine Verminderung verschiedener Nukleopore, wie z.B. Nup49p, Nic96p, Nup57p oder Nup82p, beobachtet wurde (Kosova *et al.*, 1999).

Um herauszufinden, ob in der *nup192-15*-Mutante alle Nukleopore bei restriktiver Temperatur eine Signalreduktion zeigen, oder ob es Nukleopore-Beispiele gibt, die entweder eine unveränderte Lokalisierung oder eine Misslokalisierung zeigen, wird die Lokalisierung weiterer GFP-markierter Nukleopore in *nup192-15*-Zellen untersucht: Tatsächlich zeigt ein GFP-Nsp1p-C-Reporter in *nup192-15*-Zellen im Gegensatz zu der bisher beobachteten Abnahme der Signalintensität von GFP-Nukleopore-Reportern bei restriktiver Temperatur keine erkennbare Signalreduktion (Abb. 10). Statt der bei permissiver Temperatur beobachteten ringförmigen GFP-Nsp1p-C Lokalisierung im Kernporenkomplex wird eine nukleozytoplasmatische Misslokalisierung und eine Aggregation des Signals an einem Punkt in Zellkernnähe beobachtet (Abb. 10A). Übereinstimmend mit einer GFP-Nsp1p-C-Misslokalisierung steht die Beobachtung, dass auch nach sechs Stunden bei restriktiver Temperatur in *nup192-15*-Zellen die GFP-Nsp1p-C-Proteinmenge, im Gegensatz zur GFP-Nup49p (Abb. 9B), vergleichbar ist (Abb. 10B). Im Vergleich zu der Proteinmenge in bei permissiver Temperatur gezogenen *nup192-15*-Zellen ist zwar eine Reduktion zu erkennen, die aber nicht so deutlich ist wie bei GFP-Nup49p (Abb. 9B).

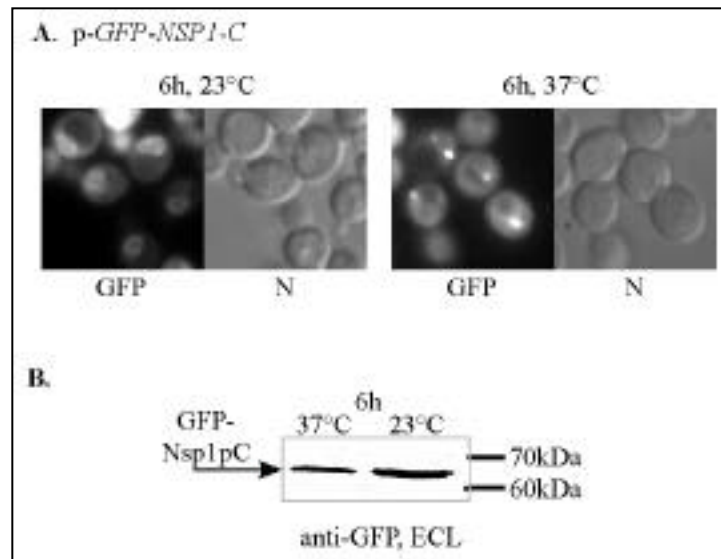


Abb.10: Misslokalisierung von GFP-Nsp1p-C in *nup192-15*-Zellen bei restriktiver Temperatur

(A). Lokalisierung von GFP-Nsp1p-C (pNOPGFPA1A-*NSP1-C*) in *nup192-15*-Zellen. Ein GFP-Nsp1p-C-Reporter zeigt in *nup192-15*-Zellen nach sechs Stunden bei restriktiver Temperatur eine nukleozytoplasmatische Misslokalisierung und Aggregation in wenigen Punkten. Die untersuchte Kultur wird für sechs Stunden bei restriktiver (37°C) bzw. permissiver (23°C) Temperatur inkubiert. Das GFP-Nsp1p-C-Signal wird unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert. (GFP=GFP-Reporter; N=Nomarski). (B). Western-Blot-Analyse mit einem gegen GFP-gerichteten Antikörper von *nup192-15*-Zellen, die den GFP-Nsp1p-C-Reporter tragen. Von den in (A) gezeigten Zellen wurden gleichviele Zellen (ca. 3×10^8) geerntet, aufgeschlossen, mittels Western Blot und gegen den GFP-Marker gerichteten Antikörper analysiert.

4.3. Suche nach genetischen Interaktionspartnern von Nup192p im NPC

Über die Funktion von Nup192p ist bekannt, dass es eine Rolle in der Kernporenbogenese spielt (Kosova *et al.*, 1999). Für eine genaue Charakterisierung ist es hilfreich zu wissen, mit welchen anderen Proteinen, insbesondere mit welchen Nukleoporinen, Nup192p physisch oder funktionell interagiert. Diese Informationen geben nicht nur weitere Hinweise auf die Funktion, sondern auch über die genaue Lage im Kernporenkomplex.

In der Hefe *S. cerevisiae* gibt es unter anderem zwei Methoden, um Interaktionspartner von einem gegebenen Protein, hier Nup192p, zu identifizieren:

- a) Die biochemische Isolierung von Nup192p mit *in vivo* an Nup192p gebundenen Proteinen aus Hefezellen.
- b) Die Interaktion zweier Gene auf genetischer Ebene durch synthetische Letalität ihrer mutanten Allele deutet auf eine funktionelle oder physische Interaktion hin.

4.3.1. Die Bedeutung der synthetischen Letalität

Die Genetik stellt eine Methode bei der Hefe *S. cerevisiae* dar, um Interaktionspartner von Nup192p aufzudecken. Besteht eine physische oder funktionelle Interaktion zwischen zwei Proteinen, so ist ein Hefestamm, der mutante Allele der interagierenden Proteine trägt, meist nicht mehr oder nur eingeschränkt lebensfähig. Trägt der Hefestamm dagegen nur eines der beiden mutanten Allele, so überlebt er. Dieses Phänomen wird synthetische Letalität (sl) genannt (Huffaker *et al.*, 1987; Bender und Pringle, 1991). Eine Interaktion zweier Gene liegt auch vor, wenn es zu einer starken Einschränkung der Lebensfähigkeit des beide mutanten Allele aufweisenden Hefestammes im Vergleich zu dem nur jeweils eines der beiden mutanten Allele tragenden Hefestammes kommt. Die bezeichnet man als konditionelle synthetische Letalität. Beide Phänomene stellen einen genetischen Hinweis dafür dar, dass die beiden Genprodukte entweder physisch miteinander interagieren oder überlappende Funktionen besitzen (Grandi und Hurt, 1995; Doye und Hurt, 1995; Abb. 11). Es gibt allerdings auch Beispiele dafür, dass biochemisch direkt aneinander bindende Proteine auf genetischer Ebene keinerlei Interaktionen zeigen, wie z.B. Nup116p und Gle2p (Murphy *et al.*, 1996; Bailer *et al.*, 1998)

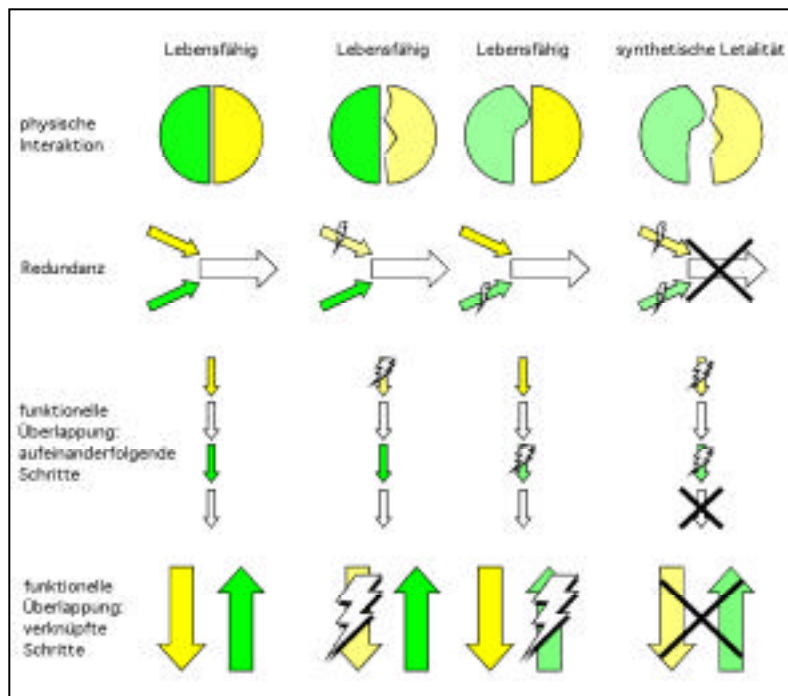


Abb.11: Bedeutung der synthetischen Letalität für die Genprodukte – Modelle

Zeigen mutierte Allele zweier Proteine eine sogenannte synthetische Letalität, kann dies auf Proteinebene mehrere Ursachen haben: Die beiden Proteine können physisch miteinander interagieren oder eine ähnliche Funktion aufgrund struktureller Ähnlichkeiten erfüllen. Eine weitere Möglichkeit ist, dass die beiden Proteine aufeinanderfolgende bzw. voneinander unabhängige Funktionen besitzen (nach Doye und Hurt, 1995; nähere Ausführungen siehe Text).

1) Eine physische Interaktion liegt dann vor, wenn die beiden untersuchten Nukleoporine direkt oder indirekt aneinander binden bzw. wenn sie am gleichen Nukleoporin-Komplex beteiligt sind: Die Mitglieder des Nsp1p-Nup57p-Nup49p-Nic96p-Komplexes wurden z.B. als synthetisch letale Mutanten in der genetischen Analyse eines mutanten *NSP1*-Allels identifiziert. In diesem Fall konnte die genetische Interaktion durch biochemische Analyse auf eine physische Interaktion der Nukleoporine zurückgeführt werden (Wimmer et al., 1992; Grandi et al., 1995).

2) Liegt eine strukturelle Verwandtschaft der genetisch interagierenden Nukleoporine vor, handelt es sich um eine Redundanz. Ein Beispiel hierfür ist die genetische Beziehung zwischen den Nukleoporinen Nup145p, Nup116p und Nup100p, denen neben GLFG-Motiven auch ein konserviertes RNA-Bindemotiv gemeinsam ist. Die Deletion von *NUP100* zusammen mit der Zerstörung der RNA-Bindedomäne der Gene von *NUP116* und *NUP145* führt zu einer deutlichen Einschränkung des Zellwachstums. Dies bedeutet, dass diese verwandten Domänen eine redundante oder überlappende Funktion im NPC besitzen (Fabre et al., 1994).

3) Von einer funktionellen Überlappung spricht man, wenn Mutationen in Nukleoporinen, die im gleichen Weg an aufeinanderfolgenden oder miteinander verknüpften Schritten wie z.B. am nukleozytoplasmatischen Transport oder am Zusammenbau des Kernporenkomplexes beteiligt sind, zum Zelltod und damit zur synthetischen Letalität führen. Beispielsweise führt die Analyse auf synthetische Letalität mit einem mutanten *nup49-ts*-Allel, das hauptsächlich einen Defekt im poly(A)⁺RNA Export zeigt, zur Identifizierung eines mutanten *nup133*-Allels, in dem der poly(A)⁺RNA Export ebenfalls eingeschränkt ist (Doye et al., 1994).

4.3.2. Genetische Interaktionen zwischen NUP192 und anderen Nukleoporin-Genen

Um Interaktionspartner von Nup192p im Kernporenkomplex zu identifizieren, wurde zunächst ein genetischer Weg eingeschlagen. Für die definierte Identifikation von Nukleoporinen, die auf genetischer Ebene mit Nup192p interagieren, wurde ein *nup192::HIS3*-Knockout-Stamm, der entweder eine *URA3-NUP192*-Wildtypkopie und/oder eine *nup192-15*-Mutante auf einem Plasmid trägt, mit 24 verschiedenen Nukleoporin-Knockout-Stämmen gekreuzt (siehe Tabelle III; Durchführung siehe

Material und Methoden 6.4.). So erhaltene Doppelmutanten wurden auf eine genetische Beziehung zwischen *NUP192* und anderen Nukleoporinen untersucht. Dafür wurden die Doppelmutanten mit verschiedenen Plasmiden transformiert, so dass Kombinationen von Wildtyp, Einzel- und Doppelmutanten erhalten wurden. So kann bei gleichem genetischen Hintergrund durch Wachstumsanalyse von Wildtyp, Einzelmutanten und Doppelmutanten, wie in Material und Methoden 6.7. beschrieben, das Wachstum auf 5-FOA-haltigem Medium verglichen werden. In den Mutanten wird immer eine der beiden Nukleoporin-Mutanten durch ein *URA3*-Wildtyp-Plasmid komplementiert. Da das Proteinprodukt des *URA3*-Gens auf 5-FOA-haltigem Medium aus 5-FOA (5-Fluoruracil-6-carboxylsäuremonohydrat) eine für Hefezellen toxische Substanz bildet, können nur die Hefezellen überleben, die das *URA3*-Wildtyp-Plasmid verlieren können. Sind die beiden Nukleoporin-Mutanten synthetisch letal miteinander, benötigen die Zellen das auf dem *URA3*-Plasmid kodierte Wildtyp-Gen für ihr Überleben. Somit ist ein Verlust des *URA3*-Plasmids nicht möglich und die Hefezellen sterben.

nup192-15 nupx Doppelmutanten, die auf 5-FOA-haltigem Medium keine synthetische Letalität zeigen, wurden auf ihr Wachstum auf Vollmedium im Vergleich zu den Einzelmutanten getestet.

Die Ergebnisse der genetischen Analyse von Nup192p und den getesteten Nukleoporinen werden in den nächsten Abschnitten dargestellt und sind in Tabelle III zusammengefasst.

Der Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Nic96p-Komplex und Nup192p

Der von Hefe bis Vertebraten konservierte Nukleoporin-Komplex bestehend aus den essentiellen Nukleoporinen Nsp1p, Nup49p, Nup57p und Nic96p ist ein zentraler Bestandteil im Innern des Kernporenkomplexes. Hier ist er am Aufbau des Transporters bzw. des Transportkanals beteiligt. Die Komponenten dieses Komplexes spielen eine Rolle im nukleozytoplasmatischen Transport und interagieren direkt mit verschiedenen Transportrezeptoren. Das essentielle Nsp1p ist in zwei Nukleoporin-Komplexen vorhanden: im Nsp1p-Nup49p-Nup57p-(Nic96p)- (Grandi *et al.*, 1995a; Schlaich *et al.*, 1997) und im Nsp1p-Nup82p-Nup159p-Nup116p-Komplex (Grandi *et al.*, 1995b; Belgareh *et al.*, 1998). Diese zwei verschiedenen Nukleoporin-Komplexe sind an unterschiedlichen Orten im NPC lokalisiert. Dadurch findet man Nsp1p einmal am zytoplasmatischen und nukleären Ende des zentralen Kanals im Nup49p-Komplex

(Fahrenkrog *et al.*, 1998; Rout *et al.*, 2000), außerdem am zytoplasmatischen Ende des zentralen Kanals im Nup82p-Komplex (Fahrenkrog *et al.*, 1998; Fahrenkrog *et al.*, 2000b) und zusätzlich zusammen mit Nic96p am terminalen Ring des Kernkorbes (Fahrenkrog *et al.*, 1998; Fahrenkrog *et al.*, 2000b).

Der essentielle C-Terminus von Nsp1p besteht aus mehreren Heptad-Repeats, die vier alpha-helikale coiled-coil-Domänen ausbilden (Carmo-Fonseca *et al.*, 1991). Die ersten beiden coiled-coil-Domänen sind für die Bildung eines Nsp1p-Nup57p-Nup49p-Komplexes ausreichend. Sowohl Nup57p als auch Nup82p binden an die coiled-coil-Domäne 2. Für die Bindung von Nic96p an den Nsp1p-Nup57p-Nup49p-Komplex und für die Lokalisierung dieses Komplexes in den Kernporen werden die coiled-coil-Domänen 3 und 4 benötigt. (Abb. 12; Bailer *et al.*, 2001).

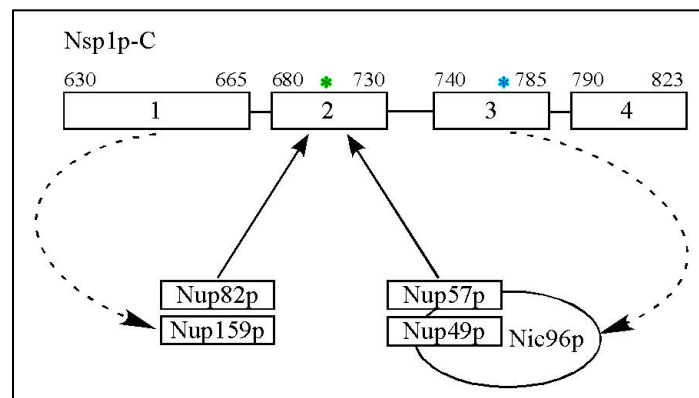


Abb.12: Modell der Interaktionen zwischen Nsp1p-C und Nup82p-Nup159p und Nup57p-Nup49p-Nic96p (nach Bailer *et al.*, 2001)

In grün sind Mutationen in der coiled-coil-Domäne 2 (= *nsp1-ts10A* und *nsp1-ala6*), in blau die Mutationen des *nsp1-SP/ND*-Alleles in der coiled-coil-Domäne 3 angedeutet.

Die beiden Nsp1p-Allele, *nsp1-ts10A* (E706P+L707S; Nehrbass *et al.*, 1993) und *nsp1-ala6* (E701A, D705A, E708A, D712A, E715A, E719A) tragen ausschließlich Mutationen in der coiled-coil-Domäne 2. Die beiden Mutationen des Allels SP/ND (S759P+N770D) liegen dagegen in der coiled-coil-Domäne 3. In der *nsp1-tsΔ4*-Mutante von Nsp1p wurden die Aminosäuren 775-823 entfernt, d.h. bei dieser Mutante fehlt die coiled-coil-Domäne 4 vollständig (Abb. 12).

Abb. 13 zeigt die genetische Beziehung zwischen *nup192-15* und verschiedener *nsp1-ts*-Allele. Die Einzelmutanten *nup192-15* (Abb. 13, 2) und *nsp1-SP/ND* (Abb. 13, 5) wachsen auf 5-FOA-haltigem Medium sowohl bei 23°C als auch bei 30°C ähnlich gut

wie der Wildtypstamm (*Nsp1p-Nup192p*; Abb. 13, 1). Dagegen zeigen die Einzelmutanten *nsp1-ala6* (Abb. 13, 3) und *nsp1-tsΔ4* (Abb. 13, 7) ein im Vergleich zum Wildtypstamm verlangsamtes Wachstum.

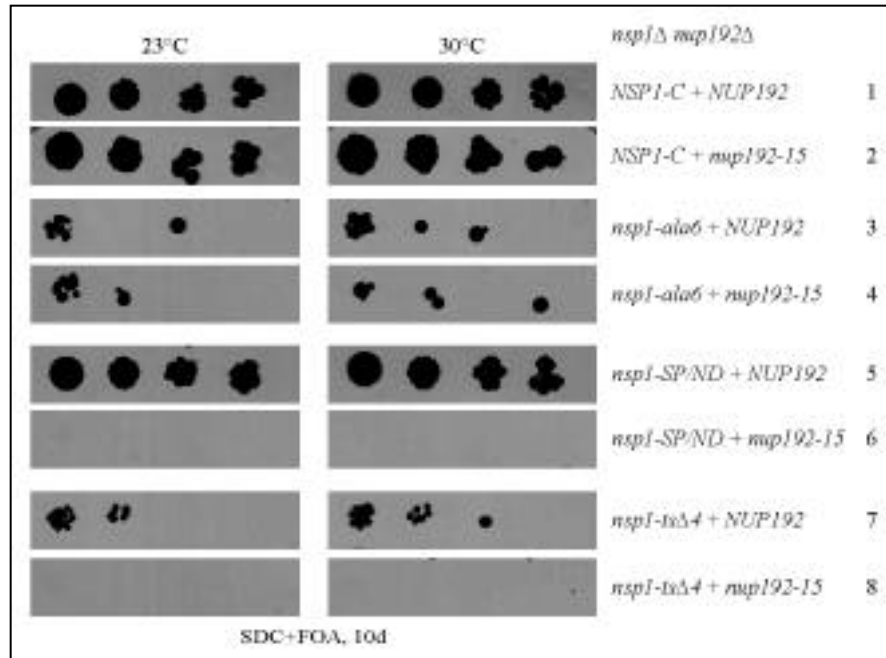


Abb. 13: *nup192-15* ist synthetisch letal mit *nsp1-ts* Allelen, die Mutationen in den coiled-coil-Domänen 3 oder 4 tragen

In einem diploiden *nsp1::KAN/NSP1*-Hefestamm wurde eine Kopie von *NUP192* durch den *HIS3*-Marker ersetzt (siehe Material und Methoden 6.3.). *nsp1::HIS3 nup192::HIS3*-Doppelmutanten wurden mit den folgenden Plasmiden transformiert, so dass die oben angegebenen Kombinationen erhalten werden: pSB-*LEU2-NSP1-C*; pSB-*LEU2-nsp1-ala6*; pSB-*LEU2-nsp1-SP/ND*; pSB-*LEU2-nsp1-tsΔ4*; YCplac22-*TRP1-NUP192-HA*; YCplac22-*TRP1-nup192-15*. Jeweils drei verschiedene Transformanden wurden mittels Wachstumsanalyse untersucht (siehe Material und Methoden 6.7.). Vier Verdünnungen (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000) wurden auf 5'-FOA-haltige Platten getropft und für 10 Tage bei 23°C und 30°C inkubiert.

Wenn das *nup192-15*-Allel mit dem *nsp1-ala6*-Allel, bei dem 6 geladene Aminosäuren (Glutamin- oder Asparaginsäure) durch Alanin in der coiled-coil-Domäne 2 ersetzt sind, kombiniert wird, ändert sich das Zellwachstum im Vergleich zur *nsp1-ala6*-Einzelmutanten nicht wesentlich (Abb. 13, 4). Die beobachtete konditionelle synthetische Letalität zwischen *Nup192p* und *Nsp1p*-Mutationen in der coiled-coil-Domäne 2 könnte durch das Zusammentreffen von einer Reduktion der Porengesamtzahl (*nup192-15*) mit einem Defekt im Kernproteinimport (*nsp1-ts*) zustande kommen. Kombiniert man *nup192-15*-mit *nsp1-ts*-Allelen, die, wie *nsp1-SP/ND* oder *nsp1-tsΔ4*, Mutationen in der

coiled-coil-Domäne 3 oder 4 tragen, kann man kein Zellwachstum beobachten, d.h. diese Kombination ist für die Hefezellen letal (Abb. 13; 6 und 8). Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass ein *nup192*-ts-Allel synthetisch letal mit bestimmten *nsp1*-ts-Allele ist, die Mutationen in den beiden C-terminalen coiled-coil-Domänen von Nsp1p tragen.

Die GLFG-Repeats von Nup49p liegen im nicht-essentiellen N-Terminus, während der essentielle C-Terminus mehrere Heptad-Repeats aufweist, von denen man annimmt, dass sie eine coiled-coil-Domäne ausbilden (Grandi *et al.*, 1995a). Für das verwendete *nup49-313*-Allel mit seinen fünf Punktmutationen im C-Terminus, ist die restriktive Temperatur bei 30°C erreicht, d.h. bei dieser Temperatur sind die Zellen nicht mehr lebensfähig (Abb. 14). Bei 23°C zeigt diese Mutante jedoch, wie das *nup192-15*-Allel, ein gutes Wachstum. Kombiniert man die beiden mutanten Allele *nup192-15* und *nup49-313*, so führt dies bei 23°C zum Tod der Hefezellen (Abb. 14). *NUP192* und *NUP49* interagieren auf genetischer Ebene miteinander. Wie bei *NSP1* scheint auch bei *NUP49* die von den essentiellen Heptad-Repeats gebildete C-terminale coiled-coil-Domäne an der Interaktion mit Nup192p beteiligt zu sein.

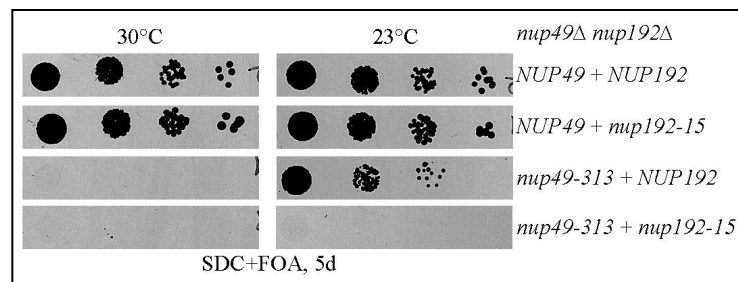


Abb. 14: *nup192-15* ist synthetisch letal mit *nup49-313*, das mehrere Punktmutationen in seiner coiled-coil-Domäne besitzt

nup49::TRP1 nup192::HIS3 + pCH1122-URA3-*NUP49* + pUN100-LEU2-*nup192-15*-Doppelmutanten wurden mit den folgenden Plasmiden transformiert, so dass die oben angegebenen Plasmidkombinationen erhalten wurden: pUN100-LEU2-*NUP49*; pUN100-LEU2-*nup49-313*; pASZ11-ADE2-*NUP192*; pASZ11-ADE2-*nup192-15*. Jeweils drei verschiedene Transformanten wurden mittels Wachstumsanalyse untersucht (siehe Material und Methoden 6.7.). Vier Verdünnungen (1:10; 1:100; 1:1000 und 1:10000) wurden auf 5'-FOA-haltige Platten getropft und für 5 Tage bei 23°C und 30°C inkubiert.

Nsp1p und Nup49p interagieren nicht direkt miteinander, sondern sie binden beide an Nup57p, so dass Nup57p als Organisationszentrum für den Komplex fungiert (Abb. 12; Grandi *et al.*, 1993; Schlaich *et al.*, 1997). Wie Nsp1p und Nup49p besitzt Nup57p in seinem nicht-essentiellen N-Terminus mehrere GLFG-Repeats und in seinem essentiellen

C-Terminus mehrere Heptad-Repeats. Bei dem verwendeten *HIS3::nup57*-Hefestamm ist der mittlere Teil des *NUP57*-Gens durch den *HIS3*-Marker ersetzt. Dies hat zur Folge, dass im mittleren Teil von Nup57p die Aminosäuren 154-299 fehlen, was beim Vergleich mit dem Wildtyp zu einem verlangsamten Wachstum der Zellen bei Temperaturen ab 30°C führt. Im Gegensatz zu Nic96p und Nup49p zeigt Nup57p keine genetische Beziehung zu Nup192p (Abb. 15). Die Doppelmutanten weisen auf 5-FOA-haltigem Medium bei permissiver Temperatur (23°C) ein ähnlich gutes Wachstumsverhalten wie die beiden Einzelmutanten auf.

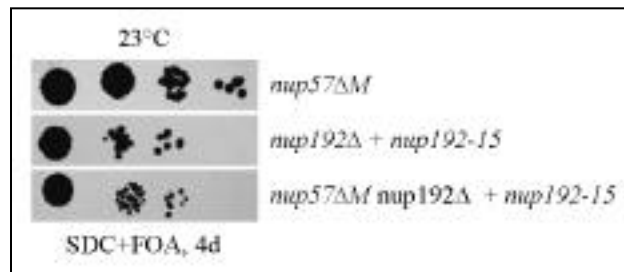


Abb. 15: NUP57 zeigt keine genetische Interaktion mit NUP192

Ein *HIS3::nup57*-Hefestamm, bei dem der mittlere Teil des *NUP57*-Gens durch den *HIS3*-Marker ersetzt ist, wurde mit einem *nup192::HIS3 + YCplac33-URA3-NUP192*-Hefestamm gekreuzt (siehe Material und Methoden 6.4.). Je zwei *nup57ΔM*- und *nup192 +pURA3-NUP192*-Einzelmutanten sowie vier *nup57ΔM nup192 +pURA3-NUP192*-Doppelmutanten wurden mit dem *YCplac22-TRP1-nup192-15*-Plasmid transformiert und jeweils drei verschiedenen Transformanten mittels Wachstumsanalyse untersucht (Material und Methoden 6.7.). Vier Verdünnungen (1:10; 1:100; 1:1000 und 1:10000) wurden auf 5'-FOA-haltige Platten getropft und für 4 Tage bei 23°C inkubiert.

Das keine FG-Repeats enthaltende *Nic96p* und sein Vertebraten-Homolog Nup93 spielen wie Nup192p eine Rolle am Auf- bzw. Zusammenbau des NPCs (Grandi *et al.*, 1997; Gomez-Spinosa *et al.*, 2000). Biochemisch interagiert *Nic96p* mit dem Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Komplex, Nup188p, Pom152p, Nup53p, Mlp2p und mit Nup192p (Grandi *et al.*, 1993; Zabel *et al.*, 1996; Fabre und Hurt, 1997; Kosova *et al.*, 1999; Fahrenkrog *et al.*, 2000b; Kosova *et al.*, 2000). Die biochemische Interaktion zwischen *Nic96p* und Nup192p ist von Hefe bis zu Vertebraten konserviert (Grandi *et al.*, 1997; Miller *et al.*, 2000). Von *Nic96p* sind mehrere *ts*-Allele beschrieben. Die Kombination der *nic96-1*- und des *nup192-15*-Allele in einem Hefestamm führt zwar zu einem langsamerem Wachstum als die beiden Einzelmutanten (Abb. 16), die Zellen wachsen aber dennoch. Vermutlich addieren sich die NPC-Aufbau-Defekte der beiden mutanten Allele, was zu einer deutlichen Einschränkung des Zellwachstums führt. Einem anderen *nic96-ts*-Allel,

dem *nic96 Δ 1/3coiled-coil*-Allel, fehlen auf Proteinebene im N-Terminus ca. 200 Aminosäuren und damit ca. 1/3 der Heptad-Repeats, die wahrscheinlich eine für Protein-Protein-Wechselwirkungen wichtige coiled-coil-Domäne ausbilden. Die Verkürzung dieser coiled-coil Domäne führt im Vergleich zum Wildtyp zu einem langsameren Wachstum (Grandi *et al.*, 1993). Kombiniert man das *nic96 Δ 1/3coiled-coil*-Allel mit dem *nup192-15*-Allel führt dies bei beiden untersuchten Temperaturen (23°C und 30°C) zum Tod der Hefezellen (Abb. 16). Dies bestätigt die schon bekannte physische Interaktion zwischen Nic96p und Nup192p. Das Ergebnis deutet darauf hin, dass die von den Heptad-Repeats gebildete N-terminale coiled-coil-Domäne von Nic96p für die Bindung des ebenfalls Heptad-Repeats enthaltenden Nup192p verantwortlich ist.

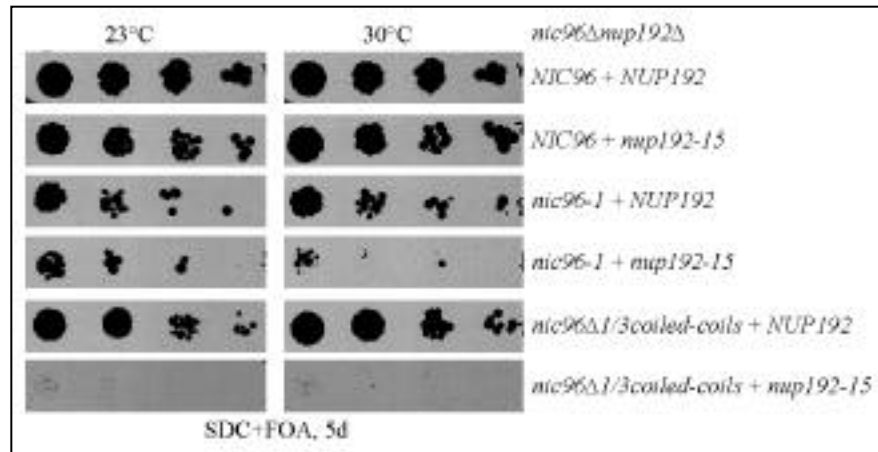


Abb.16: Die *nic96-1*-Mutante, der 1/3 der N-terminalen coiled-coil-Domäne fehlt, ist – im Gegensatz zur *nic96-1*-Mutante – mit *nup192-15* synthetisch letal

nic96::HIS3 nup192::HIS3 + pCH1122-URA3-NIC96 + YCplac22-TRP1-nup192-15-Doppeldeletionen wurden mit den folgenden Plasmiden transformiert, so dass die oben angegebenen Plasmidkombinationen erhalten wurden: *pUN100-LEU2-NIC96*; *pUN100-LEU2-nic96-1*; *pUN100-LEU2-nic96 1/3coiled-coils*; *YCplac22-TRP1-NUP192*; *YCplac22-TRP1-nup192-15*. Jeweils drei verschiedene Transformanden wurden mittels Wachstumsanalyse untersucht (Material und Methoden 6.7.). Vier Verdünnungen (1:10; 1:100; 1:1000 und 1:1000) wurden auf 5' .FOA-haltige Platten getropft und für 5 Tage bei 23°C und 30°C inkubiert.

Der Nsp1p-Nup82p-Nup159p-Komplex und Nup192p

Im zweiten Nsp1p-Komplex aus Nsp1p, Nup82p, Nup159p und Nup116p (DelPriore *et al.*, 1997; Bailer *et al.*, 2000) vermittelt Nup82p die Bindung zwischen Nsp1p und Nup159p (Belgareh *et al.*, 1998; Abb. 13). und ist für die Lokalisierung von Nup159p und Nup116p im Kernporen-komplex verantwortlich (Ho *et al.*, 2000). Sowohl Nup159p als auch Nup82p sind essentiell und interagieren wie die Proteine im Nsp1p-Nup49p-

Nup57p-Nic96p-Komplex über ihre meist C-terminalen coiled-coil-Domänen miteinander (Hurwitz *et al.*, 1998; Belgareh *et al.*, 1998).

Das thermosensitive Allel *nup159-1* verliert durch ein vorzeitiges STOP-Kodon die letzte seiner beiden C-terminalen coiled-coil-Domänen (Gorsch *et al.*, 1995; Belgareh *et al.*, 1998). Kombiniert man dieses *nup159-ts* Allel mit dem *nup192-15* Allel, führt dies im Vergleich zu den Einzelmutanten zu einem deutlich eingeschränkten Wachstum auf 5-FOA-haltigem Medium, aber nicht zum Tod der Doppelmutanten (Abb. 17). Diese bedingte genetische Interaktion könnte auf eine teilweise überlappende Funktion der beiden Proteine hindeuten oder möglicherweise auch auf eine indirekte, durch Nsp1p vermittelte Interaktion.

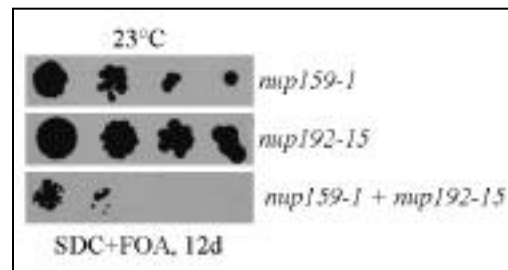


Abb.17: *nup159-1* und *nup192-15* interagieren auf genetischer Ebene nur bedingt miteinander

Ein *nup159::HIS3* + pGL4-URA3-NUP159-Hefestamm wurde mit einem *nup192::HIS3* + YCplac22-TRP1-*nup192-15*-Hefestamm gekreuzt (siehe Material und Methoden 6.4.). Je zwei *nup159::HIS3* + pURA3-NUP159- und *nup192::HIS3* + YCplac22-TRP1-*nup192-15*-Einzel- sowie zwei *nup159::HIS3 nup192::HIS3* + pURA3-NUP159 + YCplac22-TRP1-*nup192-15*-Doppelmutanten wurden mit dem pSD-LEU2-*nup159-1*-Plasmid transformiert und jeweils drei verschiedene Transformanten mittels Wachstumsanalyse untersucht (Material und Methoden 6.7.). Vier Verdünnungen (1:10; 1:100; 1:1000 und 1:10000) wurden auf 5'-FOA-haltige Platten getropft und für 4 Tage bei 23°C inkubiert.

Eine mögliche genetische Interaktion zwischen NUP82 und NUP192 konnte bisher nicht untersucht werden, da durch Kreuzen eines *nup82::HIS3* pRS316-URA3-NUP82-Hefestammes mit einem *nup192::HIS3* Ycplac22-TRP1-*nup192-15*-Hefestamm keine Doppelmutante erhalten wird. Zwar sporulieren die diploiden Hefezellen zu den vier Sporen enthaltenden Tetraden. Von diesen haploiden Sporen wachsen allerdings immer nur zwei und diese tragen ausschließlich die Marker des Nup82-Hefestammes. Aus unbekanntem Gründen geht die *nup192*-Deletion verloren oder das mutante *nup192-15*-Allel kann in dem durch Kreuzung erzeugten genetischen Hintergrund die *nup192*-Deletion nicht mehr komplementieren.

Nup188p und Nup192p

Das nicht-essentielle Heptad-Repeats-haltige Nup188p kommt im Kernporenkomplex in ca. 24 Kopien vor (Rout *et al.*, 2000). Es lokalisiert sowohl auf der nukleären als auch auf der zytoplasmatischen Seite des Kernporenkomplexes (Nehrbass *et al.*, 1996; Rout *et al.*, 2000) und wird für den Aufbau des Diffusionskanals im Kernporenkomplexes sowie für die strukturelle Integrität der Kernhülle benötigt (Nehrbass *et al.*, 1996; Shulga *et al.*, 2000). Nup188p interagiert biochemisch und genetisch mit Nup170p, mit dem integralen Kernporenprotein Pom152p und mit Nic96p (Nehrbass *et al.*, 1996; Fabre und Hurt, 1997).

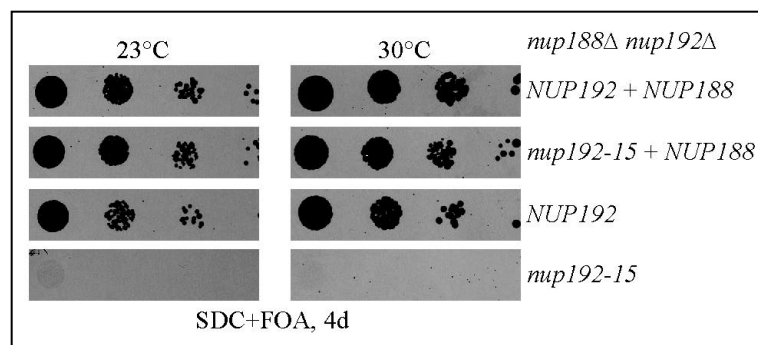


Abb.18: *nup188Δ* und *nup192-15* sind synthetisch letal

nup188::HIS3 nup192::HIS3 + YCplac33-*URA3-NUP192*-Doppeldelationen wurden mit folgenden Plasmiden transformiert, so dass die oben angegebenen Kombinationen erhalten wurden: pUN100-*LEU2-NUP188*; YCplac22-*TRP1-NUP192*; YCplac22-*TRP1-nup192-15*. Jeweils drei verschiedene Transformanten wurden mittels Wachstumsanalyse untersucht (siehe Material und Methoden 6.7.). Vier Verdünnungen (1:10; 1:100; 1:1000 und 1:10000) wurden auf 5'-FOA-haltige Platten getropft und für 4 Tage bei 23°C und 30°C inkubiert.

Die Kombination des thermosensitiven Allels *nup192-15* mit der *nup188*-Nullmutante führt sowohl bei 23°C als auch bei 30°C zum Tod der Hefezellen (Abb. 18). Bei beiden untersuchten Temperaturen (23°C und 30°C) zeigt weder die *nup188*-Nullmutante noch die *nup192-15*-Mutante einen erkennbaren Wachstumsdefekt.

Die beobachtete genetische Beziehung der synthetischen Letalität zwischen Nup192p und Nup188p könnte auf eine biochemische Bindung der beiden Proteine im Kernporenkomplex zurückzuführen sein. Ein Hinweis dafür ist, dass die biochemischen Interaktionen zwischen Nup188p und Nic96p bzw. zwischen Nup192p und Nic96p von Hefe bis Vertebraten konserviert sind (Nehrbass *et al.*, 1996; Grandi *et al.*, 1997; Kosova *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2000). Gegen eine gemeinsame oder überlappende Funktion

von Nup188p und Nup192p spricht, dass es bislang keine Hinweise auf eine Beteiligung des *nup192-15* ts-Allels am Aufbau des Diffusionskanals im NPC (siehe 3.1.2.) oder auf eine Funktion von Nup188p bei der Biogenese des Kernporenkomplexes gibt.

Nup170p und Nup192p

Das nicht-essentielle Nup170p interagiert auf genetischer Ebene mit den Nukleoporinen Nup188p, Pom152p, Nup157p, Nup1p, Nup2p, und Nup82p (Fabre und Hurt, 1997). Biochemisch konnte eine Bindung zwischen Nup170p und Nup53, Nup59p und Kap121p identifiziert werden (Marelli *et al.*, 1998). Nup170p gehört wie Nup188p und Nup192p zu den großen Nukleoporinen, die alle zusammen 25% der NPC-Masse darstellen (Doye und Hurt, 1997). Es lokalisiert symmetrisch auf beiden Seiten des NPCs (Marelli *et al.*, 1998; Rout *et al.*, 2000) und ist ebenso wie Nup188p am Aufbau des Diffusionskanals beteiligt (Shulga *et al.*, 2000). Aus diesen Gründen ist die Frage interessant, ob auch Nup170p wie Nup188p genetisch mit Nup192p interagiert.

In Abb. 19 ist das Ergebnis der Wachstumsanalysen von *nup170Δ*- und *nup192-15*-Einzel- sowie *nup170Δ-nup192-15*-Doppelmutanten dargestellt: Die Doppelmutanten zeigen im Vergleich zu den beiden Einzelmutanten unter den getesteten Bedingungen keinen ausgeprägten Wachstumsdefekt.

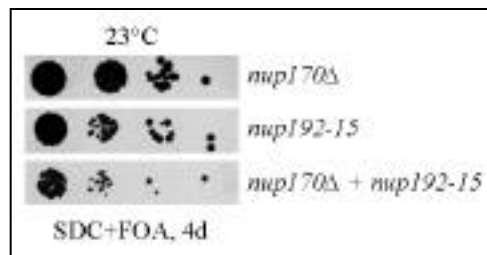


Abb. 19: NUP170 und NUP192 zeigen keine genetischen Interaktion

Je zwei *nup170::HIS3*- und *nup192::HIS3+YCplac33-URA3-NUP192*-Einzelmutanten sowie vier *nup170Δ nup192 +pURA3-NUP192*-Doppelmutanten wurden mit dem YCplac22-*TRP1-nup192-15*-Plasmid transformiert und jeweils drei verschiedenen Transformanden mittels Wachstumsanalyse untersucht (Material und Methoden 6.7.). Vier Verdünnungen (1:10; 1:100; 1:1000 und 1:10000) wurden auf 5'-FOA-haltige Platten getropft und für 4 Tage bei 23°C inkubiert.

Nup1p und Nup192p

Das von der Hefe bis zu Vertebraten konservierte Nukleoporin Nup1p zeigt Ähnlichkeiten mit Nsp1p. Die FXFG-Repeat-Region in Nup1p wird von Antikörpern erkannt, die gegen die FXFG-Region von Nsp1p gerichtet sind (Carmo-Fonseca *et al.*, 1991). Nup1p ist sowohl am mRNA-Export als auch am Kernproteinimport beteiligt (Fabre und Hurt, 1997) und lokalisiert auf der nukleoplasmatischen Seite des Kernporenkomplexes (Rout *et al.*, 2000). Eine physische Interaktion von Nup1p konnte für das Nukleoporin Nup170p (Fabre und Hurt, 1997) und den Kap95p-Srp1p-Heterodimer-Transportrezeptorkomplex (Solsbacher *et al.*, 2000) nachgewiesen werden. Die *nup1Δ-nup192-15*-Doppelmutante zeigt auf 5-FOA-haltigem Medium nach fünf Tagen ein ähnlich gutes Wachstum wie die beiden Einzelmutanten (Abb. 20). Das deutet darauf hin, dass Nup192p und Nup1p vermutlich trotz der Ähnlichkeit von Nup1p und Nsp1p weder physisch noch funktionell miteinander interagieren.

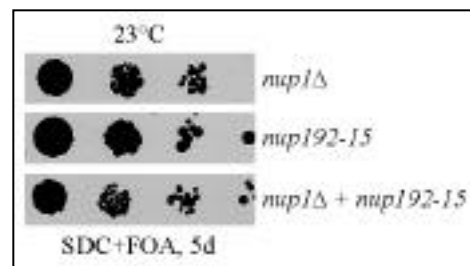


Abb. 20: NUP1 und NUP192 interagieren auf genetischer Ebene nicht miteinander

Je zwei *nup1::HIS3*- und *nup192::HIS3+YCplac33-URA3-NUP192*-Einzelmutanten sowie vier *nup1 nup192 +pURA3-NUP192*-Doppelmutanten wurden mit dem YCplac22-*TRP1-nup192-15*-Plasmid transformiert und jeweils drei verschiedenen Transformanden mittels Wachstumsanalyse untersucht (Material und Methoden 6.7.). Vier Verdünnungen (1:10; 1:100; 1:1000 und 1:10000) wurden auf 5'-FOA-haltige Platten getropft und für 4 Tage bei 23°C inkubiert.

Der Nup84p-Komplex und Nup192p

Der Nup84p-Komplex besteht aus den Proteinen Nup84p, Nup85p, Nup120p, Seh1p, Sec13p, Nup145p-C und Nup133p (Siniosoglou *et al.*, 1996; Siniosoglou *et al.*, 2000; Lutzmann *et al.*, 2001). In Vertebraten existiert ein homologer Komplex, der hNup170-Komplex (Belgareh *et al.*, 2001; siehe 1.4. Seite 26). Der Nup84p-Komplex spielt vermutlich eine Rolle bei der Biogenese des Kernporenkomplexes und der Verteilung der NPCs in der Kernhülle. Ausserdem ist er am nukleozytoplasmatischen Transport (mRNA Export) beteiligt. Aus Hefe aufgereinigt, besitzt er ein Molekulargewicht von 375kDa und zeigt eine definierte Y-förmige Struktur mit einem Durchmesser von ca. 25nm

(Siniosoglou *et al.*, 2000). Wahrscheinlich ist der Nup84p-Komplex Bestandteil peripherer Kernporenstrukturen, wie z.B. des zytoplasmatischen und des nukleären Ringes.

Der C-Terminus des nicht-essentiellen Nup85p ist für den Aufbau des Nup84p-Komplexes und für die Bindung von Nup120p, Nup84p, Sec13p und Nup145p-C essentiell (Siniosoglou *et al.*, 1996; Siniosoglou *et al.*, 2000). Über seinen N-Terminus bindet Nup85p direkt an Seh1p (Siniosoglou *et al.*, 2000). Eine *nup85*-Deletion verursacht schon bei 23°C ein im Vergleich zum Wildtyp deutlich verlangsamtes Wachstum (Siniosoglou *et al.*, 1996). Genetisch interagiert Nup85p außer mit Nup145p und Nup133p noch mit Nup188p, Nup170p, Nsp1p und Nup159p (Fabre und Hurt, 1997). Da die vollständige Deletion von Nup85p schon bei 23°C einen sehr starken Wachstumsdefekt aufweist und die Zellen bei 30°C tot sind (Siniosoglou *et al.*, 1996), wird für die Kreuzung eine N-terminale Deletion von Nup85p verwendet, bei der die AS 82-744 durch den *HIS3*-Marker ersetzt sind. Diese *nup85*-Mutante verursacht einen thermosensitiven Phänotyp mit gutem Wachstum bei 23°C und 30°C. Kombiniert man die N-terminale Deletion in *NUP85* mit dem *nup192-15-ts*-Allel in einem Hefestamm, können die Zellen im angegebenen Zeitraum weder bei 23°C noch bei 30°C wachsen, d.h. sie sind synthetisch letal (Abb. 21A). Dagegen zeigen die beiden Einzelmutanten bei diesen Temperaturen ein ebenso gutes Wachstum wie die Wildtypzellen.

Ebenso wie Nup85p wird das nicht-essentielle Nup120p für den Aufbau des Nup84p-Komplexes benötigt (Siniosoglou *et al.*, 2000). Außerdem sorgt es für die gleichmäßige Verteilung der Kernporen über die Kernhülle, die in einer *nup120*-Nullmutanten in einem dem Nukleolus gegenüber liegenden Punkt aggregieren (Aitchison *et al.*, 1995). Neben Heptad-Repeats enthält Nup120p zwei Leucin-Zipper-Motive, die ebenso wie coiled-coil-Domänen an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind (Aitchison *et al.*, 1995). Außer mit den anderen Mitgliedern des Nup84p-Komplexes interagiert Nup120p biochemisch mit Nup42p, Nup57p, Nup49p und Nup100p (Allen *et al.*, 2000). Da die *nup120*-Nullmutante sowohl bei 23°C als auch bei 30°C einen ausgeprägten Wachstumsphänotyp zeigt (Abb. 21B), konnte die Analyse erst nach längerer Inkubation ausgewertet werden. Die Kombination der *nup120*-Deletion mit dem *nup192-15*-Allel in

einem Hefestamm führt zu einem noch schlechteren Wachstum und bei 30°C zum Tod der Zellen (Abb. 21B).

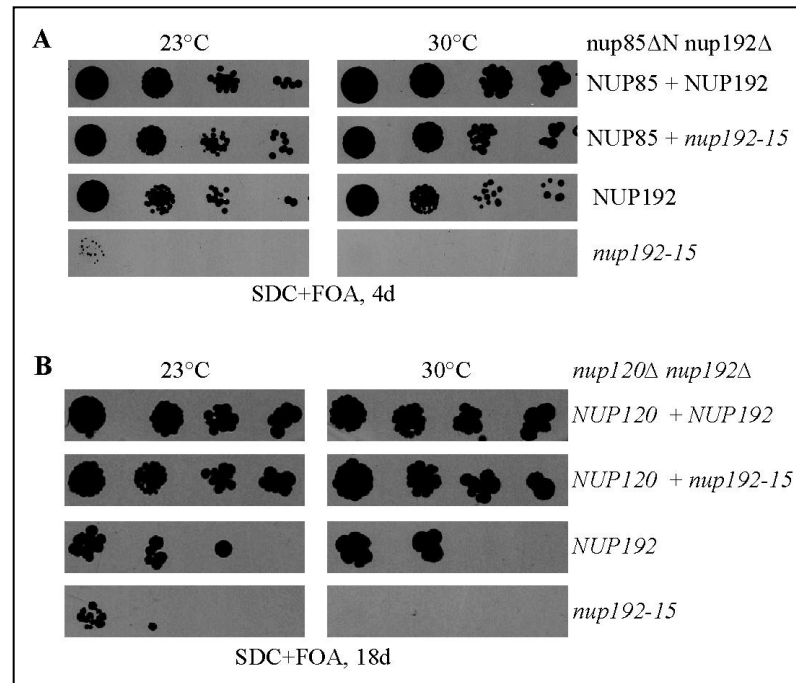


Abb.21: Nup192p interagiert genetisch mit vier der sieben Mitglieder des Nup84p-Komplexes.

Für die Herstellung der Doppelmutanten wurden (A) ein *nup85ΔN*-Hefestamm mit einem *nup192::HIS3* YCplac33-*URA3-NUP192*-Hefestamm, oder (B) ein *nup120::HIS3* pRS316-*URA3-NUP120*-Hefestamm mit einem *nup192::HIS3* YCplac33-*URA3-nup192-15*-Hefestamm mit einem *nup192::HIS3* YCplac33-*URA3-NUP192*-Hefestamm gekreuzt (Material und Methoden 6.4.). Nach Sporulation, Trennung der Sporen und Bestimmen der Markerphänotypen wurden zwei Doppelmutanten mit den folgenden Plasmiden transformiert, so dass die oben angegebenen Kombinationen erhalten wurden: YCplac22-*TRP1-NUP192*; YCplac22-*TRP1-nup192-15*; pUN100-*LEU2-NUP85*; pRS315-*LEU2-NUP120*. Jeweils drei verschiedene Transformanten wurden durch eine Wachstumsanalyse untersucht (siehe Material und Methoden 6.7.). Vier verschiedene Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000 und 1:1000) wurden auf 5'-FOA-haltige Platten getropft und für 4-18 Tage bei 23°C und 30°C inkubiert.

Auch das nicht-essentielle Nukleoporin Nup133p wird für die Verteilung der Kernporenkomplexe über die Kernhülle benötigt (Li *et al.*, 1995; Pemberton *et al.*, 1995). Die *nup133*-Nullmutante ist bei 37°C nicht mehr lebensfähig (Doye *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995; Pemberton *et al.*, 1995). Werden *nup192-15* und eine *nup133*-Deletion in einem Hefestamm kombiniert, so zeigen die Zellen bei allen geprüften Temperaturen ein im Vergleich zu den Einzelmutanten reduziertes Wachstum, sie sind aber lebensfähig (Abb. 22A). Der beobachtete Wachstumsdefekt der *nup133Δ-nup192-15*-Doppelmutante ist mit

dem Defekt einer *nup85ΔN-nup192-15-* (Abb. 21A) oder einer *nup120Δ-nup192-15-* Doppelmutanten (Abb. 21B) vergleichbar.

Nup84p wird weder für das Zellwachstum noch für den Aufbau des Nup84p-Komplexes benötigt (Siniossoglou et al., 1996; Siniossoglou et al., 2000). Die *nup84*-Nullmutante zeigt aber einen thermosensitiven Phänotyp mit einem eingeschränkten Wachstum (Siniossoglou et al., 1996; Abb. 22B). Der deutlich ausgeprägte Wachstumsdefekt der *nup84*-Deletion wird zusammen mit einer *nup192-15*-Mutante verstärkt und resultiert in einer sogenannten konditionalen synthetischen Letalität. D.h. die Doppelmutanten wachsen bei 23°C noch, während bei 30°C kein Zellwachstum beobachtet wird.

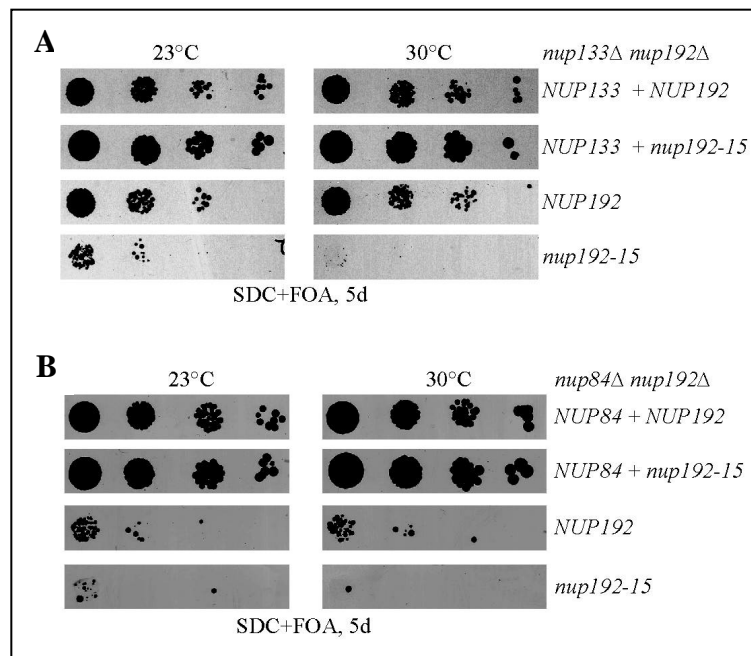


Abb.22: Nup192p interagiert genetisch mit vier der sieben Mitglieder des Nup84p-Komplexes.

Für die Herstellung der Doppelmutanten wurden (A) ein *nup133::HIS3*-Hefestamm-, oder (B) *nup84::HIS3 nup192::HIS3 + pHT4467-URA3-NUP84*-Hefestamm mit einem *nup192::HIS3* YCplac33-*URA3-NUP192*-Hefestamm gekreuzt (Material und Methoden 6.4.).

Nach Sporulation, Trennung der Sporen und Bestimmen der Markerphänotypen wurden zwei Doppelmutanten mit den folgenden Plasmiden transformiert, so dass die oben angegebenen Kombinationen erhalten wurden: pUN100-*LEU2-NUP84*; pUN100-*LEU2-NUP133*; YCplac22-*TRP1-NUP192*; YCplac22-*TRP1-nup192-15*. Jeweils drei verschiedene Transformanten wurden durch eine Wachstumsanalyse untersucht (siehe Material und Methoden 6.7.). Vier verschiedene Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000 und 1:10000) wurden auf 5'-FOA-haltige Platten getropft und für 4-18 Tage bei 23°C und 30°C inkubiert.

Nup192p interagiert genetisch nicht mit allen Mitgliedern des Nup84p-Komplexes. Die beiden *seh1 nup192-15* und *nup145 NRM nup192-15* Doppelmutanten zeigen ein ähnlich gutes Wachstum wie die Einzelmutanten (Daten nicht gezeigt), wie in Abb.18 für Nup170p bzw. in Abb.19 für Nup1p dargestellt ist. Aufgrund seiner hauptsächlichen Funktion im vesikulären Transport zwischen ER und Golgi als Bestandteil der COPI-Vesikel wurde Sec13p nicht auf mögliche genetische Interaktionen mit Nup192p untersucht. Die meisten *sec13-ts* Allele weisen pleiotrope Phänotypen mit Defekten sowohl im Kernporenkomplex als auch im vesikulären Transport auf.

Fasst man die vorgestellten und in Tabelle III dargestellten Ergebnisse zusammen, zeigt Nup192p eine genetische Interaktion zu den Nukleoporinen Nsp1p, Nup49p, Nic96p, Nup188p, Nup159p, Nup84p, Nup85p, Nup120p und Nup133p. Alle anderen getesteten Nukleoporin-Mutanten zeigen keine genetische Beziehung zu Nup192p.

Die Bedeutung der gefundenen synthetischen Letalität muss für jeden einzelnen Fall untersucht werden. Die Durchführung einer komplementären biochemischen Analyse von Nukleoporin-Komplexen, in denen ein bestimmtes Nukleoporin vorhanden ist, ist ein Weg, diese Aufgabenstellung zu lösen. Dies ist wichtig für das Verständnis erstens, wie Kernporenproteine physisch miteinander interagieren, zweitens, wie sie sich in höhergeordneten Komplexen anordnen und drittens, wie sie schließlich in NPCs eingebaut werden (Doye und Hurt, 1995).

Tabelle III – genetische Interaktionen mit Nup192p

Lokalisierung (nach Rout et al., 2000)	Wachstumsdefekt der “nup192-15 nupx”-Doppelmutanten im Vergleich zu den Einzelmutanten
zytoplasmatisch	
Nup159p	stark eingeschränktes Wachstum auf SDC+FOA
Nup82p	nicht getestet
Nup42p	kein Defekt auf SDC+FOA oder YPD, 23°C/30°C
Nup116p	kein Defekt auf SDC+FOA oder YPD, 23°C/30°C
Nup100p	kein Defekt auf SDC+FOA oder YPD, 23°C/30°C
symmetrisch	
Nsp1p	synthetische Letalität (nsp1-ts ⁴ ; nsp1-SP/ND)
Nup49p	synthetische Letalität (nup49-313; nup49-316)
Nup57p	kein Defekt auf SDC+FOA oder YPD, 23°C/30°C
Nic96p	synthetische Letalität (nic96 ^{1/3} coiled-coils)
Nup84p	stark eingeschränktes Wachstum auf SDC+FOA und YPD
Nup85p	stark eingeschränktes Wachstum auf SDC+FOA, 23°C und synthetische Letalität bei 30°C
Nup145p-C	kein Defekt auf SDC+FOA oder YPD, 23°C/30°C
Nup120p	stark eingeschränktes Wachstum auf SDC+FOA, 23°C und synthetische Letalität bei 30°C
Seh1p	kein Defekt auf SDC+FOA oder YPD, 23°C/30°C
Sec13p	nicht getestet
Nup133p	stark eingeschränktes Wachstum auf SDC+FOA, 23°C und synthetische Letalität bei 30°C
Pom152p	kein Defekt auf SDC+FOA oder YPD, 23°C
Nup188p	synthetische Letalität (nup188 ¹)
Nup170p	kein Defekt auf SDC+FOA oder YPD, 23°C/30°C
Nup53p	kein Defekt auf SDC+FOA oder YPD, 23°C/30°C
Nup59p	kein Defekt auf SDC+FOA oder YPD, 23°C/30°C
Gle2p	kein Defekt auf SDC+FOA, aber langsames Wachstum auf YPD, 23°C/30°C
nukleär	
Nup1p	kein Defekt auf SDC+FOA, aber langsames Wachstum auf YPD, 23°C/30°C
Nup2p	kein Defekt auf SDC+FOA oder YPD, 23°C/30°C
Mlp1p	kein Defekt auf SDC+FOA oder YPD, 23°C/30°C
Mlp2p	kein Defekt auf SDC+FOA oder YPD, 23°C/30°C
Yrb2p	kein Defekt auf SDC+FOA oder YPD, 23°C/30°C

4.4. Biochemische Isolierung von Nup192p aus *S. cerevisiae*

Interaktionspartner eines Proteins können durch biochemische Affinitätschromatographie des Proteins über den ProteinA-Marker aus einem Hefezellen-Lysat schnell und direkt identifiziert werden. Durch diese Methode ist es möglich Proteine zu finden, die direkt an das untersuchte Protein binden. Deshalb wurde Nup192p an seinem C-Terminus mit einer "TEV-Protease-Schnittstelle-ProteinA-Marker"-Kassette auf einem ARS-CEN-Plasmid fusioniert. ARS-CEN-Plasmide kommen in 1 bis 3 Kopien pro Zellen vor.

Nup192p und mit ihm interagierende Proteine werden über den ProteinA-Marker mit Hilfe einer IgG-Sepharose-Matrix von anderen löslichen Zellbestandteilen eines Hefeextraktes getrennt. Von dieser Matrix können Nup192p und gebundene Proteine durch Inkubation mit Protease freigesetzt werden. Die auf diese Weise isolierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie-Blau gefärbt. Das Ergebnis einer solchen affinitätschromatographischen Aufreinigung zeigt Abb. 23. Bei einigen der unterhalb der Nup192p-Hauptbande liegenden Banden handelt es sich um Abbauprodukte von Nup192p (Abb. 23: *). Die Identifizierung der Proteine von einigen der im Coomassie-Gel sichtbaren Banden erfolgte durch eine massenspektrometrische Analyse. Bei einigen der so identifizierten Proteine handelt es sich entweder um Hitzeschock-Proteine (HS), wie z.B. Hsc82p, Hsp70p, Ssa1p, Ssa2p, Ssb1p und Ssb2p oder um ribosomale Proteine (RP), wie Rpl3p. Bei den anderen Proteinbanden handelt es sich um die Fettsäuresynthetase (Fas1p und Fas2p) (1), eine Tetrahydrofolatdehydrogenase (Ade3p) (2), die Pyruvatkinase (Cdc19p) (4) und die beiden Translationselongationsfaktoren eEF2 (3) und eEF1 (5). Die meisten identifizierten Proteine stellen zytoplasmatische Faktoren dar, die bisher nicht mit dem Kernporenkomplex oder seiner Funktion in Zusammenhang gebracht wurden. Außerdem sind einige davon, wie z.B. die ribosomalen Proteine und die Hitzeschockproteine, auch häufig in anderen Aufreinigungen, von anderen nicht am Kernporenkomplex beteiligten Proteinen, zu finden. Vermutlich interagieren diese Proteine mit der IgG-Sepharose-Matrix bzw. mit dem ProteinA-Marker und lösen sich während der Inkubation mit der Protease wieder von ihrem Bindungspartner. Es können in einem Nup192p-Hefe-Eluat mittels

Massenspektrometrie keine Proteine gefunden werden, die auf eine spezifische Bindung zu Nup192p hinweisen.

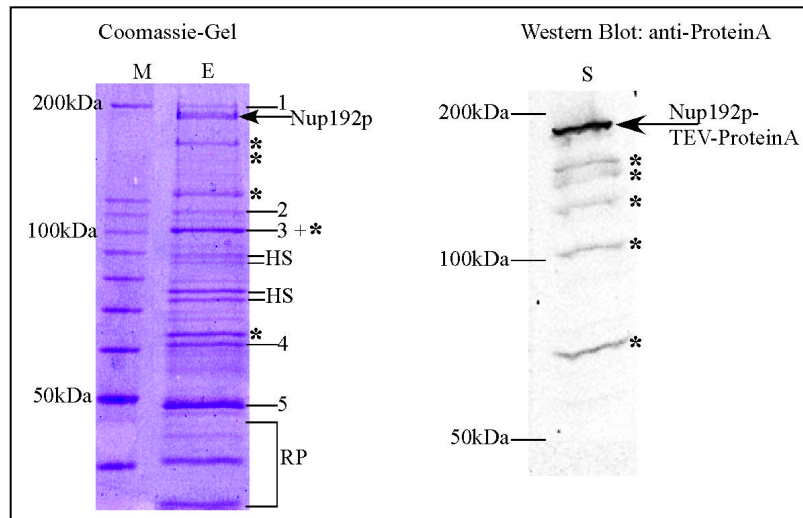


Abb.23: Durch affinitätschromatographische Aufreinigung von Nup192p können keine spezifischen Interaktionspartner identifiziert werden.

Ein Fusionsprotein zwischen Nup192p und dem ProteinA-Marker, durch eine Protease-Schnittstelle getrennt, wird aus einem Hefelysats aufgereinigt. Die Proteine im Nup192p-Eluat (E) werden über ein 8%-PA-Gel aufgetrennt und mit Commassie Blau angefärbt.

(* = Nup192p-Abbauprodukte; HS = Hitzeschockproteine; RP = ribosomale Proteine; 1 = Fas1p und Fas2p; 2 = Ade3p; 3 = eEf2; 4 = Cdc19p; 5 = eEF1 ; M = Proteinmarker).

Um die Expression von Nup192p-TEV-ProteinA zu überprüfen und um mögliche Abbaubanden des Fusionsproteins zu identifizieren, werden die löslichen Bestandteile des Hefelysats (S) mittels Western Blot Analyse untersucht. (* = Nup192p-Abbauprodukte).

4.4.1. Nup192p kann für weitere biochemische Studien aus Hefe isoliert werden

Um die Ausbeute des aus Hefe isolierten Nup192p zu steigern, um so möglicherweise spezifische Interaktionspartner von Nup192p zu identifizieren, wurde das Proteinmarkierte Nup192p überproduziert. Dazu wurde eine Gruppe von Plasmiden in Hefe *S. cerevisiae* verwendet, die in mehr als 3 Kopien pro Zelle vorkommen. Diese Plasmide basieren auf dem in Hefe natürlicherweise vorkommenden sogenannten *2-mikron*-Plasmid. Es wurde deshalb ein mit dem ProteinA-Marker und einer Protease-Schnittstelle fusioniertes Nup192p auf ein *2-mikron*-Plasmid umklont und dieses anschließend in *nup192::HIS3*-Hefezellen transformiert. Die durch das *2-mikron*-Plasmid verursachte geringe Überproduktion von Nup192p beeinträchtigt das Zellwachstum nicht (nicht gezeigte Daten). Die Affinitätschromatographie von Nup192p-TEV-ProteinA aus diesen Zellen mit anschließender Analyse des durch Protease-Inkubation erhaltenen Nup192p-

Eluats auf einem SDS-Polyacrylamid-Gel (Abb. 24) zeigt, dass mit dieser Methode eine deutlich größere Menge Nup192p aus Hefezellen isoliert werden kann als mit dem *ARS-CEN*-Konstrukt.

Die Western-Blot-Analyse von Nup192p-ProteinA lässt vermuten (Daten nicht gezeigt), dass es sich bei den unterhalb von Nup192p laufenden Banden (*) um Abbauprodukte als um spezifische, mit Nup192p interagierende Proteine handelt. Nup192p kann auf diese Weise in größerer Menge und mit weniger unspezifisch gebundenen Proteinen aus Hefe aufgereinigt werden. Allerdings konnten dadurch ebenfalls keine neuen spezifischen Interaktionspartner von Nup192p identifiziert werden.

4.4.2. Nup192p – ein Multimer ?

Das aus Hefe gereinigte Nup192p eignet sich, um die Struktur von Nup192p mittels Elektronenmikroskopie zu untersuchen. Um Nup192p für die EM-Analyse weiter zu reinigen, wurde mit einem Nup192p-Eluat eine Gelfiltrationschromatographie durchgeführt. Die für die Gelfiltrationschromatographie von Nup192p verwendete Superose6-Säule trennt Moleküle in einem Molekulargewichtsbereich von 5 – 5000 kDa. 500 µl eines Nup192p-Eluates werden auf die Säule gegeben. Da dieses 500 µl Eluat durch eine Säule mit einem Volumen von 24 ml läuft, erfolgt eine ca. 50-fache Verdünnung der aufgetragenen Proteine. Um die eluierten Proteine durch Coomassie-Blau Färbung auf einem SDS-PA-Gel sichtbar zu machen, werden die von der Säule eluierten Fraktionen durch TCA-Fällung konzentriert.

Nup192p eluiert hauptsächlich in den Fraktionen 18 bis 25 (Abb. 24). Da globuläre Proteine von 670 kDa in den Fraktionen 22 und 23 eluieren, kann die molekulare Masse des aus Hefe gereinigten Nup192p auf 500 - 900 kDa geschätzt werden. In den Nup192p-Fraktionen kann es sich also nicht um ein einzelnes Nup192p-Molekül mit einem Molekulargewicht von 192 kDa handeln. Dagegen besitzt ein aus vier Nup192p-Molekülen bestehender Komplex theoretisch ein Molekulargewicht von ca. 800 kDa. Somit kann vermutet werden, dass es sich bei dem aus Hefe isolierten Nup192p um ein Nup192p-Homotetramer oder um ein elongiertes Nup192p-Monomer handelt.

Weiterführende Studien beschäftigen sich mit der Analyse der elektronenmikroskopischen Struktur des Nup192p-Multimers und mit der Analyse aus wie vielen

Nup192p-Proteinen ein mögliches Multimer besteht. Erste Versuche, die Struktur von Nup192p im Elektronenmikroskop mittels „negative stain“ zu bestimmen, verliefen negativ. Die Ursachen dafür könnten sein, dass Nup192p möglicherweise in Lösung denaturiert könnte oder nach kurzer Zeit aggregiert und unlöslich wird. Eventuell lässt sich Nup192p aus unbekanntem Gründen nicht auf dem Gitter fixieren oder die gewählte Methode der „negative stain“-EM ist nicht die richtige Methode zur Bestimmung der Nup192p-Struktur.

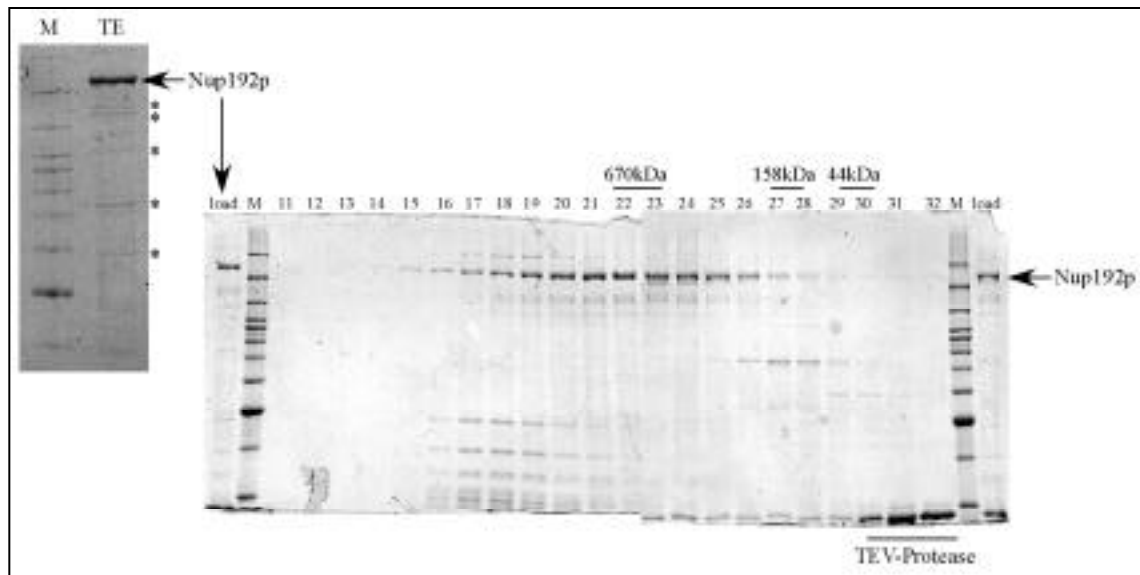


Abb.24: Nup192p kann ohne Interaktionspartner aus Hefe isoliert werden

Ein Fusionsprotein aus Nup192p und dem durch eine TEV-Protease-Schnittstelle getrennten ProteinA-Marker wird in Hefe überproduziert. Nup192p wird mittels Affinitätschromatographie und anschließender Protease-Inkubation vom ProteinA-Marker getrennt und so isoliert. Ein Teil des erhaltenen Nup192p-Eluat wird über ein 8% SDS-PA-Gel aufgetrennt und vorhandene Proteine mit Coomassie-Blau angefärbt. Die Position von Nup192p (Pfeil) und einigen möglichen Abbauprodukten von Nup192p (*) sind markiert. Das Nup192p-Eluat wurde durch eine Gelfiltrationschromatographie über eine Superose6-Säule weiter aufgereinigt. Nach Konzentrierung der Fraktionen 11 bis 32 wurden vorhandene Proteine auf einem 8%-SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und mit Coomassie-Blau angefärbt. Über dem mit Coomassie angefärbten Gel sind die Positionen der Proteine eines Gelfiltrationsstandards angegeben. In Fraktionen 31 und 32 eluiert die 15kDa große TEV-Protease.

(load = auf die Superose6-Säule aufgetragene Nup192p-Probe; M= Protein-10kDa-Leiter).

4.5. Biochemische Bestätigung genetischer Interaktionen

Da durch die Affinitätschromatographie von Nup192p aus Hefezelllysaten keine spezifischen Bindungspartner identifiziert werden konnten, wurden die genetisch mit Nup192p interagierenden Nukleoporine mittels Affinitätschromatographie direkt auf eine physische Interaktion mit Nup192p untersucht. Damit kann die Frage beantwortet werden, ob die im Abschnitt 4.3.2. beschriebenen genetischen Beziehungen zwischen Nup192p und anderen Nukleoporinen eine direkte Bindung widerspiegeln. Durch die biochemische Affinitätschromatographie eines gegebenen Proteins aus einem Hefezellen-Lysat über einen Affinitätsmarker können direkt oder indirekt mit diesem Protein interagierende Faktoren identifiziert werden.

Für die biochemische Untersuchung werden Hefestämme verwendet, in denen die 11 zu untersuchenden Nukleoporine eine genomisch integrierte „ProteinA-Protease (TEV) Schnittstelle-CPB (Calmodulin-bindendes Protein)“-Kassette an ihrem C-Terminus tragen. Bei diesen Hefestämmen wird, wie in Material und Methoden 6.12. beschrieben, eine doppelte affinitätschromatographische Aufreinigung (= Tandemaufreinigung = TAP) der Nukleoporine durchgeführt. Der Tap-Marker besteht aus einer Kombination des ProteinA-Markers und dem durch eine Protease-Schnittstelle getrennten CBP-Marker (CBP = Calmodulin-bindendes Protein). Durch die zweimalige Aufreinigung werden unspezifisch an das Säulenmaterial bindende Proteine entfernt. Dies führt dazu, dass nach der zweiten Affinitätschromatographie sich neben dem markierten Nukleoporin überwiegend spezifischen Bindungspartner auf der Säule befinden.

Da gegen Nup192p gerichtete Antikörper nicht zur Verfügung stehen, wird Nup192p in allen untersuchten Nukleoporin-TAP-Hefestämmen am C-Terminus mit dem HA-Epitop, gegen das kommerzielle Antikörper erhältlich sind, markiert (Material und Methoden, 6.10.).

Als Negativkontrolle dient die Affinitätschromatographie von Nup1p: Da Nup192p und Nup1p keine genetische Beziehung zueinander aufweisen, könnte man erwarten, dass Nup192p biochemisch nicht an Nup1p bindet. Bei der Nup1p-Aufreinigung finden sich im Eluat die Proteine Nup1p-CBP, Kap95p und Srp1p/Kap60p (Abb. 25). Wie erwartet, finden sich im Nup1p-Eluat kaum nachweisbare Mengen von Nup192p-HA. Dieses

Ergebnis zeigt, dass Nup192p eine unspezifische Bindung mit den verwendeten Säulenmatrices oder mit anderen Proteinen eingeht.

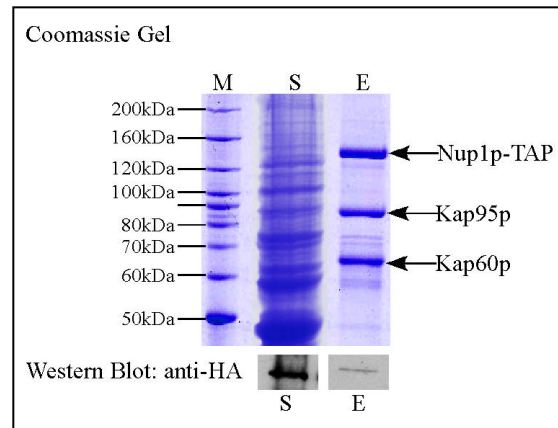


Abb.25: Nup192p co-reinigt nicht mit Nup1p

In Übereinstimmung mit dem Fehlen einer Interaktion zwischen Nup192p und Nup1 auf genetischer Ebene, kann nur eine unspezifische physische Interaktion nachgewiesen werden.

Nup1p wurde C-terminal mit einem ProteinA-CPB-Marker versehen und mittels doppelter Affinitätschromatographie aus Hefezellen isoliert. Dabei werden neben Nup1p auch alle während der Aufreinigung stabil mit Nup1p interagierenden Proteine mitgereinigt. Die einzelnen Proteine werden einem auf 8%-PA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt.

Zellhomogenat (S) und Calmodulin-Eluat (E) werden mittels Western-Blot-Analyse mit Hilfe von anti-HA-Antikörpern auf die Anwesenheit von Nup192p-HA untersucht. Das Antikörpersignal wird durch chemische Lumineszenz (1min) sichtbar gemacht. M = Proteinmarker.

Nup192p und der Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Nic96p-Komplex:

Da Nup192p auf genetischer Ebene mit fast allen Mitgliedern des Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Nic96p-Komplexes interagiert (Abb. 13; Abb. 14; Abb. 16), bindet Nup192p möglicherweise direkt an diesen Komplex.

Es wird erwartet, dass Nup192p im Eluat einer biochemischen Aufreinigung von Nsp1p zusammen mit den Bestandteilen der beiden Nsp1p-Komplexe (Abb. 26) vorkommt. Tatsächlich kann Nup192p über den HA-Antikörper spezifisch im Nsp1p-Eluat nachgewiesen werden (Abb. 26). Dabei bindet Nup192p entweder direkt an Nsp1p oder es bindet an ein anderes Mitglied des Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Nic96p-Komplexes (siehe unten).

Führt man die affinitätschromatographische Reinigung von Nup49p-TAP aus Hefe durch, so sind in dem Nup49p-Eluat alle anderen Mitglieder des Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Nic96p-Komplexes zu finden (Abb. 26). Wie im Fall des Nsp1p-Eluates kann auch im Nup49p-Eluat Nup192p mit Hilfe des HA-Epitops identifiziert werden.

Sowohl für Nsp1p als auch für Nup49p lässt sich demnach die genetische Interaktion mit Nup192p auf eine physische Interaktion zurückführen.

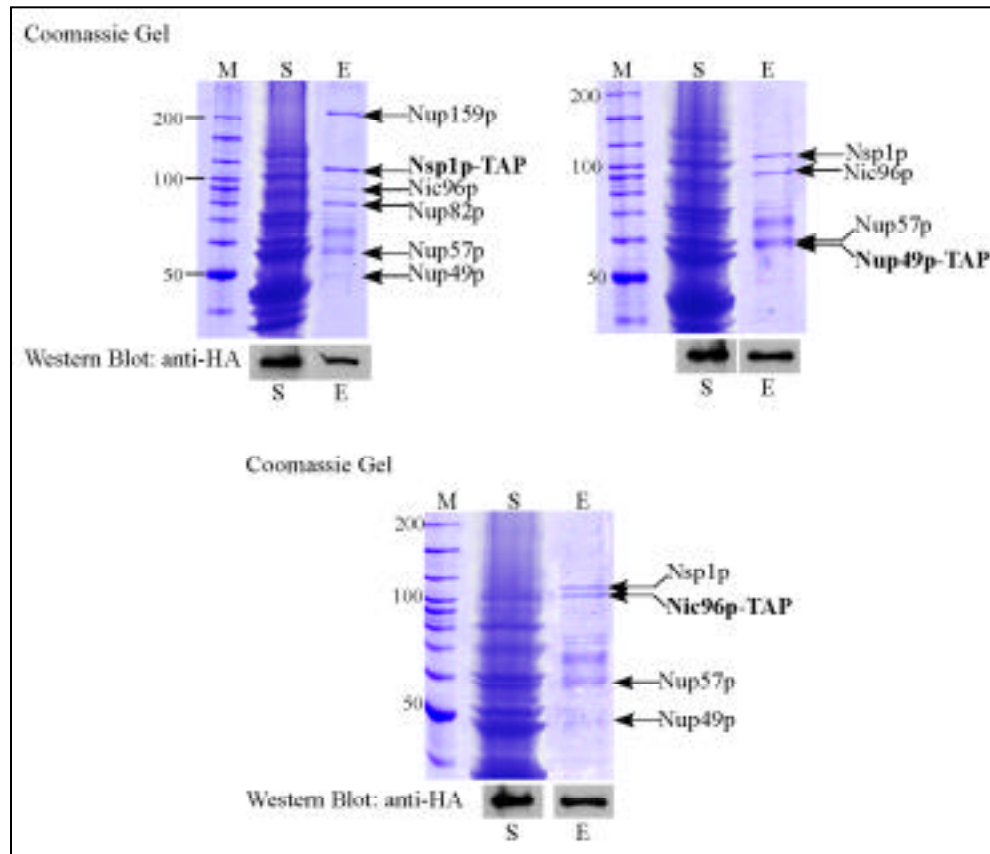


Abb.26: Nup192p interagiert auch auf biochemischer Ebene mit Nsp1p, Nup49p und Nic96p. Die verschiedenen Nukleoporine wurden C-terminal mit einem ProteinA-TEV-CBP-Marker versehen und mittels doppelter Affinitätschromatographie aus Hefezellen isoliert. Dabei werden mit den markierten Nukleoporinen auch alle mit ihnen während der Aufreinigung stabil interagierenden Proteine mitgereinigt. Die Proteine in den einzelnen Calmodulin-Eluaten werden auf 8% PA-Gelen aufgetrennt und mit Coomassie Blau angefärbt. Zellhomogenat (S) und Calmodulin-Eluat (E) werden mittels Western-Blot-Analyse mit der Hilfe von anti-HA-Antikörpern auf die Anwesenheit von Nup192p-HA untersucht. Das Antikörpersignal wird durch chemische Lumineszenz (1min) sichtbar gemacht. M = Proteinmarker.

Einen weiteren Hinweis für die direkte Bindung von Nup192p an den Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Nic96p-Komplex liefert die von Kosova *et al.* (1999) nachgewiesene schwache biochemische Interaktion zwischen Nup192p und Nic96p. Aus diesem Grund dient die Nic96p-Affinitätschromatographie als Positivkontrolle; mit ihr wird eine schon bekannte spezifische biochemische Bindung von Nup192p an ein Nukleoporin bestätigt. Abb. 26 zeigt u.a., dass zusammen mit Nic96p auch Nsp1p und Nup57p und Nup49p isoliert werden können. Über den HA-Epitop kann Nup192p in diesem Nic96p-Eluat, wie

erwartet, nachgewiesen werden. Ein möglicher Grund dafür, dass Nup192p bisher zwar durch Western-Blot-Analyse, nicht aber auf einem Coomassie-Gel zu identifizieren ist, könnte sein, dass die Interaktionen von Nup192p mit anderen Nukleoporinen im NPC durch schwache chemische Bindungen vermittelt wird, die in der kompakten NPC-Struktur ausreichen, während der Zellyse jedoch teilweise zerstört werden.

Nup192p und der Nup82p-Komplex:

Im Folgenden soll untersucht werden, ob Nup192p außer mit dem Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Nic96p-Komplex biochemisch auch mit dem zweiten Nukleoporin-Komplex an dem Nsp1p beteiligt ist interagiert.

Das Eluat einer Aufreinigung von TAP-fusioniertem Nup82p aus Hefe enthält neben Nup82p auch alle anderen Mitglieder des Nsp1p-Nup82p-Nup159p-Nup116p-Komplexes (Abb. 27). Über das HA-Epitop kann eine geringe Nup192p-Menge im Nup82p-Eluat identifiziert werden. Die im Vergleich zu einem Nic96p-Eluat geringere Nup192p-Menge im Nup82p-Eluat lässt vermuten, dass die Bindung zwischen Nup82p und Nup192p indirekt ist und über ein anderes Mitglied des Nup82p-Komplexes vermittelt wird. Es kann aber auch möglich sein, dass Nup192p im Kernporenkomplex mit geringerer Affinität direkt an Nup82p bindet, so dass Nup192p, ähnlich wie Nsp1p, in zwei Komplexen vorkäme.

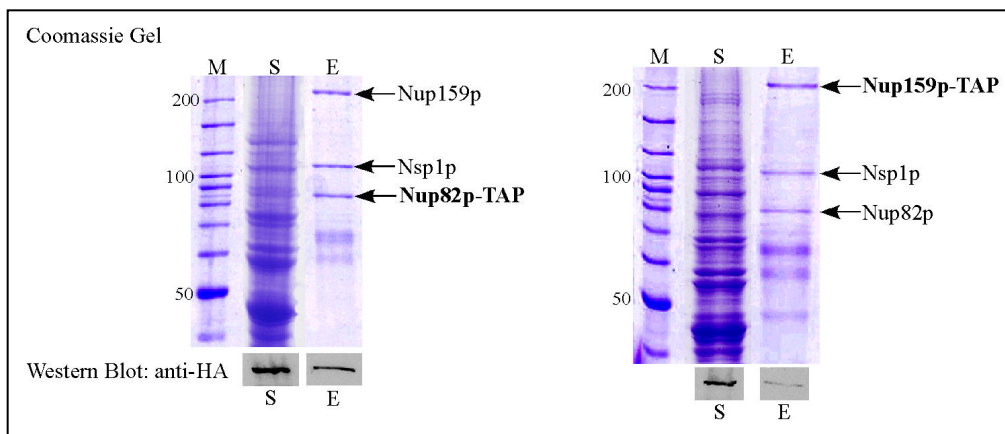


Abb.27: Nup192p interagiert auf biochemischer Ebene schwach mit Nup82p und mit Nup159p.

Nup82p und Nup159p werden C-terminal mit einem ProteinA-CBP-Marker versehen und mittels doppelter Affinitätschromatographie aus Hefezellen isoliert. Dabei werden mit den markierten Nukleoporinen auch alle während der Aufreinigung stabil mit ihnen interagierende Proteine mitgereinigt. Die Proteine in den Calmodulin-Eluaten werden auf 8% PA-Gelen aufgetrennt und mit Coomassie Blau angefärbt. Zellhomogenat (S) und Calmodulin-Eluat (E) werden mittels Western Blot Analyse mit der Hilfe von anti-HA-Antikörpern auf die Anwesenheit von Nup192p-HA untersucht. Das Anti-körpersignal wird durch chemische Lumineszenz (1min) sichtbar gemacht. M = Proteinmarker.

Wird Nup159p aus Hefe aufgereinigt, so isoliert man neben Nup159p die anderen Mitgliedern des Nup82p-Komplexes (Abb. 27). Mit dem HA-Antikörper kann im Nup159p-Eluat ebenfalls eine geringe Menge von Nup192p nachgewiesen werden, die auf eine indirekte, durch Nsp1p vermittelte Bindung von Nup192p an den Nup82p-Komplex hindeuten könnte.

Nup192p und Nup188p:

Aufgrund der starken genetischen Interaktion (Abb. 20) von Nup192p und Nup188p scheint eine physische Interaktion, wie für Nup192p und Nup49p bzw. Nic96p oben gezeigt, wahrscheinlich.

In dem in Abb. 28 dargestellten Nup188p-Eluat sind, wie in einem Nup192p-Eluat (Abb. 23 und Abb. 24), keine spezifisch an Nup188p bindenden Proteine zu erkennen. Aber mit Hilfe der HA-Antikörper kann Nup192p im Nup188p-Eluat nachgewiesen werden. Das bedeutet, dass Nup192p und Nup188p nicht nur auf genetischer, sondern auch auf physischer Ebene miteinander interagieren. Die synthetischen Letalitäten zwischen *nup192-15-* und *nsp1-ts-*, *nup49-ts-*, *nic96-ts-* bzw. *nup188Δ*-Mutanten können auf direkte biochemische Bindungen zurückgeführt werden. Das bedeutet, dass Nup192p sowohl mit dem Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Nic96p-Komplex als auch mit Nup188p physisch interagieren kann und dass Nup192p im Kernporenkomplex direkter Nachbarn vom Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Nic96p-Komplex und von Nup188p sein könnte.

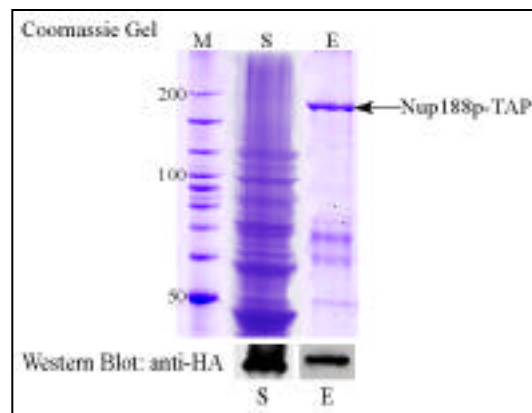


Abb.28: Nup192p bindet an Nup188p.

Die synthetische Letalität zwischen *nup192-15* und *nup188Δ* kann auf eine biochemische Interaktion zurückgeführt werden.

Nup188p wurde C-terminal mit einem ProteinA-CBP-Marker versehen und mittels doppelter Affinitätschromatographie aus Hefezellen isoliert. Dabei werden neben Nup188p auch alle während der Aufreinigung stabil mit Nup188p interagierenden Proteine mitgereinigt. Die einzelnen Proteine werden auf einem 8%-PA-Gel aufgetrennt und mit Coomassie-Blau angefärbt. Zellhomogenat (S) und Calmodulin-Eluat (E) werden mittels Western-Blot-Analyse mit Hilfe von anti-HA-Antikörpern auf die Anwesenheit von Nup192p-HA untersucht. Das Antikörpersignal wird durch chemische Lumineszenz (1min) sichtbar gemacht. M = Proteinmarker.

Nup192p und der Nup84p-Komplex:

Vier von sieben Mitgliedern des Nup84p-Komplexes interagieren auf genetischer Ebene mit Nup192p (Abb. 21 und Abb.22). Dies könnte einerseits bedeuten, dass Nup192p durch Interaktionen mit mehreren Bestandteilen gleichzeitig an den Nup84p-Komplex bindet. Andererseits ist aber auch denkbar, dass Nup192p und der Nup84p-Komplex eine ähnliche Funktion im Kernporenkomplex aufweisen. Wird aus Hefe mittels Affinitätschromatographie Nup84p, Nup85p und Nup120p isoliert, so werden in den jeweiligen Eluaten fast alle Mitglieder des Nup84p-Komplexes gefunden (Abb. 29). Dabei ist die Bindung von Nup133p an den Nup84p-Komplex etwas schwächer als die Bindung zwischen den anderen Komponenten. Dies hat zur Folge, dass Nup133p nicht in allen Aufreinigungen identifiziert werden kann. Umgekehrt können die anderen Mitglieder des Komplexes nur in geringen Mengen zusammen mit Nup133p gereinigt werden (Abb. 29).

Untersucht man die vier Eluate mit dem HA-Antikörper auf die Anwesenheit von Nup192p-HA, so findet man in allen vier Eluaten eine geringere Nup192p-Menge als in einem Nup188p-Eluat. Es scheint, dass ein Teil der Nup192p-Proteine über Nup84p und Nup120p an den Nup84p-Komplex binden könnte. Aber in diesem Falle spiegeln die gefundenen genetischen Interaktionen von Nup192p mit dem Nup84p-Komplex vermutlich eher eine funktionelle Beziehung als eine physische Interaktion wieder.

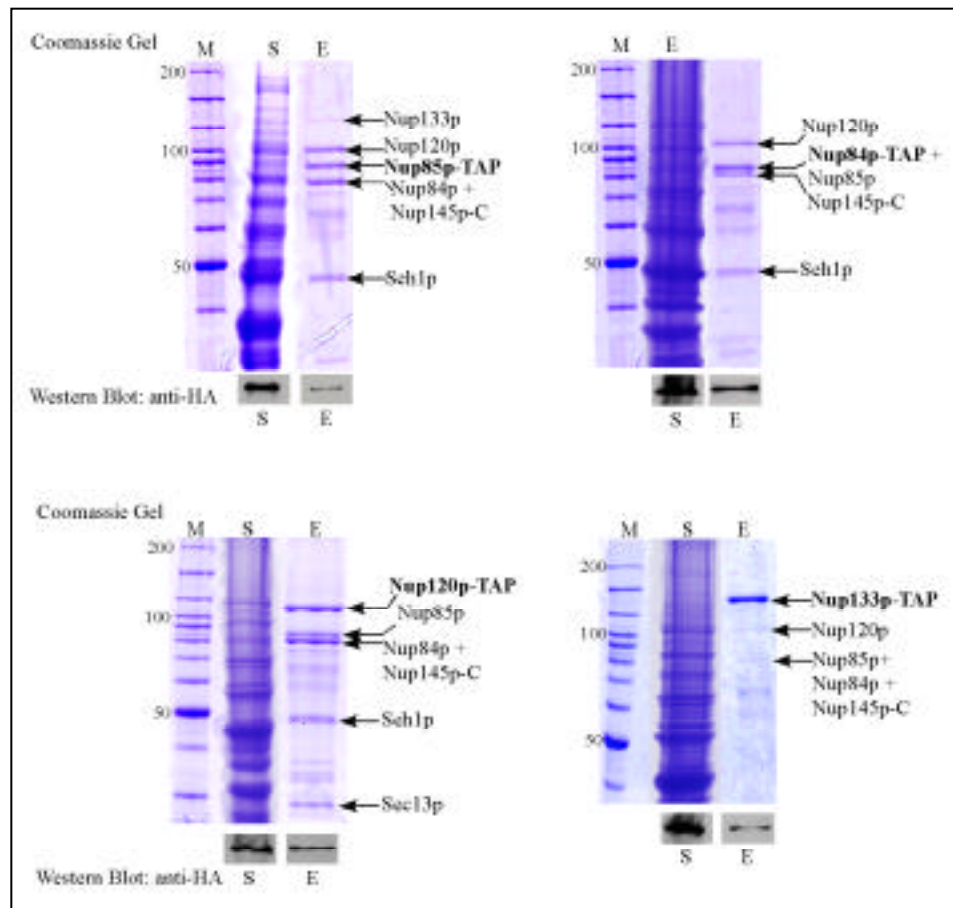


Abb.29: Nup192p interagiert auf biochemischer Ebene nur schwach mit dem Nup84p-Komplex.

Die verschiedenen Nukleoporine werden C-terminal mit einem ProteinA-TEV-CBP-Marker versehen und mittels doppelter Affinitätschromatographie aus Hefezellen isoliert. Dabei werden mit den markierten Nukleoporinen auch alle während der Aufreinigung stabil mit ihnen interagierenden Proteine mitgereinigt. Die Proteine in den einzelnen Calmodulin-Eluaten werden auf 8% PA-Gelen mit Coomassie Blau angefärbt. (M = Proteinmarker).

Zellhomogenat (S) und Calmodulin-Eluat (E) werden mittels Western-Blot-Analyse mit Hilfe von anti-HA-Antikörpern auf die Anwesenheit von Nup192p-HA untersucht. Das Antikörpersignal wird durch chemische Lumineszenz (1min) sichtbar gemacht. M = Proteinmarker.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass viele der beobachteten genetischen Interaktionen von NUP192 mit anderen Nukleoporinen auf biochemischer Ebene bestätigt werden können. Am stärksten bindet Nup192p an die Mitglieder des Nup49p-Nsp1p-Nup57p-Nic96p-Komplexes und an Nup188p, während die Bindung von Nup192p an den Nup84p-Komplex schwächer ist.

5. Diskussion

Der 1949 erstmals von Callan *et al.* beschriebene Kernporenkomplex stellt in Eukaryoten eine selektive Barriere zwischen Zytoplasma und Zellkern dar, die einen geregelten und kontrollierten Austausch von Proteinen und RNAs zwischen den beiden zellulären Kompartimenten erlaubt. Gerade in den letzten Jahren wurden erhebliche Anstrengungen unternommen, um den NPC auf der strukturellen, molekularen und funktionellen Ebene zu charakterisieren. Durch die Anwendung genetischer und biochemischer Methoden sind inzwischen vermutlich alle Komponenten/Proteine des Kernporenkomplexes der Hefe *S. cerevisiae* bekannt (Doye und Hurt, 1997; Rout *et al.*, 2000; Ryan und Went, 2000; Vasu und Forbes, 2001). Eine große Zahl dieser Hefe-Nukleoporine besitzt Homologe bzw. Orthologe in Vertebraten. Von den meisten dieser Nukleoporinen kennt man ihre grobe Lage im Kernporenkomplex und zum Teil ihre Funktion. Einige stabile Nukleoporin-Komplexe, wie z.B. der Nup84p-Komplex und die beiden Nsp1p-Komplexe (Grandi *et al.*, 1995a; Siniossoglou *et al.*, 1996; DelPriore *et al.*, 1997), konnten identifiziert und charakterisiert werden. Allerdings ist auch bei diesen Komplexen, wie bei allen anderen Nukleoporinen, noch nicht bekannt, welchen elektronenmikroskopisch identifizierten Strukturen sie im Kernporenkomplex entsprechen.

Die Charakterisierung einzelner Nukleoporine bzw. einzelner Nukleoporin-Komplexe und das Verständnis ihrer Funktion kann für die Aufklärung der Kernporenstruktur bzw. des NPC-Aufbaus nützlich/notwendig sein. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich deshalb mit der weiteren Untersuchung des größten essentiellen Nukleoporins in der Hefe *S. cerevisiae*, Nup192p.

Zu Beginn dieser Arbeit war über Nup192p bekannt, dass es an Nic96p bindet und dass es, wie Nic96p selbst, eine wichtige Rolle bei der Kernporenbiogenese bzw. beim Aufbau des Kernporenkomplexes spielt (Kosova *et al.*, 1999; Gomez-Spinosa *et al.*, 2000). Darüber hinaus sind bisher keine weiteren Nukleoporine gefunden worden, die mit Nup192p interagieren. Auch über die genaue Lage von Nup192p im Kernporenkomplex und über die NPC-Struktur, an der Nup192p beteiligt ist bzw. die Nup192p aufbaut, ist bis heute wenig bekannt. In der untersuchten *NUP192*-Mutanten, dem *nup192-15*-Allel, konnten weder in früheren Studien (Kosova *et al.*, 1999) noch in der vorliegenden Arbeit

Veränderungen im aktiven Transport durch den Kernporenkomplex beobachtet werden. Auch die passive Diffusion durch den NPC verläuft in *nup192-15*-Mutanten normal. Allerdings zeigen die als Kontrollen verwendeten *nup170Δ*- und *nup188Δ*-Mutanten eine weniger stark ausgeprägte zytoplasmatische Misslokalisierung von GFP-NLS-Reportern als in Shulga *et al.* (2000) beschrieben. Dabei spielt es keine Rolle, ob es sich bei den Reportern um den hier gezeigten GFP-NLS_{Rp125p} oder um den ebenfalls untersuchten (nicht gezeigte Daten) GFP-NLS_{SV40}-Reporter, den Shulga und Mitarbeitern publiziert haben (Shulga *et al.*, 2000), handelt. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass die in den hier vorgestellten Experimenten verwendeten Hefestämme einen anderen genetischen Hintergrund besitzen. Es wurde für andere Proteine schon festgestellt, dass einige Proteine abhängig von dem verwendeten Stammhintergrund unterschiedliche Eigenschaften zeigen. Nup1p und Nup2p sind beispielsweise nur in bestimmten genetischen Hintergründen essentiell (Berlanger *et al.*, 1994; Hartmann und Görlich, 1995). Es ist außerdem zu bedenken, dass in den beiden untersuchten *nup170*- und *nup188*-Mutanten die entsprechenden Proteine im NPC fehlen. Dies führt möglicherweise zu einem vergrößerten Durchmesser des Diffusionskanals oder zu einer Störung/Änderung der NPC-Gesamtorganisation. In der untersuchten *nup192*-Mutante dagegen wird bei permissiver Temperatur immer noch Nup192p-Protein hergestellt (nicht gezeigte Daten) und vermutlich in neu gebildete Kernporenkomplexe eingebaut. Demnach kann nicht ausgeschlossen werden, dass Nup192p doch am Aufbau des Diffusionskanals beteiligt ist. Alle bisher untersuchten GFP-Nukleoporin-Reporter zeigen in *nup192-15*-Zellen nach sechs bis acht Stunden eine Akkumulation in ein bis zwei Punkten im Zytoplasma in der Nähe des Zellkerns (Kosova *et al.*, 1999 und diese Arbeit). Diese Beobachtung könnte darauf zurückzuführen sein, dass in der *nup192-15*-Mutanten bei restriktiver Temperatur die Kernporenbiogenese in einem frühen Stadium blockiert sein könnte (Gomez-Ospina *et al.*, 2000). Neu gebildete Nukleoporine können nicht mehr in den NPC eingebaut werden und häufen sich im Zytoplasma an.

Es ist erstaunlich, dass Nup192p trotz seiner Essentialität, seiner Größe und seines häufigen Vorkommens im NPC bisher in keiner der zahlreichen mit unterschiedlichen Nukleoporinen durchgeführten genetischen Analysen identifiziert werden konnte. Durch die in dieser Arbeit durchgeführten direkten Analysen von Nup192p hinsichtlich seiner

genetischen und biochemischen Interaktionen mit anderen Nukleoporinen, konnten physische und funktionelle Interaktionspartner von Nup192p identifiziert werden.

5.1. Die biochemischen Eigenschaften von Nup192p

Wird Nup192p mittels Affinitätschromatographie aus Hefe aufgereinigt, so werden im Eluat keine mitgereinigten Proteine gefunden, die mit Nup192p spezifisch im Verhältnis 1:1 interagieren. Mit den entsprechenden Antikörpern lassen sich in einem Nup192p-Eluat zwar die Nukleoporine Nsp1p, Nup49p, Nic96p und Nup188p nachweisen (nicht gezeigte Daten), dies jedoch in nur geringen Mengen. Andererseits kann Nup192p bisher auch nur in geringen Mengen mit diesen vier Nukleoporinen isoliert werden.

Die Interaktion zwischen Nup192p und den Nukleoporinen Nsp1p, Nup49p, Nic96p und Nup188p wird möglicherweise durch schwache Bindungen, wie z.B. van-der-Waals-Kräfte, vermittelt. Da jedoch die einzelnen Komponenten im Kernporenkomplex lokal stark konzentriert sind und nahe beieinander liegen, sind diese Interaktionen ausreichend. Während der Zellyse einer Affinitätschromatographie zerfällt der Kernporenkomplex wahrscheinlich in seine einzelnen Bausteine. Dadurch kann es im Zellysat zu einer Verdünnung dieser Untereinheiten kommen. Vermutlich lösen sich dabei teilweise die Bindungen zwischen Nup192p und Nup188p sowie zwischen Nup192p und dem Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Nic96p-Komplex. Eine weitere Erklärung für die fehlenden 1:1-Interaktionen von Nup192p mit Nup188p, Nsp1p, Nup49p bzw. Nic96p kann das Ergebnis der Gelfiltration von Nup192p liefern. Bei dieser eluiert Nup192p nicht wie erwartet mit einem Molekulargewicht von 200 kDa, sondern mit einem Molekulargewicht von ca. 800 kDa. Dabei spielt es keine Rolle, ob Nup192p überproduziert oder in normaler Menge isoliert wird. Das ungewöhnliche Elutionsverhalten von Nup192p in der Gelfiltration deutet entweder auf ein lang gestrecktes Molekül hin oder auf ein Nup192p-Multimer. Ein mögliches Multimer könnte einem Nup192p-Homotetramer entsprechen. Falls diese Annahme zutrifft, wäre dies eine Erklärung für die Beobachtung, dass es nicht zu der erwarteten 1:1-Isolierung zwischen Nup192p und seiner spezifischen physischen Interaktionspartner wie z.B. Nup188p, Nsp1p, Nup49p oder Nic96p kommt. In diesem Falle würde Nup192p überwiegend an sich selbst binden. Es konnten erste biochemische Hinweise gefunden werden, die die Annahme einer Nup192p-Multimers stützen.

Alle mit Nup192p interagierende Nukleoporine besitzen Heptad-Repeats, die coiled-coil-Domänen ausbilden können. Auch für Nup192p können über die gesamte Proteinsequenz coiled-coil-Domänen vorhergesagt werden (Abb. 30). Es kann deshalb angenommen werden, dass die Bindungen zwischen den jeweiligen Proteinen über diese an intermolekularen Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligten coiled-coil-Domänen vermittelt werden.

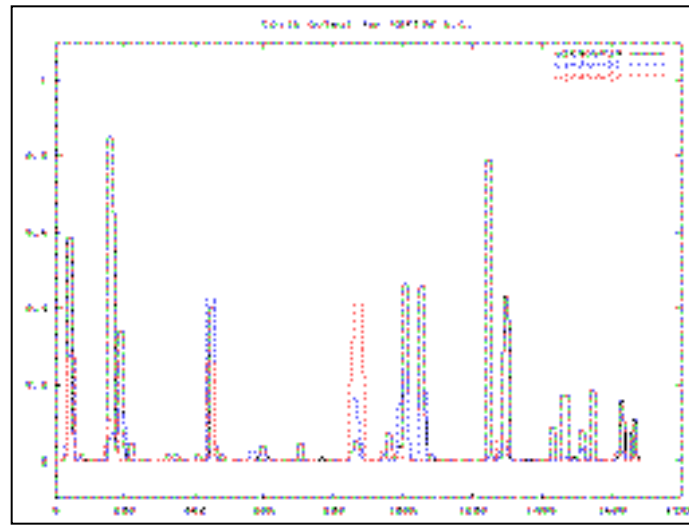


Abb.30: Vorhersage der coiled-coil-Domänen über das gesamte Nup192p-Protein mit COILS (www.chEMBLnet.org/software/COILS_form.html, Lupas et al., 1991). Dieses Programm vergleicht eine gegebene Sequenz mit einer Datenbank bekannter parallel-zwei-strängiger coiled-coils. Der dadurch erhaltene Ähnlichkeitstreffer wird mit der Trefferverteilung in globulären und coiled-coil-Proteinen verglichen. Damit kann das Programm die Wahrscheinlichkeit berechnen, mit der die eingegebene Sequenz eine coiled-coil-Konformation annimmt. Die drei verschiedenen Farben stellen die wahrscheinliche Ausbildung von coiled-coil-Domänen bei unterschiedlichen Vorhersagebedingungen dar.

5.2. Die direkten Nachbarn von Nup192p im Kernporenkomplex sind der Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Nic96p-Komplex und Nup188p

Das über seine gesamte Sequenz Heptad-Repeats enthaltende Nup192p-Protein (Abb. 30) interagiert auf genetischer Ebene spezifisch mit *nsp1*-, *nup49*- und *nic96*-ts-Allelen, die Mutationen in den jeweiligen Heptad-Repeats tragen bzw. mit der Deletion des ebenfalls coiled-coils enthaltenden Nup188p. Es wird angenommen, dass diese Heptad-Repeats coiled-coil-Domänen ausbilden, die an intra- und intermolekularen Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sind. Da Nup192p auf biochemischer Ebene mit Nsp1p, Nup49p, Nic96p sowie mit Nup188p interagiert, ist es möglich, dass die Interaktionen

von Nup192p mit dem Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Nic96p-Komplex und mit Nup188p durch die coiled-coil-Domänen vermittelt werden. Demnach könnten diese Nukleoporine die direkten Nachbarn von Nup192p im Kernporenkomplex sein (Modell: Abb. 31). Es wäre denkbar, dass der Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Nic96p-Komplex zwei Seiten besitzt. Eine der Porenmembran zugewandte Seite auf der sich Nic96p befindet und die einen Zugriff von Nup192p auf Nsp1p und Nup49p ermöglicht und eine zweite, der zentralen Pore zugewandte Seite, auf der die GLFG- und FXFG-Repeats von Nup57p, Nsp1p und Nup49p in den Transporterkanal ragen. Dieses Modell würde mit der Beobachtung übereinstimmen, dass zwischen Nup192p und Nup57p, dem Organisationszentrum von Nsp1p und Nup49p, auf genetischer Ebene keine Interaktion nachgewiesen werden konnte.

Die biochemischen Interaktionen zwischen den Nukleoporinen Nup192p und Nup188p, zwischen Nup192p und Nic96p sowie zwischen Nup188p und Nic96p sind von der Hefe bis zu Vertebraten konserviert (Nehrbass *et al.*, 1996; Grandi *et al.*, 1997; Kosova *et al.*, 1999; Miller *et al.*, 2000). Daraus kann geschlossen werden, dass die in Hefe gefundenen Interaktionen auch bei Vertebraten relevant sind und dass Nup205 im Kernporenkomplex von Vertebraten eine ähnliche Funktion und Lage wie Nup192p in *S. cerevisiae* besitzt. Nup192p könnte die Interaktion zwischen dem Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Nic96p-Komplex und Nup188p organisieren, indem es mit Nsp1p, Nup49p sowie Nic96p auf der einen und mit Nup188p auf der anderen Seite interagiert. Nic96p und Nup188p stellen die stabilisierende Verbindung zu dem integralen Transmembran-Nukleoporin Pom152p her (Nehrbass *et al.*, 1996).

5.3. Nup192p interagiert genetisch und funktionell mit dem Nup84p-Komplex

Die zwischen Nup192p und vier der sieben Mitglieder des Nup84p-Komplexes (Nup84p, Nup85p, Nup120p, Nup133p; Abb.31) beobachtete genetische Beziehung kann nicht alleine auf eine biochemische Interaktion zugeführt werden, weil sich Nup192p nur mit Nup84p, Nup120p und Nup133p in geringen Mengen aus Hefe isolieren lässt.

Allerdings spielen sowohl Nup192p als auch der Nup84p-Komplex beim Zusammen- bzw. Aufbau des Kernporenkomplexes eine wichtige Rolle (Siniosoglou *et al.*, 1996; Kosova *et al.* 1999, Gomez-Spinosa *et al.*, 2000). Möglicherweise handelt es sich bei der

zwischen Nup192p und Mitgliedern des Nup84p-Komplexes beobachteten genetischen Beziehung um eine schwache biochemische Bindung oder um noch geringere Affinitäten und zusätzlich um eine funktionelle Überlappung aufeinanderfolgender Schritte in der Biogenese des Kernporenkomplexes. So könnte Nup192p für den Aufbau/die Organisation bzw. für die Stabilisierung einer zentralen Struktur benötigt werden (siehe 4.4.), während der Nup84p-Komplex für den Aufbau des nukleären und zytoplasmatischen Ringes wichtig ist.

5.4. Lokalisierung von Nup192p im Kernporenkomplex

Im Kernporenkomplex lokalisieren die direkten Interaktionspartner von Nup192p in der zentralen Ebene der Poren. Sie stellen wahrscheinlich Bestandteile des Speichen-Ring-Komplexes dar. Der Nsp1p-Nup49p-Nup57p-Nic96p-Komplex ist Bestandteil des zentralen Transporters, während Nup188p über Nic96p den zentralen Transporter mit integralen NPC-Bestandteilen, wie z.B. Pom152p, verbindet. Nup188p ist außerdem am Aufbau des Diffusionskanals durch die Kernpore beteiligt.

Nup192p könnte zusammen mit Nic96p Strukturen des zentralen Transporterkanaals, wie z.B. dem Nsp1p-Nup45p-Nup57p-Komplex, mit am Aufbau des Diffusionskanals beteiligten Bestandteilen des Speichen-Ring-Komplexes, wie z.B. Nup188p, verbinden. Über Nic96p und Nup188p könnte diese Verbindung direkt zu einer Verankerung des Kernporenkomplexes in der Membran (Pom152p) führen. Möglicherweise handelt es sich bei den vier Nukleoporinen Nup192p, Nic96p, Nup188p und Pom152p um Bestandteile des Speichen-Ring-Komplexes, der die zentralen Transporterstrukturen stabilisiert und diese in der Porenmembran verankert.

Abb. 31A gibt eine Übersicht über das komplexe genetische Netzwerk, in das Nup192p eingebettet ist. In Abb. 31B ist ein Modell zu sehen, das eine Möglichkeit wiedergibt, die beobachteten physischen Interaktionen zwischen Nup192p und den interagierenden Nukleoporinen darzustellen.

6. Ausblick

Zur Bestätigung der Annahme, das Nup192p ein essentieller Baustein des Kernporenkomplexes bzw. eine strukturelle Komponente darstellt, die andere NPC-Bausteine im Kernporenkomplex organisiert und stabilisiert, ist die weitere biochemische Analyse von Nup192p notwendig. Die mit Hilfe der Western-Blot-Methode beobachteten Bindungen von Nup192p an Nup188p, Nic96p, Nup49p und Nsp1p können und sollten nicht nur durch Western-Blot-Analyse eines von einem *ARS-CEN*-Plasmid gewonnenen Nup192p-Eluates *in vivo* mit den entsprechenden Antikörpern und/oder massenspektroskopischer Untersuchung und durch *in vitro* Rekonstitutionsstudien bestätigt werden. Deletionen einzelner coiled-coil-Domänen von Nup192p können außerdem in genetischen und biochemischen Analysen dazu verwendet werden, um nähere Informationen über die Bindungsstellen einzelner Nukleoporine bzw. von Nup-Komplexen an Nup192p zu erhalten. Um herauszufinden, welche Proteine an welche coiled-coil-Domänen von Nup192p binden, können auch *in vitro* Bindestudien der einzelnen coiled-coil-Domänen von Nup192p mit Hefezelllysate oder mit gereinigten Nukleoporinen durchgeführt werden. Die Sequenzierung des *nup192-15*-Allels stellt eine weitere Möglichkeit dar, um mehr über die Bindungsdomänen von Nup192p, Nsp1p, Nup49p, Nic96p und Nup188p in Nup192p zu erfahren. Außerdem sollte die Ursache für das ungewöhnliche Elutionsprofil von Nup192p in der Gelfiltration untersucht werden. Die Bestimmung der Nup192p-Molekülform im Elektronenmikroskop kann einen Aufschluss darüber geben, ob es sich bei Nup192p um ein langgestrecktes Molekül handelt und welche Dimension dieses Molekül aufweist. Die Ausbildung von Nup192p-Multimeren könnte durch Affinitätschromatographie von ProteinA-markiertem Nup192p bei gleichzeitiger Anwesenheit von Nup192-HA in den entsprechenden Hefezellen bestätigt werden.

Die weitere strukturelle und funktionelle Analyse des größten essentiellen Nukleoporins Nup192p und seiner Interaktionspartner verspricht neue/wichtige Einsichten über den Aufbau des Speichen-Ring-Komplexes im NPC sowie über die Biogenese des Kernporenkomplexes.

7. Material und Methoden

7.1. Verwendete Plasmide

Folgende in dieser Arbeit verwendeten Plasmide wurden nicht selbst erstellt:

YCplac33-*NUP192*, YEplac181-*NUP192*, pUN100-*NUP192-TEV-PtA*, YCplac22-*nup192-15*, pUN100-*nup192-15* (Kosova *et al.*, 1999; B. Kosova, unveröffentlicht);

pCH1122-*NUP49*, pUN100-*nup49-313*, pUN100-*PtA-NUP49* (Doye *et al.*, 1994), pASZ11-*Ssa4::GFP-NUP49* (Schlauch *et al.*, 1997),

pCH1122-*NIC96*, pUN100-*NIC96*, pUN100-*nic96Δ1/3hept.rep.*, pUN100-*nic96-1* (Grandi *et al.*, 1993 und Grandi, unveröffentlicht)

pUN100-*myc-NUP188* (Zabel *et al.*, 1996)

pRS315-*NUP120-PtA* (Siniosoglou *et al.*, 1996)

pHT4467-*NUP84* (S. Siniosoglou, unveröffentlicht), pUN100-*NUP84* (C. Wimmer, unveröffentlicht)

pUN100-*NOPI::PtA-TEV-NUP85* (Siniosoglou *et al.*, 1996), pUN100-*NUP85* (H. Tekotte, unveröffentlicht)

pRS316-*NUP133*, pUN100-*PtA-NUP133*, pUN100-*NUP133* (Doye *et al.*, 1994 und V. Doye, unveröffentlicht)

pCH1122-*NSP1*, pSB-*NSP1* (Wimmer *et al.*, 1992).

YCplac22-*NUP192-TEV-PtA*, YCplac22-*NUP192-TEV-HA*, YEplac181-*NUP192-TEV-PtA*, pASZ11-*NUP192*, pASZ11-*nup192-15*: ein 6118kb großes *NUP192*-Gen-Fragment (5'-UTR und der größte Teil des *NUP192*-ORFs) wurde als *SphI/SacI*-Fragment aus pUN100-*NUP192* bzw. pUN100-*nup192-15* in die entsprechend geöffneten Vektoren Ycplac22, Yeplac181 oder pASZ11 umkloniert. In einem zweiten Schritt wurde das 955kb große *NUP192*-Gen-Restfragment (3'Ende + 3'UTR) als *SacI*-Fragment eingefügt.

pRS316-*NUP120*: Das *NUP120*-Gen wurde als *SacI/SaII*-Fragment aus pRS315-*NUP120* (Siniosoglou, 1995) in den entsprechend geöffneten pRS316 kloniert.

7.2. Hefestämme

Die verwendeten Hefestämme sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:

Name	Genotyp	Quelle
Y945	BSY420, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, nup192::HIS3</i> + YCplac33-NUP192	Kosova <i>et al.</i> , 1999
Y946	BSY420, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, a nup192::HIS3</i> + YCplac33-NUP192	Kosova <i>et al.</i> , 1999
Y1287	BSY420, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, nup192::HIS3</i> + YCplac22- <i>nup192-15</i>	Kosova <i>et al.</i> , 1999
Y1288	BSY420, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, a nup192::HIS3</i> + YCplac22- <i>nup192-15</i>	Kosova <i>et al.</i> , 1999
Y1290	BSY420, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, a nup192::HIS3</i> + pUN100-NUP192-TEV-PtA	B. Kosova, unveröffentlicht
Y27091	BY4743 diploid <i>his3/his3, leu2/leu2, lys2/LYS2 MET15/met15, ura3/ura3, TRP1/TRP1, a/ nsp1::kanMX6/NSP1</i>	Euroscarf
Y341	RS453 <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, nup49::TRP1</i> + pCH1122-NUP49	Grandi <i>et al.</i> , 1993
Y695	RS453 <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, a nup84::HIS3</i> + pHT4467-NUP84	Siniooglou <i>et al.</i> , 1996
Y873	RS453 <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, CΔnup85::HIS3</i> pRS316-NUP85	Siniooglou <i>et al.</i> , 1996
Y766	RS453 <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, a nup120::HIS3</i> + pRS315-NUP120-myc	Siniooglou <i>et al.</i> , 1996
Y524	RS453 <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, nup133::HIS3</i>	Doye <i>et al.</i> , 1994
Y663	RS453 <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, nup188::HIS3</i>	Zabel <i>et al.</i> , 1996
Y554	RS453, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, nic96::HIS3</i> pUN100-NIC96	Grandi <i>et al.</i> , 1993
Y1253	LGY106 <i>his3, ura3, leu2, a rat7::HIS3</i> pLG4 (RAT7 URA3 CEN4)	Gorsch <i>et al.</i> , 1995
Y1174	DBY5384 <i>his3, leu2, ura3, mlp1::LEU2</i>	Kölling <i>et al.</i> , 1993
Y1184	RS453, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, lys2, nup195::HIS3</i>	Kosova <i>et al.</i> , 2000
Y1239	RS453, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, a nup170::HIS3</i>	H. Santos-Rosa, unveröffentlicht
Y846	W303, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, pom152::HIS3</i>	Aitchison <i>et al.</i> , 1995
Y1499	RS453, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, nup116::HIS3</i>	Bailer <i>et al.</i> , 1998

Name	Genotyp	Quelle
Y743	RS453, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, nup1::HIS3</i>	Schlauch und Hurt, 1995
Y611	RS453, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, ? nup100::LEU2</i>	Bailer <i>et al.</i> , 1998
Y910	RS453, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, nup2::HIS3</i>	Hellmuth <i>et al.</i> , 1998
Y1448	?, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, a nup59::HIS3</i>	Marelli <i>et al.</i> , 1998
Y566	RS453, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, a nup57ΔM::HIS3</i>	Grandi <i>et al.</i> , 1993
Y1447	?, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, a nup53::HIS3</i>	Marelli <i>et al.</i> , 1998
Y1551	?, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, a rix1::KAN</i>	Stutz <i>et al.</i> , 1995
Y951	RS453, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, gle2::HIS3</i>	Bailer <i>et al.</i> , 1998
Y1271	RS453, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, ? seh1::HIS3 pASZ11-SEH1-GFP</i>	B. Kosova, unveröffentlicht
Y1739	W303, <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, LYS2, yrb2::KAN</i>	A. Braunwarth, unveröffentlicht
	BY4743/RS453 <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, ? nsp1::kanMX6 nup192::HIS3 pCH1122-NSP1-C Ycplac22-NUP192</i>	diese Studie
	BY4743/RS453 <i>ade2, his3, leu2, trp1, ura3, ? nsp1::kanMX6 nup192::HIS3 pCH1122-NSP1-C Ycplac22-nup192-15</i>	diese Studie

7.3. Herstellung des *nsp1::KAN nup192::HIS3-Doppeldelentionsstamms*

In einem diploiden „*NSP1/nsp1::KAN pCH1122-URA3-NSP1-C pUN100-LEU2-NUP192*“ Stamm wird, wie von Kosova *et al.* (1999) für den BSY240-Stamm beschrieben, der NUP192p-ORF durch den *HIS3*-Marker ersetzt. Durch Sporulation und Trennung der vier Sporen einer Tetrade wurden haploide Hefezellen erhalten. Diese haploiden Hefen wurden auf das gemeinsame Auftreten des *KAN*-Markers und des *HIS3*-Markers untersucht. Durch Kreuzung mit einem haploiden Wildtypstamm wurde die genetische Kopplung der beiden Marker (*KAN* und *HIS3*) getestet. Da die beiden Gene *NSP1* und *NUP192* im Genom nebeneinander liegen, werden sie nicht durch Rekombination getrennt. Im daraus entstandenen Doppeldisruptionsstamm „*nsp1::KAN nup192::HIS3 pCH1122-URA3-NSP1-C pUN100-LEU2-NUP192*“ wurde das pUN100-

LEU2-NUP192-Plasmid entweder gegen ein *Ycplac22-TRP1-NUP192*- oder ein *Ycplac22-TRP1-nup192-15*-Plasmid ausgetauscht.

7.4. Herstellung der *nup192-15* – *nupx* Doppelmutanten

Zur Herstellung der Doppelmutanten wird ein *nup192::HIS3*-Knockout-Stamm, der entweder eine *URA3-NUP192*-Wildtypkopie oder eine *nup192-15*-Mutante auf einem Plasmid trägt, mit 24 der in 6.2. angegebenen Nukleoporin-Knockout-Stämmen gekreuzt. Bei essentiellen Nukleoporinen wird das Wachstum der Stämme entweder durch eine Wildtypkopie oder durch ein auf einem Plasmid gelegenes mutiertes Allel sichergestellt. Nach Überführung der durch Kreuzen entstandenen diploiden Hefezellen auf ein Mangelmedium wird die Sporulation ausgelöst und es bilden sich durch Meiose vier in einer Zellwandhülle verpackte haploide Sporen, die sogenannten Tetraden. Diese vier Sporen werden auf einem Vollmedium getrennt und anschließend zur Zellvermehrung für 2-3 Tage bei permissiver Temperatur (23°C) inkubiert. Der Genotyp der untersuchten Nukleoporine in einzelnen Sporen kann durch verschiedene Markerphänotypen bestimmt werden. Während der Meiose kann durch rekombinatorische Ereignisse eine „Mischung“ der beiden Genome stattfinden. Dadurch können die einzelnen Sporen eine von mehreren unterschiedlichen Genotypen und Marker-Phänotypen aufweisen:

1. Eine Wildtyp-Spore trägt keine der in den Ausgangsstämmen vorhandenen Nukleoporin-Deletionen.
2. Eine Einzelmutanten-Spore zeigt den gleichen Marker-Genotyp wie einer der beiden Ausgangsstämme.
3. Eine Spore, die beide Nukleoporin-Deletionen und somit die Marker beider Ausgangsstämme trägt, ist eine Doppelmutante.

In der Doppelmutante wird immer eine der beiden Nukleoporin-Deletionen durch ein *URA3*-Wildtyp-Plasmid komplementiert. Dadurch kann geprüft werden, ob eine genetische Beziehung zwischen den beiden untersuchten Nukleoporinen besteht. Der *URA3*-Marker des Wildtyp-Plasmides wird bei den Versuchen deshalb verwendet, weil er eine Selektion hinsichtlich des Verlustes dieses Plasmides ermöglicht. Das Proteinprodukt des *URA3*-Gens bildet auf 5'-FOA-haltigem Medium aus 5'-FOA (5-Fluoruracil-6-carboxylsäuremonohydrat) eine für Hefezellen toxische Substanz. Ein Überleben der

Hefezellen ist nur dann möglich, wenn sie das *URA3*-Wildtyp-Plasmid verlieren. Falls sie aber das auf dem Wildtyp-Plasmid kodierte Gen für ihr Überleben benötigen, ist ein Verlust des *URA3*-Plasmids nicht möglich und die Hefezellen sterben.

Nach Bestimmung des Marker-Phänotyps jeder Spore einer Tetrade wurde in einer ersten schnellen Analyse das Wachstum auf 5'-FOA-haltigem Medium von Einzelmutanten-Sporen mit dem von Doppelmutanten-Sporen verglichen. Doppelmutanten, die in diesem „Schnelltest“ eine synthetische Letalität oder eine konditionelle synthetische Letalität der beiden untersuchten Nukleoporine zeigen, wurden mit verschiedenen Plasmidkombinationen transformiert. Dadurch kann bei gleichem genetischen Hintergrund eine Wachstumsanalyse bzw. ein Wachstumsvergleich von Wildtyp, Einzelmutanten und Doppelmutanten, wie in Material und Methoden 6.7. beschrieben, erfolgen. *nup192-15 nupx* Doppelmutanten, die auf 5'-FOA-haltigem Medium keine synthetische Letalität zeigen, wurden auf ihr Wachstum auf Vollmedium im Vergleich zu den Einzelmutanten getestet.

7.5. Wachstumsanalyse von Hefezellen (Dotspot-Analyse)

Trocknen von Hefemedium-Agar-Platten, wie z.B. SDC+FOA oder YPD (siehe Medien), über Nacht bei RT. Verschiedene Übernacht-Flüssigkulturen (in Voll- bzw. Selektivmedium, siehe Medien) von Hefezellen werden auf OD_{600nm} 0.5 (für YPD Platten) bzw. OD_{600nm} 1 (für SDC+FOA Platten) in 1ml Wasser verdünnt, so dass sich die gleiche Anzahl von Hefezellen in allen zu vergleichenden Kulturen befindet. 1:10-, 1 :100-, 1:1000- und 1:10000-Verdünnungen dieser Zell-Suspensionen in 100µl Wasser. Von jeder Verdünnung werden je 7µl (YPD-Platten) bzw. 10µl (SDC+FOA-Platten) in einer Reihe auf die Agar-Platten gesetzt/getropft. Die Platten bei entsprechenden Temperaturen (23°C und 30°C) für mindestens 3 Tage inkubiert.

7.6. Integration des HA-Epitops ins Hefegenom

Da gegen Nup192p keine Antikörper verfügbar sind, wird an das 3'-Ende des *NUP192*-ORF die Sequenz für den HA-Marker unter Ausnutzung der homologen Rekombination in *S. cerevisiae* integriert. Zuerst werden die zu integrierende DNA-Sequenz und flankierende Sequenzen, die mit der Sequenz in welche integriert werden soll übereinstimmen, mittels PCR amplifiziert. Es wurde das folgende Primer-Paar:

NUP192-F2

–gctaatgatgttatgcacattaacaggatatcaaataacgatCGCATCCCCGGGTAAATTA-

NUP192-R1

–cgattcctaaaagtaattcttaaaagtataatgaatgacttaGAATTTCGAGCTCGTTTAAAC-

(Kleinbuchstaben zeigen Sequenzbereiche des *NUP192* Gens an, Großbuchstaben zeigen mit der Marker-enthaltenden Plasmid-DNA übereinstimmende Sequenzen)

zusammen mit den Plasmid-DNAs pFA6a-3HA-KanMX6 und pFA6a-3HA-HIS3MX6 (Longtine *et al.*, 1998) verwendet. Das gereinigte PCR-Produkt wurde in verschiedene *NupX*-TAP Stämme nach Itoh *et al.* (1982) transformiert. Die mit dem „KanMX6-PCR-Produkt“ transformierten Zellen wurden vor Ausplattieren auf Geneticin-haltiges Vollmedium für 2-3 Stunden bei 30°C inkubiert. Die Transformanten wurden mittels Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit des *NUP192-HA*-Fusionsproteins überprüft. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Page Gelelektrophorese, Anfärbung von Proteinen mit Coomassieblau und Western-Blot-Analyse nach Maniatis *et al.* (1989).

7.7. Herstellung eines Hefezellenextraktes

Ernten von 10 OD (600nm) Hefezellen einer ü/N Kultur bei RT und 4000 rpm für 4 min. Resuspendieren der Zellen in 800µl H₂O und Überführen der Zellsuspension in ein 2 ml-Eppendorf Reagiergefäß. Mischen des Zellpellets mit 3/4 Volumen Glaskügelchen, 100µl H₂O und 100µl 4xProbenpuffer (250mM Tris-HCl pH 6.8, 9.2% SDS, 0.2% Bromphenolblau, 40% Glycerin, 100mM DTT). Inkubation für 3 min bei 95°C und anschließendes Vortexen für 10 sec (3000/min). Wiederholen dieser beiden Schritte. Zentrifugieren für 10 sec bei maximaler Geschwindigkeit (14000 rpm) und RT. Überführen von 100µl Überstand mit einer Hamilton-Pipette in ein Eppendorf-Reagiergefäß und Analyse von 10µl auf einem SDS-Gel. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Page Gelelektrophorese, Anfärbung von Proteinen mit Coomassieblau und Westernblot-Analyse nach Maniatis *et al.* (1989) bzw. Sambrook *et al.* (1989).

7.8. Methoden und Medien für *S. cerevisiae*

Alle Arbeiten mit *S. cerevisiae*, wie Erzeugung von Diploiden, Sporulation und Tetradenanalyse, wurden wie von Shermann (1990) beschrieben durchgeführt. Alle Hefestämme wurden in Standardmedien nach Sherman (1990) gezogen. Vollmedien

enthielten 1% Hefe-Extrakt (Difco), 2% Bacto-Pepton (Difco) und entweder 2% Glukose (YPD) oder 2% Galaktose (YPG). Synthetische (S-) Medien enthielten 2% Glukose (SD) oder 2% Galaktose (SG), 0,67% Hefe-Stickstoffgrundlage (Difco) und 7% des entsprechenden CSM (complete synthetic mix) (BIO101), welches alle nötigen Aminosäuren, Purin- und Pyrimidinbasen enthält, außer den für die Selektion von auxotrophen Markern (z.B. *leu*, *ura*, *his* etc.) notwendigen. Feste Medien enthielten zusätzlich 2% Agar (Fluka). Wenn nötig, wurde 0,1% 5'-FOA (TRC) oder 0.2mg/ml Geneticin (Sigma) hinzugegeben. Das Wachstum der Zellen wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm verfolgt. Eine optische Dichte (OD_{600nm}) von 1,0 entspricht 3×10^7 Zellen/ml. Dieser Wert kann vor allem bei Mutanten gering variieren. Plasmide wurde mit Hilfe der Lithium-Acetat-Methode nach Itoh *et al.* (1983) in *S. cerevisiae* transformiert.

7.9. Lokalisierung von GFP-Reporterproteinen

Verdünnen einer ü/N optimal gewachsenen Vorkultur des zu untersuchenden Stammes auf eine optische Dichte (OD) bei 600nm von 0.2 in 50-100ml Medium. Inkubation bei permissiver und/oder restriktiver Temperatur für mehrere Stunden. Nach 2, 4, 6 und 8 Stunden werden 5-10ml der Kultur entnommen, die Zellen abzentrifugiert (3min, 3000rpm), gewaschen und in 50-100µl Wasser resuspendiert. Die Analyse der Diffusion und der Transportrate verschiedener GFP-NLS-Reporter-proteine wurde nach Shulga *et al.* (1996) und Shulga *et al.* (2000) ohne Modifikationen durchgeführt. Die Lokalisierung der GFP-Reporterproteine (in 5-8µl Zellsuspension) wurde mit dem Fluoreszenz-Filter eines Zeiss Axioskop Fluoreszenzmikroskops bestimmt und mit einer Xillix Microimager CCD Kamera dokumentiert. Die weitere Bearbeitungen der Bilder erfolgte mit Improvision (Openlab) und Photoshop 5.0x.

7.10. Affinitätsaufreinigung von Nup192p-TEV-ProteinA

Nach Siniosoglou *et al.* (1998) mit folgenden Modifikationen:

Das Zellpellet wurde bei RT aufgetaut und mit Puffer A (100mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 8.0, 5mM MgCl₂, 0.1% Tween20) + Proteaseinhibitoren „complete“ (Roche Diagnostics, 1Tablette/50ml) auf ein Volumen von 25 ml aufgefüllt. Die Zellsuspension wurde zusammen mit 25 ml Glassperlen (0,5mm) in eine Kugelmühle (pulverisette;

Fritsch) gefüllt. Die Zellyse wurde mit folgenden Geräteeinstellungen ausgeführt: 4min, 500rpm, 1min Pause, 2 Wiederholungen. Trennen des Zellhomogenates von den Kügelchen über eine 50ml-Spritze in ein 50ml Plastik-Reagiergefäß. Zentrifugation des Zellhomogenates für 8-10min bei 4000rpm, 4°C. Nach Überführung des daraus resultierenden Überstandes in 30ml Zentrifugengläser, Zentrifugation für 30min bei 14000rpm, 4°C Equilibrieren von 500µl IgG-Sepharose (IgG Sepharose® 6FastFlow: Pharmacia Biotech) mit 2x10ml Puffer A (100mM KCl, 20mM Tris- HCl pH 8.0, 5mM MgCl₂, 0.1% Tween20) und 1x5ml Puffer B (150mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 8.0, 5mM MgCl₂) in einem 15ml Plastik-Säulengefäß. Überführen des „klaren“ Überstandes nach der Zentrifugation in ein 50ml Plastik-Reagiergefäß, Zugabe der IgG-Sepharose und Inkubation dieser Suspension für 2h bei 4°C auf einem Drehrad, Waschen der an die IgG-Sepharose gebundenen Proteine mit 10ml Puffer A und 10ml Puffer B. Resuspendieren der IgG-Sepharose in 500µl Puffer B (150mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 8.0, 5mM MgCl₂) und Überführung der Suspension in 1ml-Zentrifugen-Säulen (MoBiTec). Zugabe von 20-30µl rekombinater TEV-Protease (von GIBCOBRL) und Inkubation der Suspension für 2.5h bei 16°C auf einem Drehrad (= TEV-Cleavage). Abzentrifugieren des TEV-Eluates in ein 1.5ml Plastik-Reagiergefäß. 100µl des TEV-Eluates mit SDS-Probenpuffer versetzen und für 5min bei 95°C aufkochen (= TEV-Eluat-Probe). Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Page-Gelelektrophorese, Anfärbung von Proteinen mit Coomassieblau und Western-Blot-Analyse nach Maniatis *et al.* (1989) bzw. Sambrook *et al.* (1989).

7.11. Affinitätsaufreinigung von NUPX-TAP

Der TAP-Marker wurde zusammen mit dem *TRP1*-Marker genomisch an den C-Terminus vor dem STOP-Codon von *NUPX* in einem haploiden *S. cerevisiae* Stamm integriert. In diesen Stamm wurde zusätzlich noch der *HA*-Marker, zusammen mit dem *HIS3*- bzw. *KanMX6*-Marker, an den C-Terminus vor das STOP-Codon von *NUP192* integriert, um Nup192p-HA über den HA-Marker mittels Western-Blot-Analyse nachweisen zu können, da keine gegen das Nup192p Protein gerichtete Antikörper vorhanden sind.

Die Aufreinigung von TAP Fusionsproteinen erfolgte nach Rigaut *et al.* (1999) mit folgenden Modifikationen:

Der Hefestamm wurde in 2l YPD-Medium in 5l Erlenmeyerkolben mit Schikanen bei 30°C gezogen. Bei OD_{600nm} 3,5-4 wurden die Zellen geerntet, das Pellet wurde vor dem Einfrieren in N₂(lq) mit LB+complete +PMSF gewaschen und bei -80°C gelagert. Das Zellpellet wurde bei 37°C aufgetaut und mit

LB (100mM NaCl, 50mM TrisHCl (pH7,5), 1.5mM MgCl₂, 0,15% NP40)

+ complete (Proteaseinhibitoren: „complete“ (Roche) 1Tablette pro 50ml)

+PMSF (PMSF 0.3ml 0.1M PMSF in Isopropanol pro 50ml)

+1mM DTT auf ein Volumen von 25ml aufgefüllt.

Die Zellsuspension wurde zusammen mit 25ml Glassperlen (0.5mm) in eine Kugelmühle (pulverisette, Fritsch) gefüllt. Die Zellyse erfolgte mit folgenden Geräteeinstellungen: 4min 500rpm, 1min Pause, 2 Wiederholungen. Trennen des Zellhomogenates von den Kügelchen über eine 50ml-Spritze in ein 50ml Plastik-Reagiergefäß. Zentrifugation des Zellhomogenates für 8-10min bei 400rpm, 4°C. Nach Überführung des daraus resultierenden Überstandes in 30ml Zentrifugengläser Zentrifugation für 30min bei 14000rpm, 4°C. Entfernen der Lipide an der Oberfläche des Überstandes mit der Wasserstrahlpumpe. Das Lysat wurde mit 0.3ml IgG-SepharoseTM (Amersham Pharmacia Biotech AB) (mit LB-DTT gewaschen) bei 4°C in einem 50ml Falconröhrchen inkubiert. Abzentrifugieren der IgG-Sepharose mit gebundenen Proteinen bei 1800rpm für 3min, 4°C und transferieren der IgG-Sepharose in ein Mobicol (MoBiTec). Danach Anschrauben des Mobicol an eine 20ml Spritze mit LUER-Lok und Waschen der Sepharose mit 20ml LB Puffer. Die TEV Spaltung erfolgte mit 25µl TEV-Protease (GIBCOBRL) in 0.3ml LB bei 16°C für 1h. Anschließend wurde das TEV Eluat in ein neues Mobicol mit 0.3ml Calmodulin Affinity Resin (Stratagene) (gewaschen mit LB + 2mM CaCl₂) und 0.15ml LB + 4mM CaCl₂ überführt. Nach Inkubation von 1h bei 4°C wurden die Calmodulin Affinity Resin mit 5ml LB + 2mM CaCl₂ gewaschen. Die Elution erfolgte mit 0.6ml Elutionsbuffer (10 mM TrisHCl (pH 8,0), 5 mM EGTA) nach Inkubation für 10min bei 37°C. Die isolierten Proteine wurden mit TCA trichloressigsäure) gefällt, in 1xSDS-Proben-Puffer aufgenommen und über SDS-Page Gelelektrophorese analysiert. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Page

Gelelektrophorese, Anfärbung von Proteinen mit Coomassieblau und Western-Blot-Analyse nach Maniatis *et al.* (1989) bzw. Sambrook *et al.* (1989).

7.12. Gelfiltration von Nup192p-TEV-Eluat

Bei der Gelfiltrationschromatographie erfolgt die Trennung der aufgetragenen Moleküle ihrer Größe und Form entsprechend über eine aus porösen Dextran- oder Agarose-Kügelchen bestehende Säule (Durchmesser 0.1mm). Bei einer Gelfiltrationssäule wird der Trennbereich durch die Porengröße bestimmt. Im Gegensatz zu großen oder länglichen Molekülen können kleine Moleküle in die Poren der Kügelchen eindringen. Dadurch bewegen sich kleine Moleküle langsamer durch die Säule als große Moleküle, die schnell durchlaufen können und früh eluieren. Mit Hilfe der Gelfiltrationschromatographie kann die molekulare Masse eines Protein abgeschätzt werden. Die Gelfiltration erfolgte mit der ÄKTAbasic FPLC-Anlage von amersham pharmacia biotech. Entgasen und Sterilfiltrieren von 500ml Puffer B (150mM KCl, 20mM Tris-HCl pH 8.0, 5mM MgCl₂). Waschen der Superose6 Gelfiltrations-Säule (amersham pharmacia biotech, Trennbereich von 5kDa bis 5000kDa) mit Puffer B. Zentrifugation von 500µl Nup192p-TEV-Eluat für 10min bei 14000rpm und 4°C. Luftblasenfreies Auftragen des Überstandes auf die Gelfiltrations-Säule. Aufkonzentrierung der in den gesammelten Fraktionen enthaltenden Proteinen durch TCA-Fällung. Auftrennung von Proteinen mittels SDS-Page Gelelektrophorese, Anfärbung von Proteinen mit Coomassieblau und Western-Blot-Analyse nach Maniatis *et al.* (1989) bzw. Sambrook *et al.* (1989).

7.13. TCA-Fällung von Proteinen

Zugabe von 100% TCA (Trichloressigsäure) zu den zu fällenden Proben bis zur Endkonzentration von 10%. Mischen und Inkubation der Proben für 10min auf Eis. Zentrifugation für 10min bei 14000rpm und 4°C. Waschen des Proteinpellets mit 1ml 10%iger TCA. Resuspendieren der Proteine in 60µl basischem Probenpuffer (1xSDS-Proben-Puffer + 75mM Tris-HCl pH 9.4). Inkubation für 3-5min bei 95°C.

7.14. Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wie Restriktionsverdau, Phosphatasebehandlung, Auftrennung der DNA in Agarosegelen, Ligation, Transformation in *E. coli* und "Minipreps" von DNA wurden im wesentlichen nach Sambrock *et al.* (1989) durchgeführt. Restriktionsenzyme, T4 DNA Ligase, Klenow Fragment und T4 DNA Polymerase waren von MBI Fermentas. Für PCRs zu Klonierungszwecken wurde Vent Polymerase von NEB oder dem Expand High Fidelity System der Firma Roche Diagnostics nach den Angaben der Hersteller verwendet. Alle Primer wurden von der Firma Interaktiva synthetisiert.

Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAex II Gel Extraction Kits (QIAGEN) und Präparation von Plasmiden aus *E.coli* mit Hilfe des NUCLEOBOND Plasmid Midi Kits oder des NUCLEOBOND Plasmid Maxi Kits (beide von NUCLEOBOND).

7.15. Allgemeine Arbeiten mit *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* wurde nach Standardmethoden (Sambrock *et al.*, 1989) durchgeführt. Zu Klonierungszwecken wurden DH5 -Zellen verwendet, die in LB Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert wurden. Rekombinante Proteine wurden in BL21 Zellen in Minimal Medium (MM) mit dem entsprechenden Antibiotikum exprimiert.

eigene Publikationen:

- Hellmuth, K., Lau, D.M., Bischoff, F.R., Künzler, M., Hurt, E.C., und Simos, G. (1998) Yeast Los1p has properties of an exportin-like nucleocytoplasmic transport factor for tRNA. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 6374-6386.
- Hurt, E., Hannus, S., Schmelzl, B., Lau, D., Tollervey, D., und Simos, G. (1999) A novel *in vivo* assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in Ran-cycle and nucleoporin mutants. *J. Cell. Biol.*, **144**, 389-401.
- Lau, D., Künzler, M., Braunwarth, A., Hellmuth, K., Podtelejnikov, A., Mann, M., and Hurt, E. (2000). Purification of Protein A-tagged yeast Ran reveals association with a novel karyopherin family member, Pdr6p. *J Biol Chem*, **274**, 467-471.

8. Literaturverzeichnis

- Adam, S.A. (1999) Transport pathways of macromolecules between the nucleus and the cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 402-406.
- Aitchison, J.D., Blobel, G., and Rout, M.P. (1995a). Nup120p: a yeast nucleoporin required for NPC distribution and mRNA transport. *J. Cell Biol.*, **131**, 1659-1675.
- Aitchison, J.D., Rout, M.P., Marelli, M., Blobel, G., and Wozniak, R.W. (1995b). Two novel related yeast nucleoporins Nup170p and Nup157p: complementation with the vertebrate homologue Nup155p and functional interactions with the yeast nuclear pore-membrane protein Pom152p. *J Cell Biol*, **131**, 1133-1148.
- Aitchison, J.D., Blobel, G., and Rout, M.P. (1996). Kap104p: a karyopherin involved in the nuclear transport of messenger RNA binding proteins. *Science*, **274**, 624-27.
- Akey, C.W. (1989). Interactions and structure of the nuclear pore complex revealed by cryo-electron microscopy. *J Cell Biol*, **109**, 955-970.
- Akey, C.W. (1990). Visualisation of transport-related configurations of the nuclear pore transporter. *Biophys J*, **58**, 341-355.
- Akey, C.W., and Radermacher, M., (1993). Architecture of the *Xenopus* nuclear pore complex revealed by three-dimensional cryo-electron microscopy. *J Cell Biol*, **122**, 1-19.

- Allen, N.P.C., Huang, L., Burlingame, A., and Rexach, M. (2001). Proteomic analysis of nucleoporin interacting proteins. *J Biol Chem*, **276**, 29268-29274.
- Allen, T.D., Cronshaw, J.M., Bagley, S., Kiseleva, E., und Goldberg, M.W. (2000) The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J. Cell Sci.*, **113**, 1651-1659.
- Arts, G.J., Fornerod, M., and Mattaj, I.W. (1998a). Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr.Biol.*, **8**, 305-314.
- Arts, G.J., Kuersten, S., Romby, P., Ehresmann, B, and Mattaj, I.W. (1998b). The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNAs. *EMBO J.*, **17**, 7430-7441.
- Azuma, Y., und Dasso, M. (2000) The role of Ran in nuclear function. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 302-307.
- Bacchi, A., Braun, I.C., Rodrigues, J.P., Panté, N., Ribbeck, K., von Kobbe, C., Kutay, U., Wilm, M., Görlich, D., Carmo-Fonseca, M., and Izaurralde, E. (2000). The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates. *RNA*, **6**, 136-158.
- Bailer, S.M., Siniosoglou, S., Podtelejnikov, A.V., Hellwig, A., Mann, M., and Hurt, E.C. (1998). Nup116p and Nup100p are interchangeable through a conserved motif which constitutes a docking site for the mRNA transport factor Gle2p. *EMBO J.* **17**, 1107-1119.
- Bailer, S.M., Balduf, C., Kathira, J., Podtelejnikov, A., Rollenhagen, C., Mann, M., Panté, N., and Hurt, E. (2000). Nup116p Associates with the Nup82p-Nsp1p-Nup159p Nucleoporin Complex. *J.Biol.Chem.* **275**, 23540-23548.
- Bayliss, R., Leung, S.W., Baker, R.P., Quimby, B.B., Corbett, A.H., and Stewart, M. (2002). Structural basis for the interaction between NTF2 and nucleoporin FxFG repeats. *EMBO J*, **21**, 2843-2853.
- Bayliss, R., Littlewood, T., and Stewart, M. (2000). Structural Basis for the Interaction between FxFG Nucleoporin Repeats and Importin-beta in Nuclear Trafficking. *Cell* **102**, 99-108.
- Bäßler, J., Grandi, P., Gadai, O., Leßmann, T., Perfalski, E., Tollerevy, D., Lechner, J., and Hurt, E. (2001). Identification of a 60S Preribosomal Particle that Is Closely Linked to Nuclear Export. *Mol Cell*, **8**, 517-529.

- Bear, J., Tan, W., Zolotukhin, A.S., Tabernero, C., Hudson, E.A., and Felber, B.K. (1999). Identification of novel import and export signals of human TAP, the protein that binds to the constitutive transport element of the type D retrovirus mRNAs. *Mol Cell Biol*, **19**, 6306-6317.
- Belgareh, N., Snay-Hodge, C., Pasteau, F., Dagher, S., Cole, C. N. and Doye, V. (1998). Functional characterization of a Nup159p-containing nuclear pore subcomplex. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 3475-3492.
- Belgareh, N., Rabut, G., Bai, S.W., van Overbeek, M., Beaudouin, J., Daigle, N., Zatsepina, O. V., Pasteau, F., Labas, V., Fromont-Racine, M., Ellenberg, J. and Doye, V. (2001). An evolutionarily conserved NPC subcomplex, which redistributes in part to kinetochores in mammalian cells. *J Cell Biol.*, **154**, 1147-1160.
- Bender, A., and Pringle, J.R. (1991). Use of a screen for synthetic lethal and multicopy suppressor mutants to identify two new genes involved in morphogenesis in *S.cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **11**, 1295-1305.
- Berlanger, K.D., Kenna, M.A., Wei, S., and Davis, L.I. (1994). Genetic and physical interactions between Srp1p and nuclear pore complex proteins Nup1p and Nup2p. *J Cell Biol*, **126**, 619-630.
- Bodoor, K., Shaikh, S., Salina, D., Raharjo, W.H., Bastos, R., Lohka, M., and Burke, B. (1999). Sequential recruitment of NPC proteins to the nuclear periphery at the end of mitosis. *J Cell Sci*, **112**, 2253-64.
- Callan, H.G., Randall, J.T., and Tomlin, S.G. (1949). An electron microscope study of the nuclear membrane. *Nature*, **163**, 280-281.
- Carmo-Fonseca, M., Kern, H., and Hurt, E.C. (1991). Human nucleoporin p62 and the essential yeast nuclear pore protein NSP1 show sequence homology and a similar domain organization. *Eur J Cell Biol*, **55**, 17-30.
- Chaillan-Huntingdon, C., Braslavsky, C.V., Kuhlmann, J. and Stewart, M., (2000). Dissecting the interactions between NTF2, RanGDP, and the nucleoporin XFXFG repeats. *J Biol Chem.*, **275**, 5874-5879.
- Chook, Y.M. and Blobel, G. (1999). Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-GppNHp. *Nature*, **399**, 230-237.

- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K., and Müller, C.W. (1999). Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature*, **399**, 221-229.
- Clarke, P.R., and Zhang, C. (2001). RanGTPase: A master regulator of nuclear structure and function during eukaryotic cell division cycle?. *TICB*, **11**, 366-71
- Conti E. and Izaurralde, E., (2001). Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age. *Curr Opin Cell Biol.*, **13**, 310-319.
- Daigle, N., Beaudouin, J., Hartnell, L., Imreh, G., Hallberg, E., Lippincott-Schwartz, J., and Ellenberg, J. (2001). Nuclear pore complexes form immobile networks and have a very low turnover in live mammalian cells. *J Cell Biol*, **154**, 71-84
- Dasso, M. (2001). Running on Ran: nuclear transport and the mitotic spindle. *Cell*, **104**, 321-24
- Davis, L.I. (1995). The nuclear pore complex. *Annu. Rev. Biochem.*, **35**, 865-96.
- Del Priore, S., Snay, C.A., Bahr, A., and Cole, C.N. (1996). The product of the *Saccharomyces cerevisiae* *RSS1* gene, identified as a high-copy suppressor of the *rat7-1* temperature-sensitive allele of the *RAT7/NUP159* nucleoporin, is required for efficient mRNA export. *Mol.Biol.Cell* **7**, 1601-1621.
- Doye, V., Wepf, R., and Hurt, E.C. (1994). A novel nuclear pore protein Nup133p with distinct roles in poly (A)⁺ RNA transport and nuclear pore distribution. *EMBO J.* **13**, 6062-6075.
- Doye, V. and Hurt, E.C., (1995). Genetic approaches to nuclear pore structure and function. *Trends Genet.*, **11**, 235-241.
- Doye, V., und Hurt, E.C. (1997) From nucleoporins to nuclear pore complexes. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**, 401-411.
- Drummond, S.P., and Wilson, K.L. (2002). Interference with the cytoplasmic tail of gp210 disrupts "close apposition" of nuclear membranes and blocks nuclear dilation. *J Cell Biol*, **158**, 53-62.
- Englmeier, L., Olivo, J.C., and Mattaj, I.W., (1999). Receptor-mediated substrate translocation through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis. *Curr Biol*, **9**, 30-41.

- Fabre, E., Boelens, W.C., Wimmer, C., Mattaj, I.W., and Hurt, E.C. (1994). Nup145p is required for nuclear export of mRNA and binds homopolymeric RNA in vitro via a novel conserved motif. *Cell*, **78** 275-89.
- Fabre, E., and Hurt, E., (1997). Yeast genetics to dissect the nuclear pore complex and nucleocytoplasmic trafficking. *Annu Rev Genet.*, **31**, 277-313.
- Fahrenkrog, B., Hurt, E.C., Aebi, U., und Panté, N. (1998) Molecular Architecture of the Yeast Nuclear Pore Complex: Localization of Nsp1p Subcomplexes. *J. Cell Biol.*, **143**, 577-588.
- Fahrenkrog, B., Hubner, W., Mandinova, A., Panté, N., Keller, W., and Aebi, U. (2000a). The yeast nucleoporin Nup53p specifically interacts with Nic96p and is directly involved in nuclear protein import. *Mol Biol Cell*, **11**, 3885-3896.
- Fahrenkrog, B., Aris, J.P., Hurt, E.C., Panté, N., and Aebi, U. (2000b). Comparative spatial localization of ProteinA-tagged and authentic yeast nuclear pore complex proteins by immunogold electron microscopy. *J Struct Biol*, **129**, 295-305.
- Fahrenkrog, B., Stoffler, D. and Aebi, U., (2001). Nuclear pore complex architecture and functional dynamics. *Curr Top Microbiol Immunol.*, **259**, 95-117.
- Fatica, A., Cronshaw, A.D., Dlakic, M., and Tollervey, D. (2002). Ssf1p prevents premature processing of an early pre-60S ribosomal prticle. *Mol Cell*, **9**, 341-351.
- Fatica, A. and Tollervey, D. (2002). Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol*, **14**, 313-318.
- Feldherr, C., Akin, D., and Moore, M. (1998). The nuclear import factor p10 regulates the functional size of the nuclear pore complex during oogenesis. *J Cell Sci*, **111**, 1889-96.
- Feng, W., and Hopper, A.K. (2002). A Los1p-independent pathway for nuclear export of intronless tRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *PNAS*, **99**, 5412-5417.
- Floer, M., Blobel, G., and Rexach, M. (1997). Disassembly of RanGTP-karyopherin beta complex, an intermediate in nuclear protein import. *J Biol Chem*, **272**, 19538-46.
- Fornierod, M., van Deursen, J., van Baal, S., Reynolds, A., Davis, D., Mutri, K.G., Fransen, J., and Grosveld, G. The human homologue of yeast CRM1 is in a dynamic subcomplex with CAN/Nup214 and a novel nuclear pore component Nup88. *EMBO J*, **16**, 807-816.

- Gadal, O., Strauß, D., Braspenning, J., Hoepfner, D., Petfalski, E., Philippsen, P., Tollervey, D., and Hurt, E.C., (2001a). A nuclear AAA-type ATPase (Rix7p) is required for biogenesis and nuclear export of 60S ribosomal subunits. *EMBO J*, **20**, 3695-3704.
- Gadal, O., Strauß, D., Kessl, J., Trumppower, B., Tollervey, D., and Hurt, E., (2001b). Nuclear export of 60S ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a NES-containing factor Nmd3p that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol Cell Biol*, **21**, 3405-3415.
- Gallouzi, I.E., and Steitz, J.A. (2001). Delineation of mRNA export pathways by the use of cell-permeable peptides. *Science*, **294**, 1895-1901.
- Galy, V., Olivo-Marin, J.C., Scherthan, H., Doye, V., Rascalou, N. and Nehrbass, U., (2000). Nuclear pore complexes in the organization of silent telomeric chromatin. *Nature*, **403**, 108-12
- Gatfield, D., Le Hir, H., Schmitt, C., Braun, I.C., Kocher, T., Wilm, M., and Izaurralde, E. (2001). The DexH/D box protein HEL/UAP56 is essential for mRNA nuclear export in *Drosophila*. *Curr Biol*, **11**, 1716-1721.
- Gavin, A.C., Borsche, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M. et al. (2002). Functional organization of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, **415**, 141-147.
- Gleizes, P.E., Noaillac-Depeyre, J., Leger-Silvestre, I., Teulieres, F., Dauxois, J.Y., Pommet, D., Azum-Gelade, M.C. and Gas, N. (1999). Ultrastructural localization of rRNA shows defective nuclear export of preribosomes in mutants of the Nup82p complex. *J Cell Biol*, **155**, 923-936.
- Goldberg, M.W., and Allen, T.D. (1996). The nuclear pore complex and lamina: three-dimensional structure and interactions determined by field emission in-lens scanning electron microscopy. *J Mol Biol*, **257**, 848-865.
- Goldberg, M.W. and Allen, T.D., (1995). Structural and functional organization of the nuclear envelope. *Curr Opin Cell Biol.*, **7**, 301-309.
- Goldberg, M.W., Wiese, C., Allen, T.D., and Wilson, K.L. (1997). Dimples, pores, star-rings, and thin rings on growing nuclear envelopes: evidence for structural intermediates in nuclear pore complex assembly. *J Cell Sci*, **110** 409-20.

- Gomez-Ospina, N., Morgan, G., Giddings, T.H. Jr., Kosova, B., Hurt, E., and Winey, M. (2000). Yeast nuclear pore complex assembly defects determined by nuclear envelope reconstruction. *J Struct Biol*, **132**, 1-5.
- Görlich, D., und Kutay, U. (1999) Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **15**, 607-660.
- Görlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F.R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S., und Izaurralde, E. (1997) A novel class of RanGTP binding proteins. *J. Cell Biol.*, **138**, 65-80.
- Görlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R.A., Hartmann, E., und Prehn, S. (1995) Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope. *Curr. Biol.*, **5**, 383-392.
- Gorsch, L.C., Dockendorff, T.C., und Cole, C.N. (1995) A conditional allele of the novel repeat-containing yeast nucleoporin *RAT7/NUP159* causes both rapid cessation of mRNA export and reversible clustering of nuclear pore complexes. *J. Cell Biol.*, **129**, 939-955.
- Grandi, P., Doye, V., and Hurt, E. (1993). Purification of NSP1 reveals complex formation with "GLFG" nucleoporins and a novel nuclear pore protein NIC96. *EMBO-J*, **12**, 3061-71.
- Grandi, P., Schlaich, N., Tekotte, H., Hurt, E.C. (1995a) Functional interaction of Nic96p with a core nucleoporin complex consisting of Nsp1p, Nup49p and a novel protein Nup57p. *EMBO J.*, **14**, 76-87
- Grandi, P., Emig, S., Weise, C., Hucho, F., Pohl, T., and Hurt, E.C. (1995b). A novel nuclear pore protein Nup82p which specifically binds to a fraction of Nsp1p. *J. Cell Biol.* **130**, 1263-1273.
- Grandi, P., Dang, T., Panté, N., Shevchenko, A., Mann, M., Forbes, D., and Hurt E. (1997). Nup93, a vertebrate homologue of yeast Nic96p, forms a complex with a novel 205-kDa protein and is required for correct nuclear pore assembly. *Mol Cell Biol*, **8**, 2017-38.
- Grandi, P., Rybin, V., Baßler, J., Petfalski, E., Strauß, D., Marzioch, M., Schäfer, T., Kuster, B., Tschochner, H., Tollervey, D., Gavin, A.-C., Hurt, E. (2002). The 90S pre-

- ribosomal particles includes the 35S pre-rRNA, the U3 snoRNAP and associated processing factors. *Mol Cell*, **10**, 1-20.
- Großhans, H., Hurt, E., und Simos, G. (2000a) An aminoacylation-dependent nuclear tRNA export pathway in yeast. *Genes Dev.*, **14**, 830-840.
- Großhans, H., Simos, G., und Hurt, E. (2000b) Review: transport of tRNA out of the nucleus - direct channeling to the ribosome? *J. Struct. Biol.*, **129**, 288-294.
- Grüter, P., Tabernero, C., von Kobbe, C., Schmitt, C., Saavedra, C., Bachi, A., Wilm, M., Felber, B.K., and Izaurralde, E. (1998). TAP, the human homolog of Mex67p, mediates CTE-dependent RNA export from the nucleus. *Moll Cell*, **1**, 649-659.
- Guthrie, C. Fink, G.R. (eds.) (1991) *Guide to yeast genetics and molecular biology*. Academic Press, Pasadena.
- Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Horsey, E., Miles, T., Roman, J., Rout, M., Meagher, D., Imai, B., Guo, Y., Brame, C.J., et al. (2001). Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. *Mol Cell*, **8**, 505-515.
- Hartmann, E., and Görlich, D. (1995). A ran-binding motif in nuclear pore proteins. *Trends in cell Biology*, **5**, 192-192.
- Hinshaw, J.E., Carragher, B.O., and Miligan, R.A. (1992). Architecture and design of the nuclear pore complex. *Cell*, **69**, 1133-1141.
- Ho, Y., Gruhler, A., Heilbut, A., Bader, G.D., Moore, L., Adams, S.L., Miller, A., Taylor, P., Bennett, K., Boutilier, K. et al. (2002). Systematic identification of protein complexes in *Saccharomyces cerevisiae* by mass spectrometry. *Nature*, **415**, 180-183.
- Ho, J.H., Kallstrom, G., Johnson, A.W. (2000a). Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. *J Cell Bio*, **151**, 1057-66.
- Ho, J.H., Kallstrom, G., Johnson, A.W. (2000b). Nascent 60S ribosomal subunits enter the free pool bound by Nmd3p. *RNA*, **6**, 1625-1634.
- Ho, I.K., Shen, T.X., Ryan, K.J., Kiseleva, E., Aach Levy, M., Allen, T.D., and Wentz, S. (2000). Assembly and preferential localization of Nup166p on the cytoplasmic face of the nuclear pore complex by interaction with Nup82p. *Mol Cell Biol*, **20**, 5736-48
- Hodge, C.A., Colot, H.V., Stafford, P, and Cole, C.N. (1999). Rat8p/Dbp5p is a shuttling transport factor that interacts with Rat7p/Nup159p and Gle1p and suppresses the mRNA export defect of xop1-1 cells. *EMBO J*, **18**, 5778-5788.

- Hood, J.K., Casolari, J.M., and Silver, P.A. (2000). Nup2p is located on the nuclear side of the nuclear pore complex and coordinates Srp1p/importin-alpha export. *J Cell Sci*, **113**, 1471-1480.
- Hu, T., Guan, T., and Gerace, L. (1996). Molecular and functional characterization of the p62 complex, an assembly of nuclear pore complex glycoproteins. *J Cell Biol*, **134**, 589-601.
- Huffaker, T.C., Hoyt, M.A. and Botstein, D. (1987). Genetic analysis of the yeast cytoskeleton. *Annu Rev Genet*, **21**, 259-284.
- Hurt, E., Sträßer, K., Segref, A., Bailer, S., Schlaich, N., Presutti, C., Tollervey, D., and Jansen, R. (2000) Mex67p mediates nuclear export of a variety of RNA polymerase II transcripts. *J. Biol. Chem.*, **275**, 8361-8368.
- Hurt, D.J., Wang, S.S., Yu-Huei, L., and Hopper, A.K. (1987). Cloning and characterization of *LOS1*, a *Saccharomyces cerevisiae* gene that affects tRNA splicing. *Mol.Cell.Biol.*, **7**, 1208-1216.
- Hurwitz, M.E., Strambio-de-Castillia, C., and Blobel, G. (1998). Two yeast nuclear pore complex proteins involved in mRNA export form a cytoplasmically oriented subcomplex. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* , **95**, 11241-11245.
- Iovine, M.K. and Wentz, S.R. (1997). A nuclear export signal in Kap95p is required for both recycling the import factor and interaction with the nucleoporin GLFG repeat regions of Nup116p and Nup100p. *J.Cell Biol.*, **137**, 797-811.
- Itoh, H., Fukada, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact cells with alkali cations. *J.Bacteriol.*, **153**, 163-168.
- Izaurrealde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I.W., und Görlich, D. (1997) The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J.*, **16**, 6535-6547.
- Kaffman, A., and O'Shea, E.K., (1999). Regulation of nuclear localization: a key to a door. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **15**, 291-339.
- Katahira, J., Sträßer, K., Saiwaki, T., Yoneda, Y., and Hurt. E. (2002). Complex formation between Tap and p15 affects binding to FG-repeat nucleoporins and nucleocytoplasmic shuttling. *J Biol Chem*, **277**, 9242-9246.

- Katahira, J., Sträßer, K., Podtelejnikov, A., Mann, M., Jung, J.U., und Hurt, E. (1999). The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *EMBO J.*, **18**, 2593-2609.
- Keminer, O., Siebrasse, J.P., Zerf, K., and Peters, R. (1999). Optical recording of signal-mediated protein transport through single nuclear pore complexes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **96**, 11842-11847.
- Kiseleva, E., Goldberg, M.W., Allen, T.D., and Akey, C.W., (1998). Active nuclear pore complexes in *Chironomus*: visualisation of transporter configurations related to mRNP export. *J Cell Sci*, **111**, 223-236.
- Kolling, R., Nguyen, T., Chen, E.Y., and Botstein, D. (1993). A new yeast gene with a myosin-like heptad repeat structure. *Mol. Gen Genet.*, **237**, 359-69
- Kosova, B., Panté, N., Rollenhagen, C. and Hurt, E. (1999). Nup192p is a conserved nucleoporin with a preferential location at the inner site of the nuclear membrane. *J Biol Chem*, **274**, 22646-51.
- Kosova, B., Pante, N., Rollenhagen, C., Podtelejnikov, A., Mann, M., Aebi, U. and Hurt, E., (2000). Mlp2p, a component of nuclear pore attached intranuclear filaments, associates with nic96p. *J Biol Chem.*, **275**, 343-350.
- Krämer, D.M., Strambio-de-Castillia, C., Blobel, G., and Rout, M.P. (1995). The essential yeast nucleoporin NUP159 is located on the cytoplasmic side of the nuclear pore complex and serves in karyopherin-mediated binding of transport substrate. *J Biol Chem*, **270**, 19017-19021.
- Krämer, D., Wozniak, R.W., Blobel, G., and Radu, A. (1994). The human CAN protein, a putative oncogene product associated with myeloid leukemogenesis, is a nuclear pore complex protein that faces the cytoplasm. *PNAS*, **91**, 1519-1523.
- Kressler, D., Lindner, P., and de la Cruz, J. (1999). Protein *trans*-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Moll Cell Biol*, **19**, 7897-7912.
- Kutay, U., Lipowsky, G., Izaurralde, E., Bischoff, F.R., Schwarzmaier, P., Hartmann, E., and Görlich, D. (1998). Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. *Mol. Cell*, **1**, 359-369.

- Lee, M.S., Henry, M., and Silver, P.A. (1996). A protein that shuttles between the nucleus and the cytoplasm is an important mediator of RNA export. *Genes Dev*, **10**, 1233-1246.
- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E., and Moore, M.J. (2001). The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J*, **20**, 4987-4997.
- Lei, E.P., Krebber, H., and Silver, P.A. (2001). Messenger RNAs are recruited for nuclear export during transcription. *Genes Dev*, **15**, 1771-1782.
- Li, Heath, C.V., Amberg, D.C., Dockendorff, T.C., Copeland, C.S., and Cole, C.N. (1995). Mutation or deletion of the *Saccharomyces cerevisiae* RAT3/NUP133 gene causes temperature-dependent nuclear accumulation of poly(A)⁺RNA and constitutive clustering of nuclear pore complexes. *Mol Biol Cell*, **6**, 401-417.
- Lipowsky, G., Bischoff, F.R., Izaurralde, E., Kutay, U., Schäfer, S., Gross, H.J., Beier, H., and Görlich, D. (1999). Coordination of tRNA nuclear export with processing of tRNA. *RNA Publ.RNA Soc.*, **5**, 539-549.
- Longtine et al., 1998, *Yeast*, **14**, 953-61: Yeast functional analysis reports: additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *S.cerevisiae*.
- Lund, E. and Dahlberg, J.E. (1998). Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. *Science*, **282**, 2082-2085.
- Luo, M.-J., Zhou, Z., Magni, K., Christoforides, C., Rappsilber, J., Mann, M., and Reed, R. (2001). Pre-mRNA splicing and mRNA export linked by direct interactions between UAP56 and Aly. *Nature*, **413**, 644-647.
- Lupas, A., VanDykes, M., and Stock, J. (1999). Predicting coiled coils from protein sequence. *Science*, **252**, 1162-1164.
- Miller, B.R., Powers, M., Park, M., Fischer, W., and Forbes, D.J. (2000). Identification of a new vertebrate nucleoporin, Nup188, with the use of a novel organelle trap assay. *Mol Biol Cell*, **11**, 3381-3396.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., and Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2. *Cell*, **88**, 97-107.

- Maniatis, T., Fritsch, E.T., and Sambrook, J. (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Marelli, M., Aitchison, J.D., and Wozniak, R.W. (1998). Specific binding of the karyopherin Kap121p to a subunit of the nuclear pore complex containing Nup53p, Nup59p, and Nup170p. *J Cell Biol*, **143**, 1813-1830.
- Mattaj, I.W., und Englmeier, L., (1998) Nucleocytoplasmic transport: The soluble phase. *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 265-306. Maurer et al., 2001, *MBC*, 12, 539-52
- Milkereit, P., Gadal, O., Podtelejnikov, A., Trumtel, S., Gas, N., Petfalski, E., Tollervey, D., Mann, M., Hurt, E., and Tschochner, H., (2001). Maturation of pre-ribosomes requires noc-proteins and is coupled to transport from the nucleolus to the nucleoplasm. *Cell*, **105**, 499-509.
- Miller, B.R. and Forbes, D.J. (2000). Purification of the vertebrate nuclear pore complex by biochemical criteria. *Traffic*, **1**, 941-51.
- Mingot, J.M., Kostka, S., Kraft, R., Hartmann, E., and Görlich, D. (2001). Importin13: a novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J*, **20**, 3685-3694.
- Moy, T.I. and Silver, P.A. (1999). Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the RanGTP cycle and certain nucleoporins. *Genes Dev*, **13**, 2118-2133.
- Murphy, R., Watkins, J.L., und Wentz, S.R. (1996) *GLE2*, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of the *Schizosaccharomyces pombe* export factor *RAE1*, is required for nuclear pore complex structure and function. *Mol. Biol. Cell*, **7**, 1921-1937.
- Mutvei, A., Dihlmann, S., Herth, W., and Hurt, E.C. (1992). NSP1 depletion in yeast affects nuclear pore formation and nuclear accumulation. *Eur J Cell Biol*, **59**, 280-295.
- Nakielnny, S., Shaikh, S., Burke, B., and Dreyfuss, G. (1999). Nup153 is an M9 containing mobile nucleoporin with a novel Ran-binding domain. *EMBO J*, **18**, 1982-1995.
- Nehrbass, U., Fabre, E., Dihlmann, S., Herth, W., and Hurt, E.C. (1993). Analysis of nucleo-cytoplasmic transport in a thermosensitive mutant of nuclear pore protein NSP1. *Eur J Cell Biol*, **62**, 1-12.
- Nehrbass, U., Rout, M.P., Maguire, S., Blobel, G., and Wozniak, R.W. (1996). The yeast nucleoporin Nup188p interacts genetically and physically with the core structures of the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, **133**, 1153-62.

- Nissan, T., Baßler, J., Petfalski, E., Tollervey, D., and Hurt, E. (2002). Pre-60S particles on the road to ribosomes. *EMBO J*, eingereicht.
- Noguchi, E., Hayashi, N., Nakashima, N., and Nishimoto, T. (1997). Yrb2p, a Nup2p-related yeast protein, has a functional overlap with Rna1p, a yeast Ran-GTPase-activating protein. *Mol Cell Biol*, **17**, 2235-2246.
- Ohno, M., Fornerod, M., und Mattaj, I.W. (1998) Nucleocytoplasmic transport: The last 200 nanometers. *Cell*, **92**, 327-336.
- Pemberton, L.F., Rout, M.P., and Blobel, G. (1995). Disruption of the nucleoporin gene NUP133 results in clustering of nuclear pore complexes. *PNAS*, **92**, 1187-1191.
- Pemberton, L.F., Blobel, G., and Rosenblum, J.S. (1998). Transport routes through the nuclear pore complex. *Curr.Opin.Cell Biol.*, **10**, 392-399. Reed und Hurt, 2002, *Cell*, **108**, 523-31.
- Pemberton, L.F., Rosenblum, J.S., and Blobel, G. (1999). Nuclear import of the TATA-binding protein: mediation by the karyopherin Kap114p and a possible mechanism for intranuclear targeting. *J Cell Biol*, **145**, 1407-1417.
- Powers, M.A., Forbes, D.J., Dahlberg, J.E., and Lund, E. (1997). The vertebrate GLFG nucleoporin, Nup98, is an essential component of multiple RNA export pathways. *J Cell biol*, **136**, 241-250.
- Pritchard, C.E., Fornerod, M., Kasper, L.H., van Deursen, J.M. (1999). RAE1 is a shuttling mRNA export factor that binds to a GLEBS-like NUP98 motif at the nuclear pore complex through multiple domains. *J Cell Biol*, **145**, 237-254.
- Reed, R., and Hurt, E., (2002). A Conserved mRNA Export Machinery Coupled to pre-mRNA Splicing. *Cell*, **108**, 523-531.
- Rexach, M. and Blobel, G. (1995). Protein import into nuclei: Association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins. *Cell*, **83**, 683-692.
- Ribbeck, K. and Görlich, D. (2002). The permeability barrier of nuclear pore complexes appears to operate via hydrophobic exclusion. *EMBO J*, **21**, 2664-2671.
- Ribbeck, K. and Görlich, D. (2001). Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J*, **20**, 1320-1330.

- Ribbeck, K., Kutay, U., Paraskeva, E., and Görlich, D. (1999). The translocation of transportin-cargo complexes through nuclear pores is independent of both Ran and energy. *Curr Biol*, **9**, 47-50.
- Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H.M., Stewart, M., Görlich, D., (1998). NTF2 mediates nuclear import of Ran. *EMBO J*, **17**, 6587-6598.
- Roberts, P.M., and Goldfarb, D.S. (1998). In vivo nuclear transport kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Cell Biol*, **53**, 545-557.
- Rout, M.P., Aitchison, J.D., Suprapto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., und Chait, B.T. (2000) The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J. Cell Biol.*, **148**, 635-651.
- Rout, M. P. and Blobel, G., (1993). Isolation of the yeast nuclear pore complex. *J Cell Biol.*, **123**, 771-783.
- Ryan, K.J., und Wentz, S.R. (2000) The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **12**, 361-371.
- Sambrook, J., Fritsch, E.T., und Maniatis, T. (eds.) (1989) *Molecular Cloning*. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor. Sarkar und Hopper, 1998, *MBC*, **9**, 3041-55
- Santos-Rosa, H., Moreno, H., Simos, G., Segref, A., Fahrenkrog, B., Panté, N., and Hurt, E. (1998). Nuclear mRNA export requires complex formation between Mex67p and Mtr2p at the nuclear pores. *Moll Cell Biol*, **18**, 6826-6838.
- Saveanu, C., Bienvenu, D., Namane, A., Gleizes, P.-E., Gas, M., Jacquier, A., and Fromont-Racine, M. (2001). Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *EMBO J*, **20**, 6475-6484.
- Schlaich et al., 1997, *MBC*, **8**, 33-46: In vitro reconstitution of a heterodimeric nucleoporin complex consisting of recombinant Nsp1p, Nup49p and Nup57p
- Schlaich, N. L. and Hurt, E. C., (1995). Analysis of nucleocytoplasmic transport and nuclear envelope structure in yeast disrupted for the gene encoding the nuclear pore protein Nup1p. *Eur J Cell Biol.*, **67**, 8-14.
- Schlenstedt, G., Hurt, E., Doye, V., and Silver, P.A. (1993). Reconstitution of nuclear protein transport with semi-intact yeast cells. *J Cell Biol*, **123**, 785-798.

- Schlenstedt, G., Smirnova, E., Deane, R., Solsbacher, J., Kutay, U., Görlich, D., Ponstigl, H., and Bischoff, F.R. (1997). Yrb4p, a yeast Ran-GTP-binding protein involved in import of ribosomal protein L25 into the nucleus. *EMBO J*, **16**, 6237-6249.
- Schmitt, I., Gerace, L. (2001). In vitro analysis of nuclear transport mediated by the C-terminal shuttle domain of Tap. *J Biol Chem*, **276**, 42355-42363.
- Schmitt, C., Von Kobbe, C., Bachi, A., Panté, N., Rodrigues, J.P., Boscheron, C., Rigaut, G., Wilm, M., Séraphin, B., Carmo-Fonseca, M., and Izaurralde, E. (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. *EMBO J.*, **18**, 4332-4347.
- Seedorf, M., Damelin, M., Kahana, J., Taura, T., and Silver, P.A. (1999). Interactions between a nuclear transporter and a subset of nuclear pore complex proteins depends on RanGTPase. *Moll Cell Biol*, **19**, 1547-1575.
- Segref, A., Sharma, K., Doye, V., Hellwig, A., Huber, J., und Hurt, E.C. (1997) Mex67p which is an essential factor for nuclear mRNA export binds to both poly(A)⁺ RNA and nuclear pores. *EMBO J.*, **16**, 3256-3271. Sharma et al., 1996, *MCB*, 16, 294-30
- Senger, B., Simos, G., Bischoff, F.R., Podtelejnikov, A.V., Mann, M., und Hurt, E.C. (1998) Mtr10p functions as a nuclear import receptor for the mRNA binding protein Npl3p. *EMBO J.*, **17**, 2196-2207.
- Sherman, F. (1990). Guide to yeast genetics and molecular biology. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.*, **194**, 3-20.
- Shah, S., and Forbes, D.J. (1998). Separate nuclear import pathways converge on the nucleoporin Nup153 and can be dissected with dominant-negative inhibitors. *Curr Biol*, **8**, 1376-1386.
- Shah, S., Tugendreich, S., and Forbes, D.J. (1998). Major binding sites for the nuclear import receptor are the internal nucleoporin Nup153 and the adjacent nuclear filament protein Tpr. *J Cell Biol*, **141**, 31-49.
- Shulga, N., Mosammaparast, N., Wozniak, R. and Goldfarb, D.S. (2000). Yeast nucleoporins involved in passive nuclear envelope permeability. *J Cell Biol*, **149**, 1027-38.

- Shulga, N., Roberts, P., Gu, Z., Spitz, L., Tabb, M.M., Nomura, M., and Goldfarb, D.S. (1996). In vivo nuclear transport kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*: a role for heat shock protein 70 during targeting and translocation. *J Cell Biol*, **135**, 329-339.
- Sikorski, R.S. and Hieter, R. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **122**, 19-27.
- Simos, G., Tekotte, H., Grosjean, H., Segref, A., Sharma, K., Tollervey, D., und Hurt, E.C. (1996) Nuclear pore proteins are involved in the biogenesis of functional tRNA. *EMBO J.*, **15**, 2270-2284.
- Singleton, D.R., Chen, S., Hitomi, M., Kumagai, C., and Tartakoff, A.M. (1995). A yeast protein that bidirectionally affects nucleocytoplasmic transport. *J Cell Sci*, **108**, 265-272.
- Siniossoglou, S., Wimmer, C., Rieger, M., Doye, V., Tekotte, H., Weise, C., Emig, S., Segref, A., and Hurt, E.C. (1996). A novel complex of nucleoporins, which includes Sec13p and a Sec13p homolog, is essential for normal nuclear pores. *Cell*, **84**, 265-275.
- Siniossoglou, S., Grandi, P., and Hurt, E.C. (1998). Affinity purification of ProteinA-tagged nuclear pore proteins from yeast. *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, **vol.2**, 159-164.
- Siniossoglou, S., Lutzmann, M., Santos-Rosa, H., Leonard, K., Mueller, S., Aebi, U. and Hurt, E., (2000). Structure and assembly of the Nup84p complex. *J Cell Biol.*, **149**, 41-54.
- Solsbacher, J., Maurer, P., Vogel, F., and Schlenstedt, G. (2000). Nup2p, a yeast nucleoporin, functions in bidirectional transport of importin alpha. *Mol Cell Biol*, **20**, 8468-79.
- Stage-Zimmermann, T., Schmidt, U. and Silver, P.A. (2000). Factors affecting nuclear export of the 60S ribosomal subunit *in vivo*. *Mol Biol Cell*, **11**, 3777-3789.
- Stoffler, D., Fahrenkrog, B., und Aebi, U. (1999a) The nuclear pore complex: from molecular architecture to functional dynamics. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **11**, 391-401.

- Stoffler, D., Goldie, K.N., and Aebi, U. (1999b). Calcium-mediated structural changes of native nuclear pore complexes monitored by time-lapse atomic force microscopy. *J Mol Biol*, **287**, 741-52.
- Strahm, Y., Fahrenkrog, B., Zenklusen, D., Rychner, E., Kantor, J., Rosbash, M., and Stutz, F. (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. *EMBO J.*, **18**, 5761-5777.
- Strambio-de-Castillia, C., Blobel, G., and Rout, M.P. (1999). Proteins connecting the nuclear pore complex with the nuclear interior. *J Cell Biol*, **144**, 839-55.
- Strawn, L.A., Shen, T., and Wentz, S.R. (2001). The GLFG regions of Nup116p and Nup100p serve as binding sites for both Kap95p and Mex67p at the nuclear pore complex. *J Cell Biol*, **276**, 445-6452.
- Sträßer, K., Baßler, J., and Hurt, E. (2000) Binding of the Mex67p/Mtr2p heterodimer to FXFG, GLFG, and FG repeat nucleoporins is essential for nuclear mRNA export. *J. Cell. Biol.*, **150**, 695-706. Taura et al., 1997, *JBC*, *272*, 31877-84
- Sträßer, K., and Hurt, E. (2000) Yra1p, a conserved nuclear RNA-binding protein, interacts directly with Mex67p and is required for mRNA export. *EMBO J.*, **19**, 410-420.
- Sträßer, K. and Hurt, E. (2001). Splicing factor Sub2p is required for nuclear export through its interaction with Yra1p. *Nature*, **413**, 648-652.
- Sträßer, K., Masuda, S., Mason, P., Pfannstiel, J., Oppizzi, M., Rodriguez-Navarro, S., Rondon, A.G., Aguilera, A., Struhl, K., Reed, R., and Hurt, E. (2002). TREX is a conserved complex coupling transcription with messenger RNA export. *Nature*, **417**, 304-308.
- Stutz, F., Neville, M., and Rosbash, M. (1995). Identification of a novel nuclear pore-associated protein as a functional target of the HIV-1 Rev protein in yeast. *Cell*, **82**, 495-506.
- Stutz, F., Bachi, A., Doerks, T., Braun, I.C., Séraphin, B., Wilm, M., Bork, P., and Izaurralde, E. (2000). REF, an evolutionary conserved family of hnRNP-like proteins, interacts with TAP/Mex67p and participates in mRNA nuclear export. *RNA*, **6**, 638-650.

- Taura, T., Krebber, H., and Silver, P.A., (1998). A member of the Ran-binding protein family, Yrb2p, is involved in nuclear protein export. *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 7427-7432.
- Teixeira, M. T., Siniosoglou S., Podtelejnikov, S., Benichou, J.C., Mann, M., Dujon, B., Hurt, E., and Fabre, E. (1997). Two functionally distinct domains generated by in vivo cleavage of Nup145p: a novel biogenesis pathway for nucleoporins. *EMBO J.*, **16**, 5086-5097.
- J.*, **16**, 5086-5097.
- Van Beekvelt, C.A., Kooi, E.A., de Graaff-Vincent, M., Riet, J., Venema, J., and Raue, H.A. (2000). Domain III of *Sacharomyces cerevisiae* 25 S ribosomal RNA: its role in binding of ribosomal protein L25 and 60S subunit formation. *J Mol Biol*, **296**, 7-17.
- Vasu, S. K. and Forbes, D. J., (2001). Nuclear pores and nuclear assembly. *Curr Opin Cell Biol.*, **13**, 363-375.
- Venema, J., and Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*, **33**, 261-311.
- Vetter, I.R., Arndt, A., Kutay, U., Görlich, D., Wittinghofer, A. (1999). A structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3Å resolution. *Cell*, **97**, 635-646.
- Wang, H., and Clapham, D.E. (1999). Conformational changes of the in situ nuclear pore complex. *Biophys J*, **77**, 241-47.
- Wente, S.R., Rout, M.P., and Blobel, G. (1992). A new family of yeast nuclear pore complex proteins. *J Cell Biol*, **119**, 705-723.
- Wente, S.R. and Blobel, G. (1993). A temperature-sensitive *NUP116* null mutant forms a nuclear envelope seal over the yeast nuclear pore complex thereby blocking nucleocytoplasmic traffic. *J.Cell Biol.*, **123**, 275-284.
- Wente, S. R., and Blobel, G., (1994). NUP145 encodes a novel yeast glycine-leucine-phenylalanine-glycine (GLFG) nucleoporin required for nuclear envelope structure. *J Cell Biol*, **125**, 955-69.
- Wente, S.R. (2000) Gatekeepers of the nucleus. *Science*, **288**, 1374-1377.
- Wilken, N., Senecal, J.L., Scheer, U., and Dabauvalle, M.C. (1995). Localization of the RanGTP binding protein RanBP2 at the cytoplasmic side of the nuclear pore complex. *Eur J Cell Biol*, **68**, 211-219.

- Wimmer, C., Doye, V., Grandi, P., Nehrbass, U., und Hurt, E. (1992) A new subclass of nucleoporins that functionally interacts with nuclear pore protein NSP1. *EMBO J.*, **11**, 5051-5061.
- Yang, Q., Rout, M.P., und Akey, C.W. (1998) Three-Dimensional Architecture of the Isolated Yeast Nuclear Pore Complex: Functional and Evolutionary Implications. *Mol. Cell*, **1**, 223-234.
- Yoshida, K., and Blobel, G. (2001). The karyopherin Kap142p/Msn5p mediates nuclear import and nuclear export of different cargo proteins. *J Cell Biol*, **152**, 729-740.
- Zabel, U., Doye, V., Tekotte, H., Wepf, R., Grandi, P., and Hurt, E.C. (1996). Nic96p is required for nuclear pore formation and functionally interacts with a novel nucleoporin, Nup188p. *J Cell Biol*, **133**, 1141-52.

9. Abkürzungsverzeichnis

2 μ	2mikron-Plasmid
Abb.	Abbildung
ARS	selbstreplizierende Sequenz (artificial replication sequence)
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
CEN	Centromer-Segment
CBP	Calmodulin-bindender Protein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E	Eluat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
5'-FOA	5-Fluoruracil-6-carboxylsäure-monohydrat
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	Guaninnukleotid Austauschfaktor (guanine nucleotide exchange factor)
GFP	grün-fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	Guanosin-5'-triphosphatase
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein-Partikel
Kap	Karyopherin
kDa	Kilodalton
M	Marker
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
NES	nukleäres Exportsignal
NLS	nukleäres Importsignal
NPC	Kernporenkomplex (nuclear pore complex)

NRM	Nukleoporin-RNA-Bindemotiv
Nup	Nukleoporin (Kernporenprotein)
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
Pom	Kernporenmembranprotein (pore membrane protein)
PtA	ProteinA aus <i>Staphylococcus aureus</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
rRNA	ribosomale RNA
S	Hefezelllysat (das alle löslichen Zellbestandteile enthält)
<i>S.cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDC	synthetisches Glucose-haltiges Medium für <i>S.cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sl	synthetisch letal/synthetische Letalität
TAP	Tandem Affinitätsaufreinigung (tandem affinity purification)
TCA	Trichloressigsäure
TEV	Tobacco etch virus
tRNA	transfer-RNA
ts	thermosensitiv
wt	Wildtyp
YPD	Glucose-haltiges Vollmedium für <i>S.cerevisiae</i>