

Was lokalisiert das Nukleoporin Nup50 an die Kernpore?

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Gramminger,
Cathrin Viola Sekunda**

2016

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor K. Schulze-Osthoff

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. P. Münzel

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	S. IV
1. Einleitung	S. 1
1.1 Die Zellkernmembran und der Kernporenkomplex	S. 1
1.2 Kerntransport	S. 3
1.3 Der Zellkern in der Mitose	S. 4
1.4 Interphasischer und postmitotischer Kernporenaufbau	S. 5
1.5 Vorexperimente zu Nup50	S. 6
1.6 Bisherige Forschungsergebnisse zu Nup50	S. 8
1.7 Zielsetzung	S. 11
2. Material und Methoden	S. 12
2.1 Molekulargenetische Methoden	S. 12
2.1.1 Vektoren	S. 12
2.1.2 PCR-Klonierung	S. 13
2.1.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	S. 13
2.1.2.2 Agarose-Gelelektrophorese	S. 14
2.1.2.3 Restriktionsverdau	S. 14
2.1.2.4 Ligation	S. 15
2.1.2.5 Hitzeschocktransformation der Ligation in kompetente <i>E.coli</i> Stratagene XL-1	S. 15
2.1.2.6 Analyse des klonierten PCR-Produkts	S. 16
2.1.3 <i>In vitro</i> Mutagenese	S. 17
2.1.3.1 Herstellung von Primern	S. 17
2.1.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	S. 18
2.1.3.3 Testrestriktionsverdau von Minipreps	S. 19
2.2 Proteinexpression und –aufreinigung	S. 20

2.2.1 Hitzeschocktransformation von <i>E.coli</i> BL21de3	S. 20
2.2.2 Testexpression durch Autoinduktion	S. 20
2.2.3 Testaufreinigung von His ₆ -gekoppelten Proteinen	S. 21
2.2.4 Expression größerer Mengen His ₆ -gekoppelter Proteine	S. 22
2.2.5 Aufreinigung von His ₆ -gekoppelten Proteinen im großen Maßstab	S. 22
2.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration	S. 23
2.2.7 GST-Pulldown-Assay	S. 23
2.2.8 SDS-PAGE	S. 24
2.2.8.1 Herstellung der Gele	S. 24
2.2.8.2 Probenvorbereitung und Gelelektrophorese	S. 25
2.2.8.3 Gel-Färbung	S. 25
2.2.9 Western Blot	S. 26
2.3 Zellkultur	S. 27
2.3.1 HeLa-Zellen splitten (Angaben für 20 ml Flascheninhalt)	S. 27
2.3.2 Transfektion von HeLa-Zellen	S. 27
2.3.3 Fixierung und Färbung	S. 28
2.3.4 Synchronisierung	S. 28
2.3.5 Immunfluoreszenz	S. 29
2.3.6 Mikroskopie	S. 29
3. Ergebnisse	S. 30
3.1 Eine Vorbehandlung mit Triton X-100 lässt eine bessere Beurteilung zur Lokalisation von Nup50 an der Kernhülle zu	S. 30
3.2 Die Bindung zu Importin α ist nicht entscheidend für die Kernhüllenlokalisierung von Nup50	S. 32
3.3 Die Ran-bindende Domäne ist nicht relevant für die Lokalisation von Nup50 an der Kernhülle	S. 34
3.4 Nup50 lokalisiert ohne N-Terminus an die Kernhülle	S. 37

3.5 Ein minimales Bindungsfragment von 48 Aminosäuren lokalisiert Nup50 an der Kernhülle	S. 39
3.6 Die Sequenz des minimalen Bindungsfragmentes enthält konservierte Aminosäuren	S. 42
3.7 Drei Aminosäuren innerhalb des minimalen Bindungsfragments sind relevant für die Kernhüllenlokalisierung von Nup50	S. 43
3.8 Das minimale Bindungsfragment von Nup50 ist exprimierbar	S. 46
3.9 Die Punktmutationen, welche eine Kernhüllenlokalisierung aufheben, inhibieren die Bindung zu Mel28 und Nup153	S. 49
3.10 Am Ende der Mitose ist die N-terminale Hälfte von Nup50 wichtig für die Chromatinbindung	S. 52
3.11 Im Stadium c der Mitose ist die Kernhülle noch nicht geschlossen	S. 55
3.12 Die R- und die F-Domäne sind nicht relevant für die Nup50 Lokalisierung am Chromatin in der späten Anaphase	S. 57
3.13 Das minimale Bindungsfragment lokalisiert auch an Chromatin am Ende der Mitose	S. 59
3.14 Die Punktmutationen, die eine Kernhüllenlokalisierung inhibieren, blockieren die Chromatinlokalisierung von Nup50 nicht	S. 62
4. Diskussion	S. 66
4.1 Die Rolle des Imports für die Nup50 Lokalisation an der Kernhülle	S. 66
4.2 Das minimale Bindungsfragment	S. 67
4.3 Interaktionen von Nup50 mit Nukleoporinen	S. 69
4.4 Die Interaktion von Nup50 und Chromatin	S. 71
5. Zusammenfassung	S. 75
6. Literaturverzeichnis	S. 76
7. Erklärung	S. 78

Abkürzungsverzeichnis

Δ	Depletion
AG	Arbeitsgruppe
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CAS	Karyopherin (Cellular Apoptosis Susceptibility Protein)
CRM1	Karyopherin (Chromosome Region Maintenance 1)
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DilC18	1,1'-Dioctadecyl-3,3,3',3' Tetramethylindocarbocyanine Perchlorat
DMEM	Standardisiertes Nährmedium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Erweiterte Chemilumineszenz (Enhanced chemiluminescence)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (Ethylenediaminetetraacetic acid)
eGFP	Erweitert grün fluoreszierendes Protein (Enhanced green fluorescent protein)
FG	Phenylalanin-Glycin-Dipeptid
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
HeLa	Zervixkarzinomzellen (Henrietta Lacks)

LB	Standardisiertes Nährmedium (Lysogeny Broth)
MCS	Multiple Klonierungsstellen (Multiple Cloning Sites)
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NPC	Kernporenkomplex (Nuclear Pore Complex)
Nup	Nukleoporin
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (Phosphate Buffered Saline)
PI	Proteaseinhibitor
PFA	Paraformaldehyd
PMFS	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ran	Ras verwandtes nukleäres Protein
RNAi	Ribonukleinsäure-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute (Rounds Per Minute)
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TEV	Tabak-Ätz-Mosaik-Virus (Tobacco etch virus)
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tx-100	Triton X-100

1. Einleitung

1.1 Die Zellkernmembran und der Kernporenkomplex

Die Kernhülle ist eine Barriere, welche die Abläufe im Zytoplasma und Nukleoplasma sowohl räumlich wie auch zeitlich trennt. Sie beschränkt den Zugang von im Zytoplasma translatierten Proteinen ins Zellkerninnere und reguliert den Transport von Transkriptionsprodukten zur Translationsmaschinerie. Die doppelte Membran des Zellkerns geht mit ihrer äußeren Kernmembran in das raue Endoplasmatische Retikulum über, welches eine ähnliche Proteinzusammensetzung besitzt. Nur ein perinukleärer Spalt von 30-50 nm trennt die äußere von der inneren Kernmembran, die das Chromatin umhüllt und deren Proteine sowohl die Kernlamina verankern als auch mit dem Chromatin interagieren (als Übersichtsartikel siehe Hetzer and Wente 2009). Mutationen oder Dislokationen der Gene dieser inneren Membranproteine führen häufig zu einer abweichenden Kernfunktion, was in schwerwiegenden Krankheitsbildern von muskulären Dystrophien bis hin zur Progerie (vorzeitige Alterung) resultieren kann. Eine Fusion der äußeren und der inneren Kernmembranen findet nur in sogenannten Kernporen statt, die von einem mächtigen Proteinkomplex gebildet und ausgekleidet

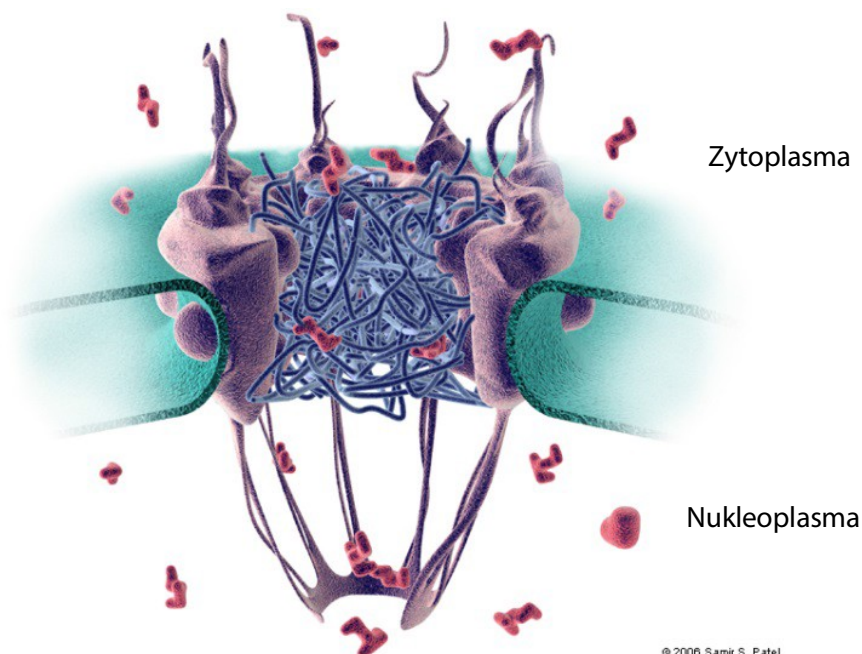


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Kernporenkomplexes

In diesem Modell des Kernporenkomplexes sind der zentrale Baustein mit seiner Membranverankerung, die zytoplasmatischen Filamente und der nukleäre Korb in violett dargestellt. Die Kernmembran ist türkis. Die langen Peptidketten mit ihren FG-Abfolgen sind blau, die Transport-Fracht rot eingefärbt. Quelle: Samir S.Patel

werden. Von diesen Kernporenkomplexen lassen sich bis zu 5.000 in der Kernmembran einer wachsenden Zelle finden. Jeder dieser Komplexe arbeitet hochspezifisch und kann die Passage von mehreren hundert Makromolekülen pro Sekunde vermitteln.

Obwohl sich Bestandteile des Kernporenkomplexes auf molekularer Ebene in den verschiedenen Spezies unterscheiden, scheinen seine Form und die Symmetrie über die Evolution konserviert zu sein (als Übersichtsartikel siehe Brohawn, Partridge et al. 2009). So besteht der enorme Komplex von bis zu 66 MDa in Hefe und 125 MDa in Wirbeltieren nur aus 30 verschiedenen Proteinen, die sich durch eine achtfache Rotationssymmetrie um die Pore und eine Achsensymmetrie parallel zur Membranebene vielfach wiederholen. Der zentrale Bestandteil des Komplexes gliedert sich in einen zytoplasmatischen und einen nukleoplasmatischen Ring sowie einen dazwischen sitzenden Speichenring, der als einziger Transmembrandomänen enthält und somit den Komplex an der gekrümmten Kernmembran verankert (Abbildung 1). Vom Kernporenkomplex aus erstrecken sich Filamente in das Zytoplasma, wohingegen sich auf nukleoplasmatischer Seite ein sogenannter nukleärer Korb befindet, benannt nach seiner Form, die an einen Draht erinnert, welcher den Korke in einer Sektflasche hält (als Übersichtsartikel siehe Antonin, Ellenberg et al. 2008). Sowohl die Filamente als auch der Korb fungieren als Andockstelle für Makromoleküle, die durch die Pore transportiert werden sollen. Neben dieser Untergliederung nach architektonischen Gesichtspunkten, lassen sich die einzelnen Bausteine auch biochemisch, funktionell und nach ihrer Mobilität einteilen (als Übersichtsartikel siehe D'Angelo and Hetzer 2008). Die Proteine, auch bekannt als Nukleoporine (Nups), können biochemisch zu Subkomplexen zusammengefasst werden, welche durch stabile Interaktionen definiert werden. Des Weiteren werden Nups funktionell in Gerüstbestandteil- und Transport-Nups unterschieden. Die das Grundgerüst aufbauenden Nups bestehen hauptsächlich aus α -Helices und β -Faltblatt Strukturen, wohingegen die in den Transport involvierten Nups vielfache Phenylalanin-Glycin (FG)-Abfolgen enthalten. Diese langen Peptidketten mit FG-Wiederholungen bilden im wassergefüllten Kanal der Pore eine semipermeable Barriere, welche die Diffusion von großen Molekülen verhindert, es sei denn diese sind an einen Transportrezeptor gebunden. Der genaue Durchtrittsmechanismus von Proteinen durch die Kernpore ist bisher ungeklärt, es wird unter anderem von transienten FG-Bindungen des Cargo-beladenen Transportrezeptors

und Brown'schen Bewegungen ausgegangen (Fried and Kutay 2003). Die letzte Gliederung teilt die Nups in stabile und mobile Komponenten ein. Hier bleiben vor allem die Grundgerüst-Nups fest an einem Ort, während sich der mobile Bestandteil mit einem freien Pool austauscht (als Übersichtsartikel siehe Brohawn, Partridge et al. 2009).

1.2 Kerntransport

Abgesehen von den großen Molekülen, die einen aktiven Transportmechanismus benötigen, können kleinere Proteine (unter 40 kDa) und Ionen passiv diffundieren. Der Durchgang der Pore beträgt nur 30-40 nm, trotzdem können sich auch größere Partikel „durchzwängen“, vorausgesetzt diese sind verformbar.

In den aktiven Transport von Makromolekülen sind diverse Rezeptoren, Adaptor-Proteine und eine GTPase involviert. Der bekannteste Importmechanismus basiert auf

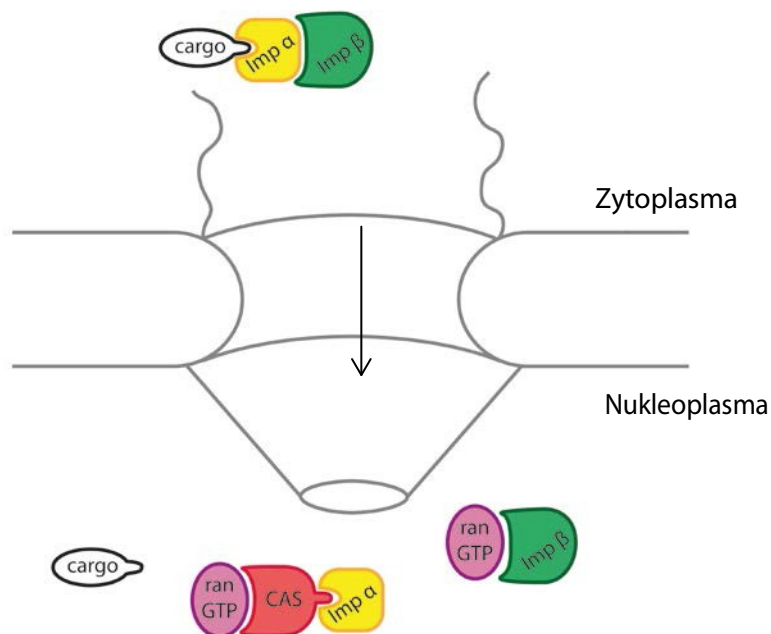


Abbildung 2: Importin α- Importin β basierter Kernimport

Der Transportrezeptor Importin β bindet auf der zytoplasmatischen Seite mittels Importin α an seine Fracht (cargo). Auf nukleoplasmatischer Seite gibt Importin β die anderen beiden Komplexkomponenten durch die Bindung an RanGTP frei. Die Fracht wird von Importin α gelöst, indem Importin α an CAS und RanGTP bindet.

Importin α und Importin β (siehe Abbildung 2). Auf der zytoplasmatischen Seite erkennt Importin α als Adaptorprotein seine Fracht an einem nukleären Lokalisations-signal (NLS) und lagert sich zusammen mit dem Transportrezeptor Importin β an. Dieser trimere Komplex bindet an den Filamenten der Kernpore und wird mittels Interaktionen von Importin β mit den FG-Abfolgen auf die nukleoplasmatische Seite transportiert. Hier bindet Importin β an RanGTP, wodurch der Transportrezeptor vom Fracht-Adaptor-Komplex abgelöst wird. Durch eine Bindung zu CAS und RanGTP gibt Importin α die Fracht schließlich frei. Alle Bestandteile außer der Fracht werden im Anschluss exportiert und wiederverwendet. Die hohe RanGTP-Konzentration im Zellkern und die hohe RanGDP-Konzentration im Zytoplasma definieren die Richtung des Transports (als Übersichtsartikel siehe Fried and Kutay 2003).

1.3 Der Zellkern in der Mitose

Der transportfähige Kernporenkomplex wird in höheren Eukaryonten für die Zellteilung vollständig abgebaut. Im Gegensatz zur geschlossenen Mitose (z.B. bei *Saccharomyces cerevisiae*), bei der sich die Spindel innerhalb des Zellkerns ausbildet und somit die Kernhülle intakt bleibt, muss bei einer offenen Mitose (bei Säugetieren und *Xenopus laevis*) die gesamte Kernhülle sowie die Kernporen abgebaut werden (als Übersichtsartikel siehe De Souza and Osmani 2009). Nur so können die von den zytoplasmatischen Zentriolen ausgehenden Mikrotubuli an die Kinetochore der Chromosomen anheften, um die Chromatiden auf die Tochterzellen aufzuteilen. Während der Mitose werden die Kernmembranen und die Nukleoporene mit Transmembrandomänen in das Endoplasmatische Retikulum aufgenommen (als Übersichtsartikel siehe Schooley, Vollmer et al. 2012). Der größte Teil der Nukleoporene ist nicht membranassoziiert und verbleibt während der Zellteilung als Subkomplexe oder einzeln im Zytosol. Am Ende der Mitose bildet sich eine neue Kernhülle aus dem Endoplasmatischen Retikulum. Wie genau diese Membranen um das Chromatin fließen und auf welche Weise die Kernporen aufgebaut werden, wird immer noch kontrovers diskutiert. Ein Modell beschreibt die Formierung einer sogenannten Präpore (als Übersichtsartikel siehe Schooley, Vollmer et al. 2012): Da die Kernmembranen noch fehlen, können die Nups nicht durch Transport im Zellkern

angereichert werden und müssen ans Chromatin rekrutiert werden. Dazu heften sich einige Nups an das Chromatin und bilden eine Präpore, die als Bindungsplattform für weitere Komplexbestandteile dient, während die Kernhülle zeitgleich aufgebaut wird. Als essentieller Initiator bindet das Protein Mel-28 am Anfang der Anaphase mit seinem AT-Hook-Motiv an AT-reiche Regionen des Chromatins und rekrutiert die restlichen Bestandteile des Nup107-160-Komplexes, eines Subkomplexes der Kernpore. Dieser Mel-28-Nup107-160-Komplex in der frühen Anaphase wird als Präpore diskutiert. Kurz darauf lagern sich Teile von Nup50 (auch bekannt als Npap60) und Nup153 an (Dultz, Zanin et al. 2008), die beide dynamische Bestandteile des nukleären Korbs sind. Beide scheinen zwei unterschiedliche Möglichkeiten zu haben an die Pore zu binden. Zum einen lokalisieren ca. 20% von Nup50 und ca. 10% von Nup153 zu diesem frühen Zeitpunkt an das Chromatin, zum andern gelangt der größere Anteil erst zu einem späteren Zeitpunkt mit bereits funktionsfähigem Import an seine Position (Dultz, Zanin et al. 2008). In einem schrittweisen Prozess wird die Pore dann von der Membran aus zur zentralen Pore hin vervollständigt. So lagern sich erst die Bestandteile des Grundgerüsts an und rekrutieren dann die FG-haltigen Nups. Bereits ab diesem Zeitpunkt hat die Kernpore ihre Barriereigenschaften und betreibt aktiven Transport, obwohl der Proteinkomplex noch nicht vollständig ist. Die Aufbauabfolge von peripheren Elementen, wie dem nukleären Korb und den zytoplasmatischen Filamenten, ist bisher nicht vollständig aufgeklärt.

1.4 Interphasischer und postmitotischer Kernporenaufbau

Parallel zu diesem postmitotischen Kernporenaufbau findet auch eine Vermehrung der Kernporen während der Interphase statt. Da in der Interphase eine intakte Kernhülle vorliegt, müssen die beiden Kernmembranen erst einmal fusionieren, um eine Pore zu bilden. Es konnte bisher nicht abschließend geklärt werden, ob dem interphasischen und dem postmitotischen Kernporenaufbau unterschiedliche Mechanismen zu Grunde liegen. Für verschiedene Mechanismen sprechen die Tatsachen, dass Mel-28 nur im postmitotischen Aufbau essentiell ist und membrankrümmende Proteine für den interphasischen Aufbau benötigt werden (als Übersichtsartikel siehe Schooley, Vollmer et al. 2012).

1.5 Vorexperimente zu Nup50

Da die Bedeutung von der frühen Nup50 Fraktion beim postmitotischen Kernporen-Aufbau (siehe 1.3) bisher nicht untersucht worden ist, hat das AG-Antonin Labor getestet, ob Nup50 essentiell für den NPC-Aufbau ist. Hierzu wurde zur DNA von Spermienköpfen der Extrakt von *Xenopus laevis* Eiern gegeben, was ein etabliertes Versuchssystem für den Kernporen-Aufbau *in vitro* ist. Anschließend wurde Nup50 in den Eiextrakten mittels Antikörpern depletiert und der Versuch wiederholt. Wie in Abbildung 3 zu sehen ist, kann trotz fehlendem Nup50 eine geschlossene Kernhülle ausgebildet werden, jedoch konnte kein Signal für Kernkomplexe beobachtet werden. Der Nachweis der Kernporen fand mittels mAB414 statt, einem Antikörper, der verschiedene Nukleoporine bindet. Der gleiche Phänotyp wurde bereits bei der Depletion

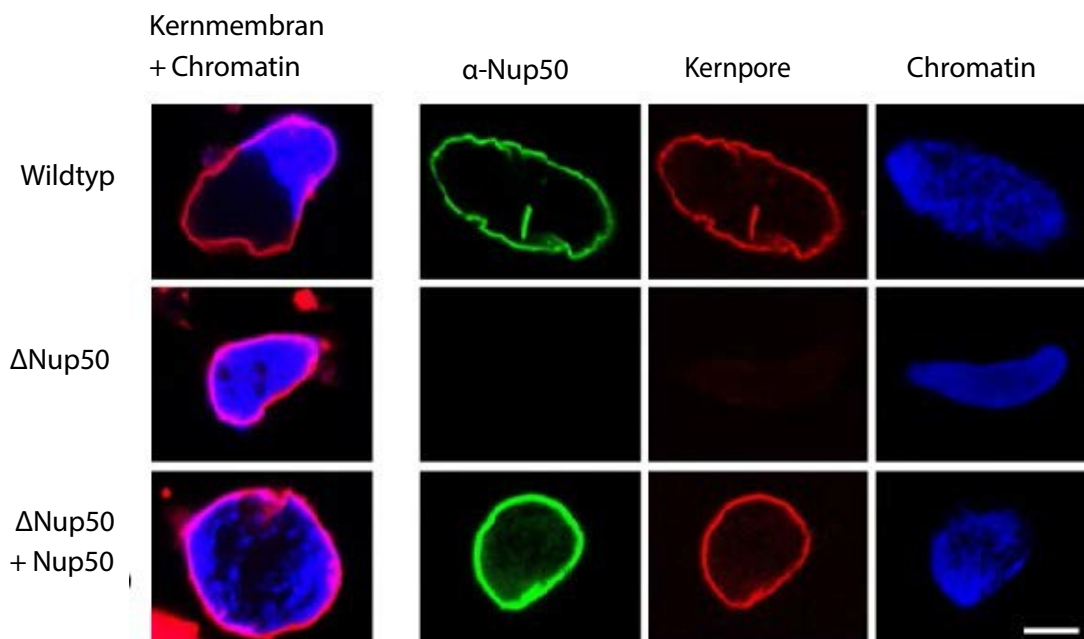


Abbildung 3: Nup50 ist notwendig für den Kernporenaufbau *in vitro*

Der Kernporenaufbau wurde mit Wildtyp-Extrakt, Nup50 depletiertem Extrakt und Nup50 depletiertem Extrakt, zu dem rekombinantes Nup50 gegeben worden ist, durchgeführt. Das Chromatin wurde mit DAPI gefärbt (blau), die Membranen mit DilC18 (rot, linke Spalte), Nup50 wurde mit einem *Xenopus laevis* spezifischen Antikörper (grün) und die Kernporen mit mAB414 (rot, dritte Spalte von links) markiert. In Abwesenheit von Nup50 ist die Membranfärbung immer noch glatt und durchgängig, was für eine geschlossene Kernhülle spricht. Diesen Kernen fehlen jedoch die Kernporen, was durch die Zugabe von rekombinanten Nup50 wieder aufgehoben werden konnte. Aufgenommen von der AG-Antonin. Balken 10 μ m

von Mel-28 beobachtet (Franz, Walczak et al. 2007), einem Schlüsselnukleoporin für postmitotischen Kernporenaufbau. Dies lässt vermuten, dass Nup50 ebenfalls eine entscheidende Rolle beim Kernporenaufbau spielt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Zugabe von in *E.coli* hergestelltem rekombinanten Nup50 die Kernporen wieder herstellt. Also führt die Depletion von Nup50 selbst und nicht eine Ko-Depletion eines anderen Faktors zum Fehlen von Kernporen.

Um diese *in vitro* Ergebnisse zu bestätigen, wurde vom Labor AG-Kutay ein Experiment in Zellkultur durchgeführt, welches bereits bei Mel-28 zu einem auffälligen Ergebnis geführt hatte. Mel-28 wurde durch RNAi-Experimente in HeLa-Zellen herunterreguliert, was das mAB414-Signal stark verminderte (Franz, Walczak et al. 2007). Tatsächlich zeigte sich für Nup50 ein ähnliches Muster: Das Kernporensignal, visualisiert durch mAB414, war deutlich schwächer im Vergleich zur Kontroll-RNAi. Jedoch muss bei diesem Experiment bedacht werden, dass man auch auf interphasisch aufgebaute Kernporen blickt, über dessen Aufbaumechanismus wenig bekannt ist. Es

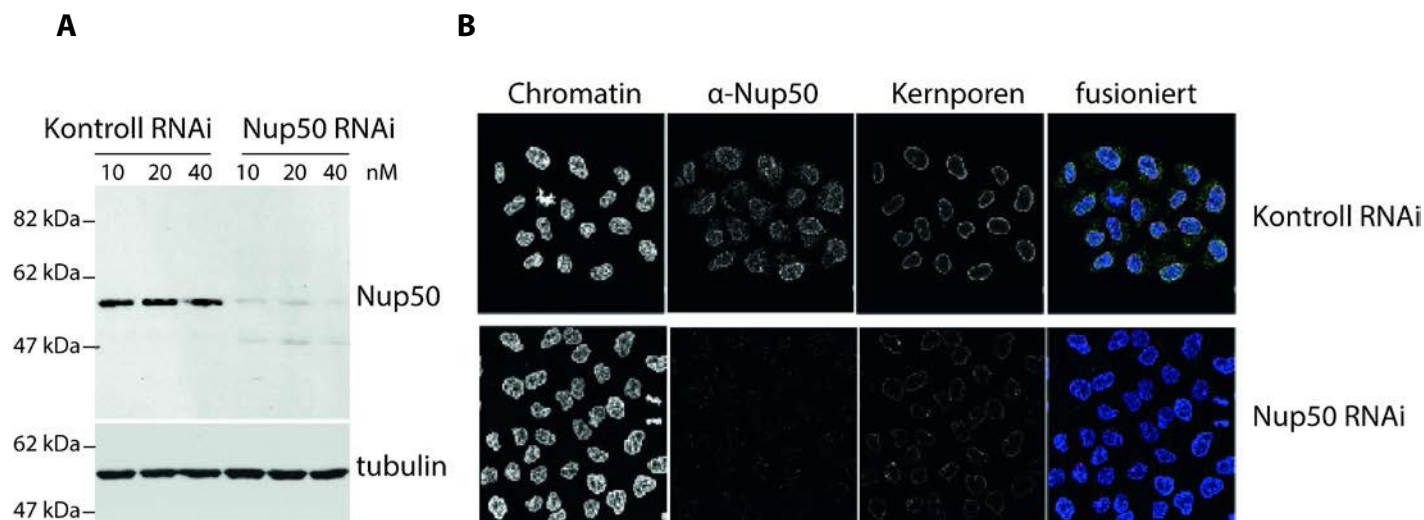


Abbildung 4: Nup50 wird für den Kernporen-Aufbau in HeLa-Zellen benötigt

Durch 72-stündige RNAi-Behandlung wurde Nup50 in HeLa-Zellen depletiert. Bild A zeigt den Westernblot zur Depletionseffizienz von verschiedenen RNAi-Konzentrationen. Es wurde ein Säugetier-spezifischer Nup50 Antikörper verwendet. Bild B visualisiert HeLa-Zellen, die mit 40 nM RNAi Oligonukleotiden behandelt worden sind. Das Kernporen-Signal (mAB414) ist nach der Nup50 Depletion schwächer. Aufgenommen von der Arbeitsgruppe Ulrike Kutay.

kann also nicht ausgeschlossen werden, dass ein verminderter Kerntransport, hervorgerufen durch die Nup50 Depletion, den interphasischen Kernporenaufbau verhindert. In der Tat wird Nup50 als Hilfsfaktor beim Kernimport diskutiert (siehe Abschnitt 1.6).

Offen war die Frage, ob Nup50 und Mel-28 interagieren, was in Anbetracht des ähnlichen Phänotyps möglich wäre. Mittels Immunpräzipitationen aus *Xenopus leavis* Extrakten hatten Mitarbeiter des Labors AG-Antonin nachgewiesen, dass Teile von Nup50 und Mel-28 aneinander binden. Allerdings zeigte eine Depletion von Mel-28 keine Abschwächung des Nup50-Signals. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass eine Nup50 Depletion auch den Anteil von Mel-28 verringert (Daten hier nicht gezeigt). Hierbei ist unklar, ob es sich um eine direkte oder indirekte Bindung handelt.

Aus den beschriebenen Experimenten lässt sich schlussfolgern, dass Nup50 eine entscheidende Rolle im postmitotischen Kernporenaufbau spielt, die über das bisherige Wissen über seine Funktionen hinausgeht.

1.6 Bisherige Forschungsergebnisse zu Nup50

Bisher wurde der Fokus der Forschung zu Nup50 auf seine Rolle beim nukleären Transport gelegt. So weisen unterschiedliche Experimente darauf hin, dass Nup50 ein Hilfsfaktor sowohl für den Import als auch für den Export ist. Die genauen Mechanismen sind noch nicht geklärt. Es wurde jedoch gezeigt, dass Antikörper gegen Nup50 den Kernexport blockieren (Guan, Kehlenbach et al. 2000). Zum Import in das Kerninnere wird davon ausgegangen, dass Nup50 die Dissoziation des Importin α -Importin β -Fracht-Komplexes auf der nukleoplasmatischen Seite unterstützt und somit die Effizienz des Imports steigert. Es wird vermutet, dass Nup50 durch nacheinander geschaltete Interaktionen mit den Komponenten des Import-Komplexes und der GTPase Ran die Affinitäten innerhalb des Komplexes verschiebt (Lindsay, Plafker et al. 2002, als Übersichtsartikel siehe Moore 2003). Bei humanem Nup50 wurden zwei Splice-Isoformen entdeckt, die gegenteilig auf die Importin α -Bindung wirken und somit den Kernimport vorantreiben sollen (Ogawa, Miyamoto et al. 2010).

In der Tat konnte nachgewiesen werden, dass Nup50 mit den Transportrezeptoren Importin α , Importin β , Transportin, CRM1, sowie der kleinen GTPase Ran direkt interagiert (Makise, Mackay et al. 2012, Lindsay, Plafker et al. 2002, Guan, Kehlenbach et al. 2000, Smitherman, Lee et al. 2000).

Da Nup50 auf der nukleoplasmatischen Seite der Kernpore lokalisiert und zusätzlich diffus im Nukleoplasma verteilt ist (Guan, Kehlenbach et al. 2000), wäre es möglich, dass die Interaktionen zu den Transportrezeptoren nur vorliegen, weil Nup50 selbst ein Frachtprotein ist, das an seine endgültige Position gebracht wird. Dies konnte jedoch experimentell ausgeschlossen werden (Lindsay, Plafker et al. 2002).

Das Protein Nup50 wird anhand seiner Struktur und Bindungspartner in verschiedene Domänen eingeteilt. Die in Abbildung 5 dargestellten Aminosäurepositionen gelten für das Nup50-Protein der Spezies *Xenopus laevis*. N-terminal befindet sich die N-Region, die direkt an Importin α bindet. Der mittlere Teil ist nach den FG-Abfolgen benannt, die sich in diesem Bereich befinden und direkt mit Importin β interagieren können. Tatsächlich liegt das gesamt lösliche Nup50 im Komplex mit Importin β vor (Lindsay, Plafker et al. 2002). Die C-terminale Domäne heißt R-Region nach der dort lokalisierten Ran-Bindungsstelle. Via Importin α und RanGTP kann Importin β indirekt auch an die die N- und R-Region binden. (Lindsay, Plafker et al. 2002)

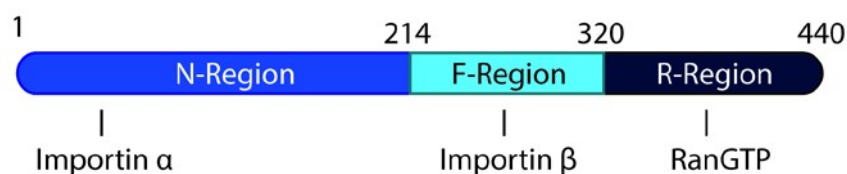


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Nup50-Proteins

Das Nup50-Protein mit den Aminosäurepositionen von *Xenopus laevis* wird gezeigt. Die Domänen werden unterteilt in N-Region (N-terminal), F-Region (Phenylalanin-Glycin-Abfolgen) und R-Region (Ran bindende Domäne). Direkt an die Region bindende Interaktionspartner sind ebenfalls dargestellt.

Zu den Interaktionen mit Transportfaktoren kommen noch weitere Interaktionspartner. So wurden für Nup50 als Bestandteil des Kernporenkorbes Bindungen zu anderen Nukleoporinen nachgewiesen. Bereits bekannt war die Tatsache, dass Nup50 mittels seiner N-Domäne an zwei verschiedenen Stellen des Nup153, einmal direkt und einmal via Importin α binden kann, jedoch nur ein begrenzter Pol von Nup50 tatsächlich mit Nup153 interagiert (Makise, Mackay et al. 2012). Beide Nukleoporine sind Teil des nukleären Korbes und dynamische Nukleoporine (d.h. sie besitzen in der Kernpore eine relativ kurze Halbwertszeit). Wie bereits im Abschnitt 1.5 erwähnt, konnten Mitarbeiter der AG-Antonin eine Interaktion zu Mel-28 nachweisen. Ob diese Interaktion direkt ist und welche Domänen involviert sind, war zu diesem Zeitpunkt nicht geklärt. Zu guter Letzt kann sich Nup50 selbst binden und als Dimer auftreten (Smitherman, Lee et al. 2000).

Obwohl Nup50 in allen Zellen vorkommt, versterben homozygote Nup50 Knock-out-Mäuse erst während der späten Embryogenese. Es kommt bei diesen Mäusen zu intrauteriner Wachstumsverzögerung und Neuralrohrdefekten bis hin zur Exencephalie. Interessanterweise zeigten isolierte embryonische Mäusefibroblasten von Nup50-Null-Mäusen keinerlei Auffälligkeiten oder Defekte. Es wird diskutiert, ob das sehr ähnliche p70-Protein Funktionsausfälle *in vivo* kompensieren kann (Smitherman, Lee et al. 2000).

Es ist nicht bekannt, welche Rolle Nup50 im interphasischen Kernporenaufbau spielt. Beim postmitotischen Aufbau konnte eine zweiphasische Lokalisation am Chromatin beobachtet werden (Dultz, Zanin et al. 2008), wobei nicht klar ist, ob die Lokalisation am Chromatin der kritische Punkt für einen funktionierenden Kernporenaufbau ist.

1.7 Zielsetzung

Festgehalten werden kann, dass Nup50 neben seiner Rolle im Kerntransport mindestens eine weitere Funktion im postmitotischen Aufbau von Kernporenkomplexen besitzt. Da Nup50 so viele Interaktionspartner hat, ist unklar, welches Merkmal von Nup50 relevant für den postmitotischen Kernporenaufbau ist. Um dies aufzuklären, habe ich untersucht, welche Regionen des Nup50-Proteins relevant sind, um es an den Kernporenkomplex zu lokalisieren. Hierbei ging es darum, ein minimales bindendes Fragment zu finden. In diesem minimalen Bindungsfragment sollten einzelne Aminosäuren identifiziert werden, die für die Kernporenlokalisierung essentiell sind. Die Experimente habe ich vor allem im HeLa-Zell-System durchgeführt, da bereits gezeigt worden ist, dass es sich eignet, um die Lokalisation von Nukleoporinen in verschiedenen Zellzyklusstadien zu visualisieren (Hase and Cordes 2003).

Mithilfe des minimalen Bindungsfragments und Aminosäuremutationen, welche die Lokalisation an die Kernhülle unterbinden, wollte ich herausfinden, welche entscheidenden Interaktionen durch diese Mutation blockiert werden. Hierzu sollte in Pulldown-Assays getestet werden, welche der potentiellen Bindungspartner an den Wildtyp binden, aber nicht mehr an die Mutante.

Um Nup50 spezifisch im postmitotischen Kernaufbau zu beobachten und Informationen über die Lokalisation von Nup50 am Chromatin zu gewinnen, habe ich die HeLa-Zellen synchronisiert, die mit eGFP gekoppeltem Nup50 oder Verkürzungen dessen transfiziert worden sind. Es wurde ein Versuchssystem aufgebaut, das eine Unterscheidung zwischen vorhandener und nicht vorhandener Chromatinlokalisierung ermöglicht. Der nächste Schritt wird sein, ein minimales an das Chromatin lokalisierendes Fragment oder sogar Punktmutationen zu finden, die eine Assoziation am Chromatin unterbinden. Langfristig soll dies klären, ob eine direkte oder indirekte Interaktion am Chromatin vorliegt und welche Bindungspartner diese herstellen können.

2. Material und Methoden

2.1 Molekulargenetische Methoden

2.1.1 Vektoren

Zur Proteinexpression, -aufreinigung und anschließendem GST-Pulldown wurde der pET28e-Vektor verwendet. Dieser Vektor wurde aus dem pET28a-Vektor durch die Insertion eines GST-Fragments in die NdeI-Schnittstelle hergestellt. Der Vektor enthält N-terminal ein His₆-tag, der für die Aufreinigung benötigt wird. Es folgen eine Thrombin-Schnittstelle, ein GST-tag für die Kopplung an Glutathionsepharose beim GST-Pulldown und eine TEV-Schnittstelle zur Elution und schließlich multiple Klonierungsschnittstellen.

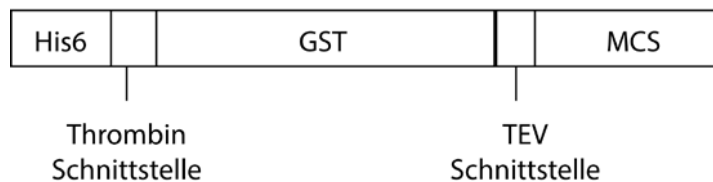


Abbildung 6: Schematische Darstellung des pET28e-Vektors

Die unterschiedlichen Abschnitte des pET28e-Vektors bestehen aus einem sechsfachen Histidin *tag* (His₆), einer Thrombin-Schnittstelle, Glutathion-S-Transferase (GST), eine TEV-Schnittstelle und einem Abschnitt, der multiple Klonierungsschnittstellen enthält (MCS).

Der pEGFPwaCmyc-Vektor ist zur Visualisierung der Nup50 in HeLa-Zellen verwendet worden. Die multiplen Klonierungsschnittstellen wurden aus dem pET28a-Vektor übernommen und zusammen mit einem myc-tag in den pEGFPC1-Vektor eingefügt. Die NdeI- und die NheI-Schnittstellen des Ursprungvektors wurden mittels *in vitro* Mutagenese entfernt. N-terminal befindet sich ein fluoreszierender eGFP-tag, gefolgt von einem myc-tag und multiplen Klonierungsschnittstellen.



Abbildung 7: Schematische Darstellung des pEGFPwaCmyc -Vektors

Der pEGFPwaCmyc-Vektor besteht aus einem eGFP-tag, einem myc kodierenden Abschnitt und einer Region, die multiple Klonierungsschnittstellen enthält (MCS).

2.1.2 Klonierung eines PCR-Produkts

2.1.2.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCRs wurden wie folgt angesetzt:

5 µl	10x KOD-Puffer (Novagen)
2 µl	25 mM MgSO ₄ (Novagen)
5 µl	dNTP mix (2 mM) (Stratagene)
10 µl	Primer 1 (0,5 µM) (Sigma)
10 µl	Primer 2 (0,5 µM) (Sigma)

Dieser Ansatz wurde mit destilliertem Wasser auf 49 µl aufgefüllt. Der gesamte Ansatz wurde mit 1µl KOD Polymerase (1.0 U/µl) durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Anschließend durchliefen die Proben im DNA Engine-Peltier Thermal Cycler folgendes Programm:

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	30 sec	1
Denaturierung	95°C	30 sec	5
Anlagerung	58°C	30 sec	
Elongation	75°C	60 sec	
Denaturierung	95°C	30 sec	25
Anlagerung	62°C	30 sec	
Elongation	75°C	60 sec	
Elongation	75°C	5 min	
	4°C	Bis zur Nutzung	

Zur Analyse des PCR-Produkts wurden je 5 µl vorab mit 1 µl 6x DNS Ladungsfarbstoff gemischt und in Agarosegelen (0,8% bei >1000bp, 1,2% bei <1000bp) aufgetrennt. Der verbliebene Ansatz wurde mit dem QIAquick Purification Kit (Qiagen) aufgereinigt.

6x DNS Ladungsfarbstoff

50% Glycerol

10% TBE (890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 25 mM EDTA)

10% OrangeG

In destilliertem Wasser

2.1.2.2 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung des Agarose-Gels wurden 1,2 oder 0,8 g Agarose (Invitrogen) mit 100 ml 1xTBE-Puffer gemischt und erhitzt, bis die Lösung klar wurde. Diese wurde in Elektrophoresekammern (EMBL Werkstatt) gefüllt und im flüssigen Zustand wurden 2 µl 10 mg/ml Ethidiumbromid zugegeben. Das Gel benötigte ca. 20 Minuten zum Auspolymerisieren. Die Kammer mit dem erhärteten Gel konnte nun mit 1x TBE-Puffer gefüllt werden. Das Gemisch aus Probe und 6x DNS Ladungsfarbstoff wurde in die Kammer geladen, als Größenmarker wurde der GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas) verwendet. Die Elektrophorese lief bei 90V_{konstant}. Die Auswertung der Basenlängen fand unter UV-Licht mittels Multimage Light Carbinet (Alpha Innotech) statt.

1x TBE-Puffer

89 mM TRIS

89 mM Borsäure

2,5 mM EDTA

2.1.2.3 Restriktionsverdau

Aus dem aufgereinigten PCR-Produkt wurde mittels Restriktionsverdau der Teil ausgeschnitten, der im Anschluss in den Vektor integriert werden sollte. Hierzu wurde folgender Ansatz verwendet:

100 µl Eluat (PCR-Produkt) aus QIAquick PCR Purification Kit

13 µl 10x NEB-Puffer 4 (NEB)

1 µl NdeI 20 U/µl (NEB)

1 µl XhoI 20 U/µl (NEB)

Dies wurde auf 130 μl mit destilliertem Wasser aufgefüllt und für zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Es folgte eine Zugabe von je 0,5 μl beider Enzyme und eine Inkubation von einer weiteren Stunde. Das Produkt des Restriktionsverdaus wurde mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.1.2.4 Ligation

Eine Ligation verbindet das verdaute DNS Fragment mit dem vorgeschrittenen Vektor. Folgender Ligationsansatz wurde zusammengemischt:

5 μl	Eluat (Produkt des Verdaus)
0,5 μl	Vektor
1 μl	10x T4-Ligasepuffer (NEB)
2,5 μl	Wasser
1 μl	NEB T4-Ligase (400 U/ μl) (NEB)

Anschließend wurden die Proben bei 15°C im Thermal Cycler (DNA Engine Peltier) für mindestens sechs Stunden inkubiert.

2.1.2.5 Hitzeschocktransformation der Ligation in kompetente *E.coli* Stratagene XL-1

Die kompetenten XL-1 *E.coli* Bakterien (Stratagene) wurden auf Eis aufgetaut und 3,4 μl β -Mercaptoethanol aus dem dazugehörigem Kit zugegeben. Die Bakterien wurden zehn Minuten auf Eis inkubiert, wobei sie alle zwei Minuten behutsam geschüttelt wurden. Je 10 μl Ligationsprodukt wurden zu 50 μl Bakterien pipettiert und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann erfolgte ein Hitzeschock in einem Wasserbad bei 42°C. Um die maximale Effizienz zu erreichen, musste die Zeit von 45 Sekunden im Wasserbad genau eingehalten werden. Anschließend wurden die XL-1 Bakterien für zwei Minuten auf Eis aufbewahrt. 0,5 ml auf 37° C vorgewärmtes SOC-Medium wurde zu den Bakterien

gegeben und die Eppis für eine Stunde bei 37°C und 600 rpm geschüttelt. Auf zwei vorgewärmte antibiotikahaltige Agarplatten wurden 300 µl des Transformationsgemisches ausplattiert. Die Platten wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

SOC-Medium

1 ml SOB-Medium (2% Tryptone, 0,5% Hefeextrakt, 0,05% NaCl, mit deionisiertem Wasser bis 1 l auffüllen, autoklavieren)

2 µl 20% Glukose

10 µl 1 M MgCl₂

2.1.2.6 Analyse des klonierten PCR-Produkts

Von XL-1 *E.Coli* enthaltenen Agarplatten wurden nach der über Nacht Inkubation bis zu sechs Kolonien pro Konstrukt gepickt und mit 3 ml LB Medium und 25 µg/ml Kanamycin in verschließbaren Reagenzgläsern angeimpft. Diese Kulturen wurden über Nacht in Infor HAT Multitron Inkubator bei 37°C und 300 rpm wachsen gelassen. Am folgenden Tag wurden pro gepickte Bakterienkultur 2 ml mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) weiterverarbeitet, um die vervielfältigte Plasmid-DNS aufzureinigen. Die im Reagenzglas verbliebenen Bakterien wurden bei 8°C gelagert bis das Ergebnis der Spinpreps bekannt war. Das Ergebnis wurde durch Restriktionsverdau und anschließender Agarose-Gelelektrophorese überprüft. Hierzu wurden 10 µl des Spinprep-Eluats mit 5 µl vom Mastermix in einer Vertiefung der 96er Wellplatte gemischt. Die Wellplatte wurde mit Parafilm versiegelt und bei 37°C für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden 5 µl 6x DNS-Ladungsfarbstoff mit der DNS durch Auf- und Abpipettieren gemischt. Als nächsten Schritt wurden pro Probe 10 µl auf ein Agarosegel (0,8% bei >1000bp oder 1,2 bei <1000bp) geladen und bei 90 V der Größe nach aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der GeneRuler DNA Ladder Mix (Fermentas) als Aufnahmegesäß Multimage Light Cabinet (Alpha Innotech) verwendet. Maximal zwei Klone, die das korrekte Insert enthielten, wurden wiederum angeimpft. Ziel dessen war es, das korrekte Plasmid mittels der Plasmid Mini Präparation zu isolieren, um es anschließend sequenzieren zu können. Für die Plasmid Mini Präparation wurde je ein Tropfen der in den Spinprep Röhrchen verbliebenen Bakterien

in 15 ml LB-Medium + 25 µg/ml Kanamycin gegeben und über Nacht bei 300 rpm und 37°C im Infors HT Multitron Inkubator kultiviert. Nachfolgend wurden die Proben mit dem Plasmid Mini Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Als letzter Schritt der Aufreinigung wurde die getrocknete DNS in 50 µl TE (10 mM TRIS + 0,1 mM EDTA) gelöst und für zwei Stunden bei 37°C und 1000 rpm im Thermomixer comfort (Eppendorf) geschüttelt. Mittels photometrischer Analyse wurde die DNS-Konzentration gemessen. Hierzu wurden 1,5 µl Eluat auf dem Nanodrop ND-1000 (Peqlab GmbH) vermessen. Abschließend wurde die DNS sequenziert und bei richtiger Basenabfolge bei -20°C gelagert.

LB-Medium

10 g Trypton
5 g Hefeextrakt
7,5 g NaCl

Auf 1 l mit destilliertem Wasser auffüllen, pH 7.0 einstellen und autoklavieren.

Mastermix für 5 µl

1,5 µl 10x NEB-Puffer 4
0,3 µl NdeI 20 U/µl (NEB)
0,3 µl XhoI 20 U/µl (NEB)
2,9 µl Wasser

2.1.3 *In vitro* Mutagenese

2.1.3.1 Herstellung von Primern

Zur Generierung der Primer wurde ein Geneart Vektor als Vorlage genommen und die gewünschten Punktmutationen über den vorwärts und rückwärts gerichteten Primer eingeführt. Von den Punktmutationen ausgehend wurde je 62° upstream und downstream als Anlagerungstemperatur gewählt und mittels der Annäherung $C/G = 4^{\circ}C$ und $A/T = 2^{\circ}C$ die Primerlänge berechnet. Die Primer wurden von der Fa. SIGMA hergestellt.

Generierte Primer

10 56	#1056Nup50xl CON153A fw	ACAAACAGCTGACCAGCCTGgcaTGTAGCGTTCGTG ATTGGATTG
10 57	#1057Nup50xl CON153A rv	CAATCCAATCACGAACGCTACAtgcCAGGCTGGTCA GCTGTTTGT
10 58	#1058Nup50xl CON167A fw	GGATTGTGAAACATGTTAATGCAGcaCCGCTGTGTG ATCTGACCC
10 59	#1059Nup50xl CON167A rv	GGGTCAGATCACACAGCGGtgcTGCATTAACATGTTT CACAATCC
10 60	#1060Nup50xl COC170A fw	ACATGTTAATGCAAATCCGCTGgcaGATCTGACCCCG ATCTTTAAAG
10 61	#1061Nup50xl COC170A rv	CTTTAAAGATCGGGGTCAGATCtgcCAGCGGATTTGC ATTAACATGT
10 62	#1062Nup50xl COW159A fw	CCTGAATTGTAGCGTTCGTGATgcaATTGTGAAACAT GTTAATGCAAATC
10 63	#1063Nup50xl COW159A rv	GATTTGCATTAACATGTTTCACAATtgcATCACGAAC GCTACAATTCAGG
10 75	#1075Nup50xl CO 41-46A fw	GGTTCTGAAAACCCGTGCAATCgccgcaGCCgcagccgcc AATGCAGGCAATGAAAGCGAATC
10 76	#1076Nup50xl CO 41-46A rv	GATTTCGCTTTCATTGCCTGCATTggcggctgcGGCtgcggc GATTGCACGGGTTTTTCAGAACC

2.1.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCRs wurden wie folgt angesetzt:

5 µl	10x Puffer (Agilent)
50 ng	DNS-Matrize
1 µl	dNTP mix (2 mM) (Agilent)
18 µl	Primer 1 (0,5 µM) (Agilent)
18 µl	Primer 2 (0,5 µM) (Agilent)

Dieser Ansatz wurde mit destilliertem Wasser auf 49 µl aufgefüllt. Anschließend wurde 1µl PFU-Ultra HF DNS Polymerase 2,5 U/µl zugegeben und der gesamte Ansatz wurde durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren gemischt. Anschließend durchliefen die Proben im DNA Engine Peltier Thermal folgendes Programm:

Phase	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	30 sec	1
Denaturierung	92°C	30 sec	18
Anlagerung	55°C	60 sec	
Elongation	68°C	30 sec/1kb Länge	

20 µl des PCR-Produktes wurden mit 0,5 µl DpnI (10 U/µl) gemischt und für mindestens zwei Stunden bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Hitzeschocktransformation in XL-1, wie in Abschnitt 2.1.2.5 beschrieben, wobei nur 4 µl DNS verwendet wurden.

2.1.3.3 Testrestriktionsverdau von Minipreps

Es wurden direkt vier Minipreps pro *in vitro* Mutagenese angeimpft, vergleiche Abschnitt 2.1.2.6. Für den Testverdau der Minipreps wurde in einer 96-Wellplatte für jede DNS-Probe folgender Ansatz zusammengemischt:

5 µl	Wasser
5 µl	DNS
5 µl	Mastermix

Die Wellplatte wurde mit Parafilm versiegelt und bei 37°C für zwei Stunden inkubiert. Das Produkt des Restriktionsverdaus wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese wie in Abschnitt 2.1.2.6 analysiert und sequenziert, wenn die richtige Größe nachgewiesen wurde.

2.2 Proteinexpression und –aufreinigung

2.2.1 Hitzeschocktransformation von *E.coli* BL21de3

Aliquots à 200 µl kompetenter *E.coli* BL21de3 wurden auf Eis aufgetaut. Zu je 50 µl Bakterien wurden 0,5 µl DNS gegeben, dies wurde gevortext und für 20 Minuten auf Eis inkubiert. Die Proben wurden zuerst für 30 Sekunden in ein 42°C warmes Wasserbad gestellt, dann zwei Minuten auf Eis belassen. 0,5 ml auf 42°C vorgewärmtes LB-Medium wurden dazu gemischt bevor sie bei 37°C und 600 rpm 30 Minuten geschüttelt wurden. Anschließend wurden die Bakterien auf kanamycinhaltigen Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht kultiviert.

2.2.2 Testexpression durch Autoinduktion

Die Proteinexpression im kleinen Maßstab wurde durchgeführt, um die optimalen Expressions- und Aufreinigungsbedingungen herauszufinden. Es wurden transformierte Kolonien gepickt und in LB-Medium + 25 µg/ml Kanamycin angeimpft. Zur Autoinduktion wurden von über Nacht kultivierten BL21de3 Bakterien 500 µl in 200 ml Kolben wachsen gelassen, welche folgenden Inhalt hatten:

50 ml	LB-Medium
1 mM	MgSO ₄
1 ml	50x 5052 (25% Glycerol, 2,5% Glukose 10% α-Laktose)
2,5 ml	20x NPS (0,5M (NH ₄) ₂ SO ₄ , 1 M KH ₂ PO ₄ , 1 M Na ₂ HPO ₄ xH ₂ O)
50 µl	25 mg/ml Kanamycin

Die Bakterien wurden bei 37°C und 300 rpm im Infors HT Multitron Incubator geschüttelt bis eine OD₆₀₀ von mindestens 1,5 erreicht wurde. Um dies zu messen, wurden regelmäßig Proben entnommen und per Photometrie analysiert. Jede Testexpression eines Konstrukts wurde aufgeteilt auf Temperaturen von 18°C, 25°C, 30°C und 37°C und über Nacht bei 300 rpm im Schüttler belassen. Am folgenden Morgen wurden die Bakterien bei einer OD₆₀₀ von mindestens 5 abgeerntet.

2.2.3 Testaufreinigung von His₆-gekoppelten Proteinen

Die Bakterien der autoinduzierten Kultur wurden am nächsten Tag in verschließbaren 50 ml Zentrifugationsbechern gesammelt und 15 Minuten bei 4000 rpm und 4°C zentrifugiert, hierzu wurde der Sorvall Heraeus 75002028 K Rotor in der Heraeus Multifuge 1L-R Zentrifuge verwendet. Alle weiteren Schritte fanden in der Kältekammer bei 4°C oder mit auf Eis gelagerten Proteinen und Puffern statt. Nachdem der Überstand verworfen wurde, sind die Bakterien in je 15 ml Ni-Waschpuffer und 0,2 ml 0,2 M PMSF resuspendiert worden. Durch den EmulsiFlex-C3 High-Pressure Homogenizier (Avestin Inc.) wurde ein Druck von 500-1000 bar aufgebaut, so dass die Bakterien aufgebrochen wurden. Anschließend wurde den homogenisierten Produkten je 1 mM MgCl₂, 15 µl 10 mg/ml DnaseI (Roche) in PBS sowie 0,2 ml 0,2 M PMSF zugegeben. Nach einer zehnminütigen Inkubation auf Eis wurden die Zelltrümmer in dem SS34-Rotor (Sorvall) 15 Minuten bei 15000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde durch eine Mullbinde filtriert. Etwa 40 µl der Pellets wurden ebenfalls entnommen und für eine spätere Analyse in 400 µl Wasser resuspendiert. Zum Überstand wurden 0,2 ml einer 50% Nickel-NTA-Agarose-Suspension (Qiagen) gegeben, bevor dieser bei 4°C für zwei Stunden rotiert wurde. Im Anschluss wurden die Nickel-Kügelchen bei 1000 rpm zwei Minuten in der Multifuge 1L-R Zentrifuge abzentrifugiert. Zur späteren Analyse des ungebundenen Proteins wurden 40 µl des Überstands entnommen, der restliche Überstand wurde abgesaugt. Daraufhin wurden die Nickel-Kügelchen mit 1-2 ml Ni-Wasch-Puffer aufgenommen und auf 5 ml Säulen (Pierce Centrifuge Columns, Thermo Scientific) gegeben. Dort wurden sie mit je 20 ml Ni-Wasch-Puffer gewaschen. Um das Protein von den Nickel-Kügelchen zu lösen, wurden 0,2 ml Elutions-Puffer auf die geschlossenen Säulen pipettiert, gevortext und für zwei Minuten inkubiert. Das anschließend gesammelte Eluat, das Pellet und das ungebundene Protein wurden bis zur Analyse mittels SDS-PAGE auf Eis gelagert.

Ni-Wasch-Puffer

20 mM	TRIS pH 7.4
30 mM	Imidazol pH 7.5
500 mM	NaCl
In Wasser	

Ni-Elutions-Puffer

20 mM	TRIS pH 7.4
400 mM	Imidazol pH 7.5
500 mM	NaCl
10%	(v/v) Glycerol
In Wasser	

2.2.4 Expression größerer Mengen His₆-gekoppelter Proteine

Die Hitzeschocktransformation und das Kultivieren auf kanamycinhaltigen Agarplatten fanden auf gleiche Weise statt wie im Abschnitt 2.2.1 beschrieben. Ebenso wurden die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert und Kolonien der jeweiligen Konstrukte sind gepickt worden, um diese in LB-Medium + 25 µg/ml Kanamycin über Nacht anwachsen zu lassen. Für die Autoinduktion wurden in zwei 2 l-Kolben je 500 ml LB-Medium vorgelegt und 1 mM MgSO₄, 10 ml 50x 5052, 25 ml NPS und 25 µg/ml Kanamycin hinzugefügt. 5 ml der Übernachtskultur wurden zugegeben und bei 37°C und 300 rpm im Infors HAT Multitron geschüttelt bis eine OD₆₀₀ von 1,5 gemessen werden konnte. War diese Bakteriendichte erreicht, wurden die Flaschen in einen Schüttler mit den optimalen Temperaturen von 18°C umgeschichtet, wo sie ebenfalls bei 300 rpm über Nacht belassen wurden. Die OD₆₀₀ sollte am nächsten Morgen mindestens 5 betragen, bevor die Zellen gesammelt wurden.

2.2.5 Aufreinigung von His₆-gekoppelten Proteinen im großen Maßstab

Die autoinduzierten Übernachtskulturen wurden für 15 Minuten bei 4°C und 4000 rpm im SLC-6000 Rotor (Sorvall) in der Sorvall Evolution RC Zentrifuge zentrifugiert. Alle weiteren Schritte erfolgten in der Kältekammer oder mit auf Eis gelagerten Proteinen und Puffern. Nachdem der Überstand verworfen war, wurden die Bakterien mit je 60 ml Ni-Waschpuffer und 1,5 ml 0,2 M PMFS resuspendiert. Daraufhin wurden die Bakterien bei 500-1000 bar im EmulsiFlex-C3 High Pressure Homogenizer (Avestin Inc.) aufgebrochen und nach Zugaben von 1 ml 1 mM MgCl₂, 1 ml 10 mg/ml DnaseI und 2 ml 0,2 M PMSF für 10 Minuten auf Eis gelagert. Die Bakterienbruchstücke wurden bei 4°C und 12.000 rpm im SLA1500 Rotor (Sorvall) 15 Minuten lang abzentrifugiert. Falls der Überstand noch nicht ganz klar war, wurde die Zentrifugation wiederholt. Anschließend wurde der Überstand durch eine Mullbinde gefiltert, wobei zusätzlich eine Probe des Pellets genommen und in 400 µl Wasser resuspendiert wurde. Die Probe wurde bis zur Analyse auf Eis gelagert. Es wurden 4 ml einer 50% Nickel-NTA-Agarose-Suspension (Qiagen) zum Überstand pipettiert und diese bei 4°C für zwei Stunden langsam rotierend inkubiert. Jede Probe wurde in 50 ml Säulen (BioRad) transferiert und der direkte Durchfluss als ungebundene Proteinprobe gesammelt. Gewaschen wurden die Säulen mit 200 ml Ni-Waschpuffer. Pro 1 ml zugegebener Ni-

NTA Agarose wurden 2 ml Ni-Elutionspuffer in die geschlossenen Säulen pipettiert. Nach Vortexen und zweiminütiger Inkubation wurde das Eluat aufgefangen und mit 1 mM DTT und 1 mM EDTA gemischt. Die Proteine wurden vorerst in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert.

2.2.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Konzentration der aufgereinigten Proteine zu bestimmen, wurden vom Eluat 10, 5 und 2,5 µl auf das SDS-Gel geladen und als Referenzwerte wurden je 5 µl Bovines Serum Albumin (BSA) in folgenden Konzentrationen auf das gleiche Gel gegeben: 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,3 mg/ml. Aus den Verhältnissen der Banden konnte die Proteinkonzentration abgeschätzt werden.

2.2.7 GST-Pulldown-Assay

Zum Nachweis von Proteininteraktion wurden GST-Pulldown-Assays durchgeführt. Getestet wurden GST-Nup50 Fragmente mit *Xenopus laevis* Ei-Extrakten. Je 1 mg GST-gekoppeltes Nup50-Proteinfragment wurden mit 200 µl 50% Suspension GSH-Sepharose rotierend bei 4°C über Nacht inkubiert. Nachdem die proteingebundenen GST-Kügelchen zwei Minuten bei 5000 rpm abzentrifugiert worden sind, wurden sie einmal mit 2ml 1x PBS gewaschen. Es folgte eine Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen der GST-Kügelchen 2 ml 5% BSA in PBS für eine Stunde rotierend bei 4°C. Danach wurden die Kügelchen 5x mit 2 ml gekühltem PBS bei 5000 rpm gewaschen und eine 50% Suspension wurde durch die Zugabe von 100 µl PBS hergestellt. Dieser Punkt eignete sich auch zur Lagerung der proteingebundenen Kügelchen bei 4°C. Dazu mussten 0,05% NaN₃, 0,1 mM PMSF und 1/100 PI zugegeben werden. 1 ml des fertigen Ei-Extrakts wurde mit 1 ml PBS und 20 µl Proteaseinhibitor gemischt und für 30 Minuten bei 100.000 rpm zentrifugiert. Je 300 µl des Überstandes (oder 300 µl PBS bei der Negativkontrolle) wurden mit 60 µl der 50%igen Kügelchen-Suspension versehen und in Mobicol-Säulen gefüllt, welche dann für zwei Stunden bei 4°C rotierend inkubiert wurden. Zuerst wurden die geschlossenen, dann die offenen Säulen für 30 Sekunden bei 1200 rpm zentrifugiert. Die Säulen wurden 5x mit je 800 µl PBS gewaschen und in ein frisches Eppendorfgefäß gesetzt. Im Anschluss konnte die Elution mit TEV (0,7 mg/ml in PBS) stattfinden. Hierzu wurden

die geschlossenen Säulen mit 30 µl TEV-Lösung versehen, gevortext und eine Stunde bei 25°C und 400 rpm geschüttelt. Die Säulen wurden geschlossen und anschließend offen zentrifugiert (2000 rpm, zwei Minuten). Zum Eluat wurden 20 µl SDS gegeben, dies wurde bei 95°C erhitzt und bis zu weiteren Verwendung eingefroren.

10x PBS

2 g KCl
 80 g NaCl
 17,8 g Na₂HPO₄·2H₂O
 2,4 g KH₂PO₄
 pH auf 7,4 einstellen

2.2.8 SDS-PAGE

2.2.8.1 Herstellung der Gele

Die SDS-Gele wurden in einer Apparatur der Firma BioRad (Mini-Protean Tetra system) hergestellt. Vorab wurden die Glasplatten erst mit destilliertem Wasser und dann mit 96%igem Ethanol abgespült. Das Trenngel wurde bis 1,5 cm unter dem Rand gefüllt und mit 0,1% SDS überschichtet, um eine gerade blasenfreie Oberfläche zu gewährleisten. Nachdem das Gel vollständig auspolymerisiert war, konnte die SDS-Lösung entfernt, der freie Raum mit Sammelgel gefüllt und ein Kamm für die Taschen eingesetzt werden. Anschließend wurden die Gele direkt benutzt oder in nasse Papiertücher eingewickelt und mit Frischhaltefolie abgeschlossen bis zu sechs Wochen bei 4°C gelagert.

20 ml Trenngel

6,6 ml Wasser
 8,0 ml 30% Acrylamid
 5,0 ml 1,5 M TRIS pH 8,8
 0,2 ml 10% SDS
 0,008 ml TEMED
 0,2 ml 10% APS

5 ml Sammelgel

3,4 ml Wasser
 0,83 ml 30% Acrylamid
 0,63 ml 1 M TRIS pH 6,8
 0,05 ml 10% SDS
 0,005 ml TEMED
 0,05 ml 10% APS

2.2.8.2 Probenvorbereitung und Gelelektrophorese

Die Proben wurden im Verhältnis 2:1 mit 6xSDS-Ladepuffer gemischt und für fünf Minuten bei 95°C im neoLab neoBlock HeizerDuo 2-2504 erhitzt und anschließend für eine Minute bei 13,300 rpm abzentrifugiert (Thermo Electron Cooperation Heraeus Pico17 Centrifuge). Pro Tasche wurden 10 µl geladen (Abweichungen sind angegeben) und zum Größenvergleich wurden 8 µl vorab erhitzter Low Molecular Weight (Fermentas) oder 10 µl High Molecular Weight Proteinstandard (Serva) aufgetragen. Laemmli Puffer wurde in die Gel-Kammern gefüllt und 15 mA Stromstärke wurden pro Gel angelegt, bis die Proben das Trenngel erreicht hatten. Danach wurde die Stromstärke auf 25 mA erhöht.

6x SDS-Ladepuffer

18,75 ml 1 M TRIS (pH 6,8)
30 g Saccharose
9 g SDS
1 ml 0,1% Bromphenolblau
Bis 90 ml mit Wasser auffüllen. Vor
Gebrauch mit 100 mM DTT versetzen.

10x Laemmli Puffer

50 g SDS
721 g Glycerin
150 g TRIS
auf 5 l mit Wasser auffüllen

2.2.8.3 Gel-Färbung

Um die Banden sichtbar zu machen, wurde das Gel mindestens für eine Stunde in der Coomassie-Färbelösung belassen. Anschließend wurde es für je 30 Minuten mittels Entfärbelösung I und Entfärbelösung II entfärbt. Daraufhin wurden die Gele mehrmals mit Wasser gewaschen und in Zellophan getrocknet.

Coomassie Färbelösung

2,5 l Methanol
0,5 l 99%ige Essigsäure
10 g Coomassie R-250
auf 5 l mit Wasser auffüllen, mit
Whatman Filterpapier filtern

Coomassie Entfärbelösung I

2,5 l Methanol
0,5 l 99%ige Essigsäure
Bis 5 l mit Wasser auffüllen

Coomassie Entfärbelösung II

0,5 l Methanol

0,25 l 99%ige Essigsäure

Bis 5 l mit Wasser auffüllen

2.2.9 Western Blot

Es erfolgte ein Transfer der durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran. Dafür wurde 1xTris/Glycerin + 20% Ethanol als Transferpuffer verwendet. Der Transfer lief über Nacht bei 30 mA pro Gel bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Übertragung der Proteine mit Ponceau-Färbung (0,1% Ponceau in 1%iger Essigsäure) überprüft und die Markerbanden mit Bleistift nachgezeichnet. Anschließend wurden die Membranen mit 5% Milchpulver in PBS und 0,1% Tween geblockt. Hierzu wurde erst mit der Milchlösung für zehn Minuten entfärbt und dann mit 50 ml Milchlösung und 5 µl 5%-igem NaN₃ bei 4°C über Nacht gelagert.

Am Folgetag wurden die primären Antikörper in frischer Milchlösung verdünnt (das Verhältnis ist der Tabelle zu entnehmen) und für zwei Stunden inkubiert. Die Membran wurde 1x eine Minute und 3x fünf Minuten mit 0,1% Tween in PBS gewaschen.

Verwendete primäre Antikörper		
Antigen	Name	Verhältnis
Nup153	153IP84	1:1000
Mel28	K256	1:1000
Importin α	BLNG	1:1000
Importin β	K169	1:1000

Der sekundäre Antikörper Ziege anti Kaninchen HRP wurde im Verhältnis 1:5000 in Milchlösung verdünnt und eine Stunde mit der Membran bei 30 rpm inkubiert. Danach wurde die Membran 3x eine Minute und 8x fünf Minuten mit PBS-0,1% Tween und abschließend 2x eine Minute mit Wasser gewaschen. Anhand von Chemolumineszenz (Verhältnis der ECL Reagenzien 1:1) wurden die Proben analysiert.

2.3 Zellkultur

2.3.1 HeLa-Zellen splitten (Angaben für 20 ml Flascheninhalt)

Zum Splitten der HeLa-Zellen wurde 37° warmes 1xPBS und DMEM full-Medium benötigt. Die Zellflasche wurde zweimal mit PBS gewaschen, dann 2,5 ml Trypsin (0,05% in EDTA) direkt auf den Zellrasen gegeben. Durch vorsichtiges Klopfen konnte abgeschätzt werden, ob sich die Zellen schon gelöst hatten. War dies der Fall, wurden 2,5 ml DMEM full-Medium zugegeben und davon je nach gewünschtem Splittingverhältnis 250 µl bis 1 ml in die neue Flasche mit 20 ml vorgelegtem Medium gegeben.

DMEM full-Medium

440 ml	DMEM high Glucose
50 ml	FCS
5 ml	100x Glutamine
5 ml	Penicillin 10.000 U/ml/ Streptomycin 10 mg/ml

2.3.2 Transfektion von HeLa-Zellen

Am ersten Tag der Transfektion wurden die HeLa-Zellen in einer 24er Wellplatte auf sterilen Deckgläschen ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurde überprüft, ob die optimale Konfluenz von 20-30% erreicht worden ist. Serumfreies Medium und das FuGENE6 Transfektionsreagenz (Roche) mussten auf Raumtemperatur gebracht werden. Pro Wellplatte wurden 24,25 µl serumfreies Medium in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert, dazu wurden von dem vorab gevortexten FuGENE Reagenz 0,75 µl zugefügt. Dieses Gemisch wurde gevortext und für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 0,25 µg Vektor-DNS hinzu pipettiert und nach dem Mischen abermals für 15-45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das Transfektionsgemisch wurde tropfenweise den Zellen zugegeben und die 24er Wellplatte vorsichtig geschwenkt. Für 36 Stunden wurden die Zellen im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ belassen.

Serumfreies Medium

440 ml	DMEM high Glucose
5 ml	100x Glutamine
5 ml	Penicillin 10.000 U/ml/ Streptomycin 10 mg/ml

2.3.3 Fixierung und Färbung

Am dritten Tag konnten die HeLa-Zellen fixiert werden. Hierzu wurden die Zellen dreimal mit 1x PBS gewaschen. Eventuell wurde 0,1% Triton-X100 (Merck) in PBS auf die Zellen gegeben und nach einer Sekunde wieder abgesaugt. Dann wurden sie mit 4% Paraformaldehyd (in PBS und NaOH zur Lösung) für 10-20 Minuten fixiert. Bevor und nachdem sie mit 1 ng/ μ l DAPI in PBS für zehn Minuten gefärbt wurden, wurden die HeLa-Zellen abermals mit 1x PBS gewaschen. Die Deckgläschen mit den fixierten Zellen wurden kurz in Wasser eingetaucht und die zellbeschichtete Seite auf den Objektträger gelegt, wo bereits ein Tropfen Vectashield Mounting Medium aufgetragen worden war. Abschließend wurde die Probe mit klarem Nagellack versiegelt. Diese Färbung gilt für Proben, die am Weitfeldmikroskop aufgenommen wurden. Alle Proben, die für die konfokale Mikroskopie präpariert wurden, sind statt mit DAPI 10-30 Minuten mit RedDot2 in PBS (Verhältnis 1:100) gefärbt worden.

2.3.4 Synchronisierung

Um möglichst viele HeLa-Zellen in der Mitose zu beobachten, wurden sie synchronisiert. Am ersten Morgen wurden die gesplitteten (Splittingverhältnis 1:10) Zellen in 6er Wellplatten in je 2 ml DMEM full-Medium ausgesät. Am Nachmittag des gleichen Tages wurden die DNS-Konstrukte transfiziert (pro Well: 1,1 μ g DNS, 3,3 μ l FuGENE6 Reagenz, 106,7 μ l serumfreies Medium). Nach mindestens sechs Stunden, wenn die Zellen 40% konfluent waren, wurden die Zellen mittels 2 mM Thymidin für 18-24 Stunden in der S-Phase arretiert. Am zweiten Tag wurde der Block aufgehoben, indem die Platten mit PBS gewaschen wurden und anschließend mit frischem DMEM full-Medium für weitere drei bis vier Stunden im Brutschrank belassen wurden. Daraufhin wurden die Zellen abermals arretiert, diesmal jedoch in der Metaphase mittels 100 ng/ml Nocodazol. Am dritten Morgen schwammen die meisten HeLa-Zellen

frei im Medium. Die wenigen noch an der Zellkulturflasche heftenden Zellen konnten durch vorsichtiges Klopfen gelöst werden. Alle Zellen wurden bei 1500 g für zehn Minuten abzentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt worden ist, wurden die Zellen in 5 ml frischem DMEM full-Medium resuspendiert. Anschließend konnten sie auf sterile, mit Poly-L-Lysin vorbehandelte Deckgläschen in 24er Wells ausgesät werden. Je nachdem, welche Phase hauptsächlich analysiert werden sollte, wurden die Zellen nach 30, 60, 90, 120, 180 oder 240 Minuten aus dem Brutschrank genommen und in gleicher Weise wie die interphasischen HeLa-Zellen fixiert und gefärbt.

2.3.5 Immunfluoreszenz

Zum Nachweis der Kernporenkomplexe in einem bestimmten Mitosestadium wurde eine Immunfluoreszenz durchgeführt. Begonnen wurde mit einer Fixierung der Zellen mit 4% Paraformaldehyd in PBS. Nach einer fünfminütigen Inkubation mit 50 mM NH_4Cl in PBS wurden die Zellen mit die Blockierungs-Puffer 3% BSA in PBS + 0,1% Triton X-100 geblockt. Im Anschluß erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper mAB414 (1:2000) in Blockierungs-Puffer für 30 Minuten in der Feuchtkammer. Hierzu wurde die zellenbeschichtete Seite auf einen Tropfen des Antikörper-Gemischs gelegt. Dem sechsfachen Waschvorgang mit PBS + 0,1% Triton folgte eine zweistündige Inkubation mit Alexa 488 gekoppelten Anti-Maus-Sekundärantikörpern (1:2000) in Blockierungspuffer. Abschließend wurden die Proben zehnmal mit PBS + 0,1% Triton X-100 gewaschen und auf die gleiche Weise gefärbt und versiegelt, wie im Abschnitt Fixierung und Färbung beschrieben.

2.3.6 Mikroskopie

Die Aufnahmen der Chromatinlokalisierung fanden am Zeiss Axiovert 200M Mikroskop statt mit dem 60x Objektiv. Die Lokalisation an der Kernhülle sowie die Immunfluoreszenz wurden am konfokalen Mikroskop LSM510 (Axioplan2 imaging) aufgenommen. Es wurde der Argon Laser bei 488 nm sowie 633 nm verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Eine Vorbehandlung mit Triton X-100 lässt eine bessere Beurteilung zur Lokalisation von Nup50 an der Kernhülle zu

Über die Lokalisation von Nup50 war bereits bekannt, dass es zum einem diffus im Nukleoplasma verteilt ist und zum anderen als Teil des Kernporenkomplexes an der Kernhülle lokalisiert ist. Um ein detaillierteres Bild der Nup50 Lokalisation an der Kernhülle zu gewinnen, war es wichtig das nukleoplasmatische Nup50 und dessen intensives Signal zu reduzieren, um eine eindeutige Beurteilung der Lokalisation dieses Proteins am Kernporenkomplex treffen zu können. Aus diesem Grund wurde eine Vorbehandlung mit Triton X-100 getestet. Triton X-100 permeabilisiert Membranen, so dass zytoplasmatisches und nukleoplasmatisches Nup50 ausgewaschen wird ohne den an die Kernhülle gebundenen Teil zu eliminieren.

Nup50-DNS-Konstrukte, an die fluoreszierendes eGFP gekoppelt worden ist, wurden in *Escherichia coli* hergestellt und anschließend in HeLa-Zellen transfiziert. Diese Zellen wurden in zwei Gruppen aufgeteilt und am Folgetag mit Paraformaldehyd (PFA) fixiert, wobei eine Gruppe vor der Fixierung mit Triton X-100 vorbehandelt worden ist und die andere nicht. Anschließend habe ich alle Zellen mit dem Farbstoff RedDot2 angefärbt, um das Chromatin sichtbar zu machen. Daraufhin wurden das eGFP- und RedDot-Signal für beide Gruppen in unterschiedlichen Kanälen am konfokalen Mikroskop aufgenommen.

Betrachtet man die Abbildung 8, so ist in den meisten Zellen, die nicht mit Triton vorbehandelt worden sind, eine Kernhüllenanfärbung sichtbar, jedoch lässt es sich schwer vom starken nukleoplasmatischen Nup50-Signal abgrenzen. Im Bereich der Nukleoli ist das eGFP-Signal ausgespart. Die DNS-Anfärbung der nicht vorbehandelten HeLa-Zellen zeigt eine leichte unspezifische Mitanfärbung des Zytoplasmas. Besonders Kernhülle und Heterochromatin stechen durch ihre Signalstärke hervor. Im Vergleich dazu führt eine Triton Vorbehandlung durch Signalreduktion im Nukleoplasma zu einer deutlicheren Kernhüllenanfärbung. Auffallend ist hierbei auch das punktierte Muster der Nup50-Fluoreszenz, welches typisch für die Färbung von Kernporenkomplexen ist. In beiden Gruppen finden sich vereinzelt helle Punkte im Nukleoplasma (Pfeilkopf), bei denen es sich um Akkumulationen des Proteins oder Invaginationen der Kernhülle

handeln könnte. Im RedDot-Kanal (DNS-Färbung) ist zu sehen, dass es durch die Triton Behandlung auch zu einer Abschwächung der diffusen Zytoplasmafärbung kommt. Auch hier zeigen Heterochromatin und Kernmembran ein deutliches Signal.

Anhand der Abbildung 8 wird deutlich, dass eine Triton-Präextraktion der zu fixierenden HeLa-Zellen zu einem deutlicheren Nup50-Signal an der Kernhülle führt. Aus diesem Grund wurden alle weiteren Versuche, die interphasische HeLa-Zellen beinhalten, mit einer Triton-Vorbehandlung durchgeführt. Zeitgleich wurde stets eine Gruppe ohne Triton-Behandlung fixiert und fotografiert, damit eine eventuelle Zytoplasmafärbung mitbeurteilt werden konnte.

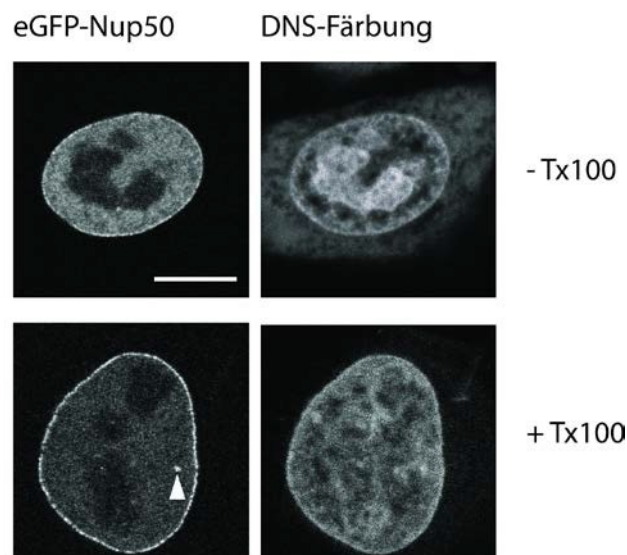


Abbildung 8: Eine Präextraktion mit Triton X-100 zeigt die Färbung der Kernhülle deutlicher

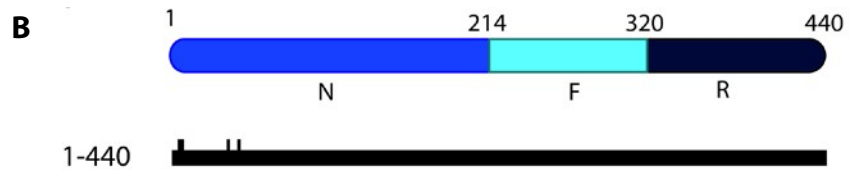
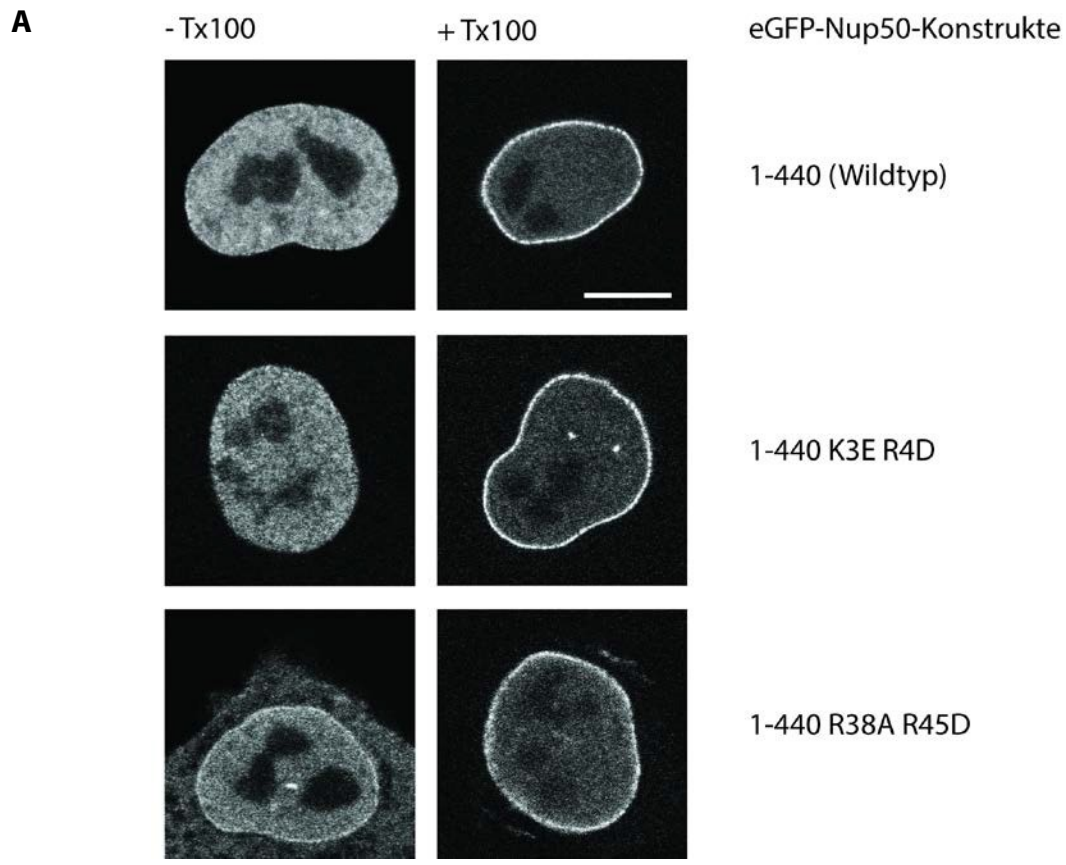
eGFP-Nup50 transizierte HeLa-Zellen wurden 36 Stunden nach der Transfektion entweder direkt fixiert (obere Reihe, - Tx100) oder nach einem kurzen Waschen mit 0,1% Triton X-100 in PBS (untere Reihe, + Tx100). Im Anschluss wurde die DNS mit RedDot2 angefärbt und die Proben durch konfokale Mikroskopie analysiert. Vereinzelt starke Signalpunkte im Nukleoplasma sind exemplarisch mit einem Pfeilkopf markiert. Balken 10 μm

3.2 Die Bindung zu Importin α ist nicht entscheidend für die Kernhüllenlokalisierung von Nup50

Da nun eine deutliche Darstellung von Nup50 als Bestandteil der Kernhülle möglich war, konnte ich der Frage nachgehen, was für die Lokalisation des Proteins entscheidend ist. Wie bereits erläutert besitzt Nup50 an seinem N-Terminus Bindungsstellen für Importin α (siehe Abschnitt 1.6). Diese Tatsache legt die Vermutung nahe, dass ein Zusammenspiel dieses Bindungspartners, z.B. in Form aktiven Transports von Nup50 auf die nukleoplasmatische Seite, entscheidend dafür ist, dass Nup50 an die Kernhülle gelangen kann. Dies lässt sich am besten durch Punktmutationen der Bindungsstellen nachprüfen.

Gruppenmitglieder der AG-Antonin hatten bereits zwei Doppelpunktmutationen auf dem Nukleoporin50 gefunden, die jeweils beide die Bindung zu Importin α abschwächen, wobei R38A R45D eine stärkere Bindungsinhibition darstellt als K3R R4D. eGFP-gekoppelte Nup50-Konstrukte, welche eine der beiden Mutationen R38A R45D oder K3R R4D enthielten sowie das Nup50-Wildtyp-Konstrukt wurden in HeLa-Zellen transfiziert. 36 Stunden (durchschnittlich 1,5 Zellzyklen) später wurden die HeLa-Zellen fixiert, wobei immer die Hälfte der Proben mit Triton X-100 vorbehandelt worden ist. Im Anschluss ist das Chromatin mittels RedDot2 angefärbt (hier nicht dargestellt) und die verschiedenen Proben am konfokalen Mikroskop aufgenommen worden (Abbildung 9).

Das Konstrukt K3R R4D zeigt ohne Triton ein relativ homogenes eGFP-Signal, wohingegen die Zellen, die mit Triton vorbehandelt worden sind, ein starkes Signal an der Kernhülle aufweisen und ein deutlich schwächeres innerhalb des Nukleoplasmas. Besonders auffallend sind neben Signalausparungen der Nukleoli in beiden Bildern die hellen Nup50 Akkumulationen im mit Triton behandelten Beispiel (Abb.9A + Tx100). Diese sind ebenfalls beim R48A R45D-Konstrukt vor allem im Bild ohne Triton-Behandlung (- Tx100) zu beobachten, welches eine Zytoplasmafärbung aufweist. Letzteres kann ein Indiz für verminderten Import von Nup50 sein, wobei eine Kernhüllenanfärbung immer noch erkennbar ist. Im Beispiel für eine Triton Vorbehandlung des R38A R45D Konstrukts, ist eine sichtbare Kernhüllenanfärbung erkennbar, ebenso sind zytoplasmatische Signalreste von Nup50 vorhanden.



Punktmutationen	Kernhüllenlokalisierung
1-440 Wildtyp	+
1-440 K3E R4D	+
1-440 R38A R45D	+

Abbildung 9: Eine Blockade der Importin α -Bindungsstellen verhindert nicht die Lokalisation von Nup50 an die Kernhülle

A) In N-terminal eGFP fusioniertem Nup50 wurden doppelte Punktmutationen generiert. Sowohl K3R R4D als auch R38A R45A sind Mutationen, welche die Bindung zu Importin α abschwächen. 36 Stunden nach der Transfektion in HeLa-Zellen wurden die Zellen entweder direkt fixiert (linke Spalte, - Tx100) oder nach einem kurzen Waschen mit 0,1 % Triton X-100 in PBS (rechte Spalte, + Tx100) und anschließend durch konfokale Mikroskopie analysiert. Balken 10 μ m

(B) Die schematische Übersicht zeigt die in (A) verwendeten Nup50-Punktmutationen und, ob eine Kernhüllenlokalisierung sichtbar war. Im Verhältnis zum vollständigen Protein (erste und letzte Aminosäure sind angegeben) werden die verschiedenen Regionen des Wildtyp-Nup50-Proteins (N,F,R siehe auch Abschnitt 1.6) dargestellt.

Beide Doppelpunktmutationen zeigen in der mit Triton X-100 behandelten Variante ein deutliche Anfärbung der Kernhülle und somit eine klare Lokalisation von Nup50 an der nukleären Membran trotz reduzierter Bindung zu Importin α . Dies führt zur Annahme, dass der nukleäre Transport von Nup50 nicht ausschlaggebend für dessen letztendliche Position am Korb des Kernporenkomplexes ist.

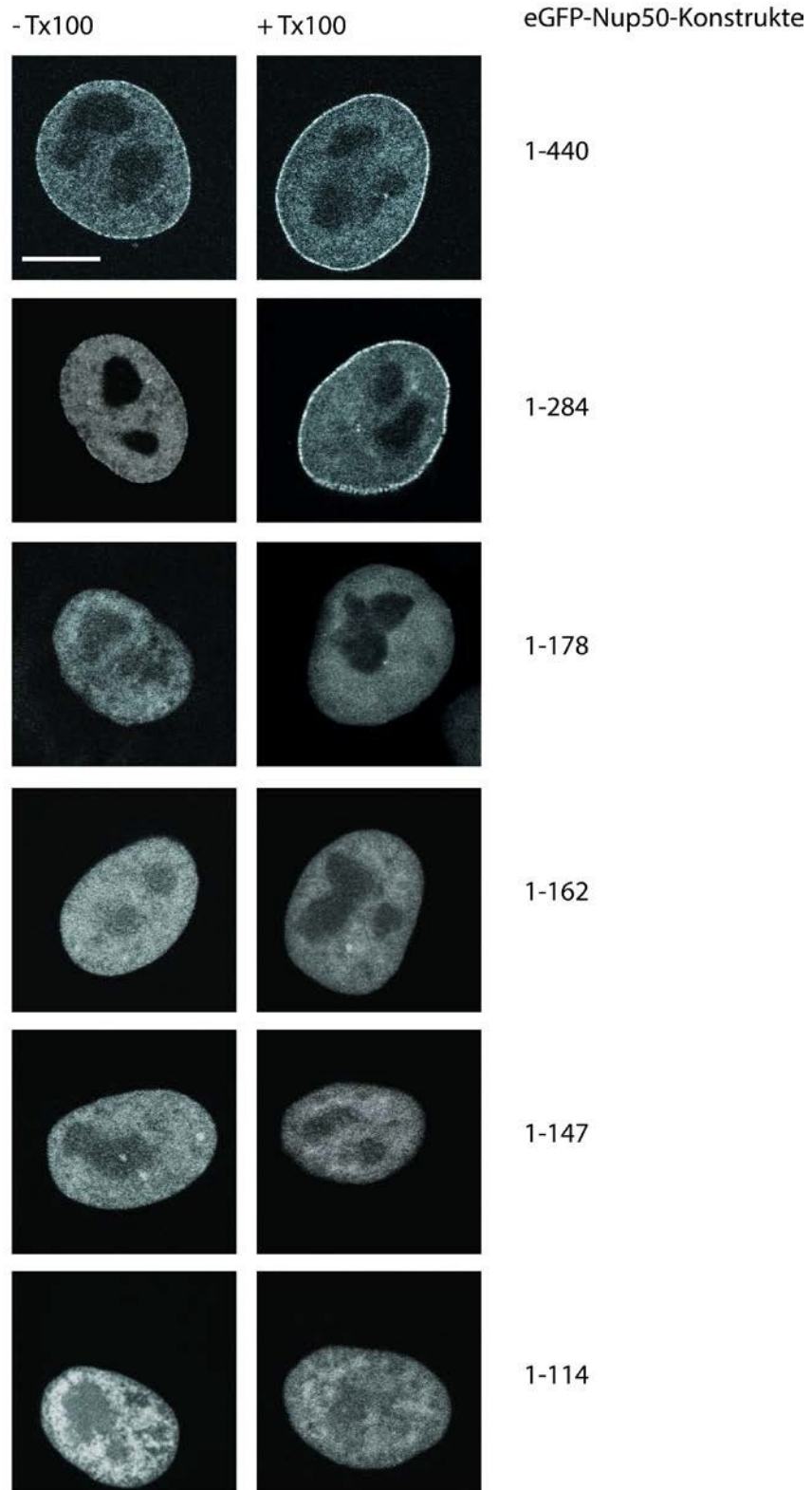
3.3 Die Ran-bindende Domäne ist nicht relevant für die Lokalisation von Nup50 an der Kernhülle

Um herauszufinden, ob alle Domänen von Nup50 für die Kernhüllenlokalisierung wichtig sind, habe ich verschiedene Fragmentlängen des 440 Aminosäuren langen Proteins mit der bereits angewandten Methodik getestet. Begonnen wurde mit einer Verkürzung vom C-Terminus des N-terminal eGFP gebundenen Nup50 Proteins.

So wurden zusätzlich zum Wildtyp fünf Konstrukte kloniert, die unterschiedliche Längen des ursprünglichen Proteins darstellen, aber alle die R-Domäne nicht mehr beinhalten, und diese in HeLa-Zellen transfiziert. Am darauffolgenden Tag konnten die transfizierten Proben zur Hälfte mit Triton vorbehandelt und anschließend alle Zellen fixiert werden. Zur Darstellung des Chromatins wurden alle Proben mit RedDot2 angefärbt. Die Aufnahmen der Abbildung 10 wurden am konfokalen Mikroskop erstellt (RedDot2-Signal wird nicht gezeigt).

Bei den direkt fixierten Proben der Abbildung 10 ist außer dem schwachen Signal beim Wildtyp keine Kernhüllenfärbung sichtbar. Ebenfalls ist bei keinem der Beispiele ein zytoplasmatisches Fluoreszenz-Signal aufgenommen worden. Dies lässt einen intakten nukleären Transport von Nup50 vermuten. Man kann in den Triton-präextrahierten Zellen eine Kernhüllenanfärbung als deutlichen Ring im Wildtyp und dem Fragment der Länge 1-284 sehen. Alle kleineren Fragmente, die nur Teile der N-Domäne sind, weisen

A



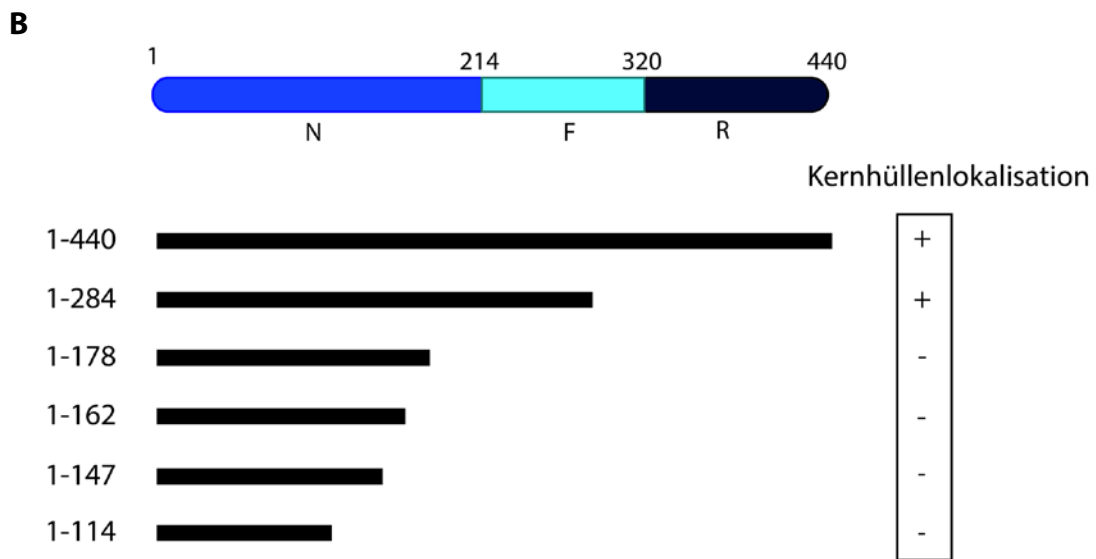


Abbildung 10: Der C-Terminus von Nup50 ist nicht notwendig für die Lokalisation an der Kernhülle

A) C-terminale Verkürzungen von N-terminal eGFP fusioniertem Nup50 wurden generiert und in HeLa-Zellen transfiziert. 36 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen entweder direkt fixiert (linke Spalte, - Tx100) oder nach einem kurzen Waschen mit 0,1 % Triton X-100 in PBS (rechte Spalte, + Tx100) und anschließend durch konfokale Mikroskopie analysiert. Balken 10 μ m

(B) Die schematische Übersicht zeigt die in (A) verwendeten Nup50-Verkürzungen sowie ihre jeweilige Fragmentlänge mit den Positionen der ersten und letzten Aminosäure und, ob sie an die Kernhülle lokalisieren. Im Verhältnis dazu werden die verschiedenen Regionen des Wildtyp-Nup50-Proteins (N, F, R siehe auch Abschnitt 1.6) dargestellt.

keine Kernhüllenfärbung auf. Auffallend sind die heterogenen Kerne des Konstrukts 1-114, was eine Austrocknung der Zellen im Fixierungsprozess zur Ursache haben könnte. Es ist also möglich mittels dieses Vorgehens die Kernhüllenlokalisierung von Nup50 zu inhibieren und Aussagen über die Lokalisation von diesem Nukleoporin zu treffen. Des Weiteren zeigt das starke Kernhüllensignal des 1-284 Fragments, dass selbst bei fehlender Ran-bindender Domäne eine Lokalisation an der Kernhülle stattfindet. Somit scheint die Interaktion zwischen Ran und Nup50 irrelevant für dessen Lokalisation am Kernporenkomplex zu sein.

3.4 Nup50 lokalisiert ohne N-Terminus an die Kernhülle

Weitere Verkürzungen des Fragmentes können den für die Lokalisation entscheidenden Teil von Nup50 weiter eingrenzen. Das Konstrukt 1-284 ist aus dem vorherigen Experiment als kleinstmögliche an die Kernhülle lokalisierende C-terminale Verkürzung hervorgegangen. Interessant zu wissen ist also, welches das kleinste Fragment ist, das nach N-terminaler Verkürzung immer noch ausreicht, um Nup50 an die Zellkernmembran zu bringen.

Hierzu wurden fünf Mutanten generiert, die bei einem C-terminalen Ende auf Höhe der Aminosäure 284 unterschiedliche N-Termini aufweisen. Alle Konstrukte haben ihren N-Terminus im Bereich der N-Domäne. Angewendet wurde die gleiche Methodik wie in den beiden vorherigen Abschnitten.

Die Ergebnisse dieses Schrittes sind in Abbildung 11 dargestellt. Nicht überraschend ist die (ausgenommen den Wildtyp) durchgängige zytoplasmatische Färbung der direkt fixierten Zellen in der linken Spalte. Schließlich fehlt all diesen Konstrukten die Importin α -Bindungsstelle. Analog dazu wies die Doppelpunktmutante R38A R45D im vollständigen Protein einen ähnlichen Phänotyp auf (siehe Abb. 9). Die mit Triton behandelte Probe des Konstrukts 120-284 konnte nicht verwendet werden. Allerdings konnte in der Probe ohne Triton ein so starkes Kernhüllensignal aufgenommen werden, dass dieses Konstrukt ebenfalls als an die Membran lokalisierende Probe gewertet werden kann.

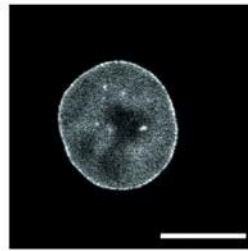
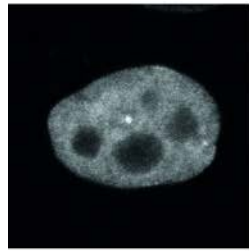
Eine Verkürzung des N-Terminus um die ersten 144 Aminosäuren inhibiert die Lokalisation von Nup50 nicht. Eine weitere N-terminale Verkürzung, wie man am Konstrukt 155-284 sehen kann, hebt das typische Kernhüllensignal auf. Somit ist das kleinste bisher gefundene Fragment, welches noch an die Kernhülle lokalisiert, das Fragment 144-284.

A

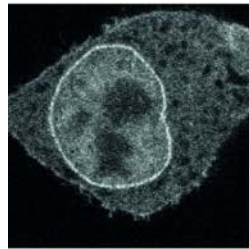
-Tx100

+Tx100

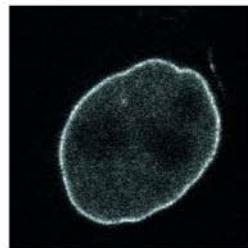
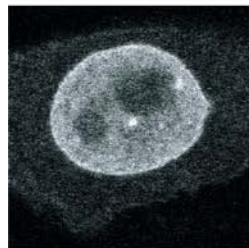
eGFP-Nup50-Konstrukte



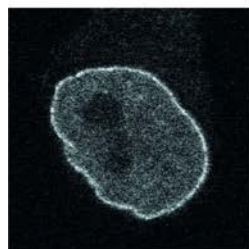
1-440 (Wildtyp)



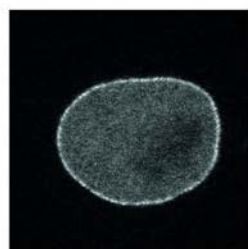
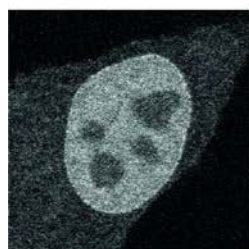
48-284



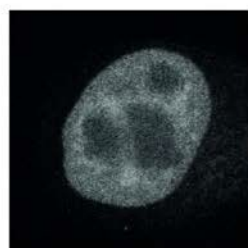
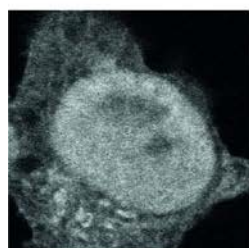
81-284



120-284



144-284



155-284

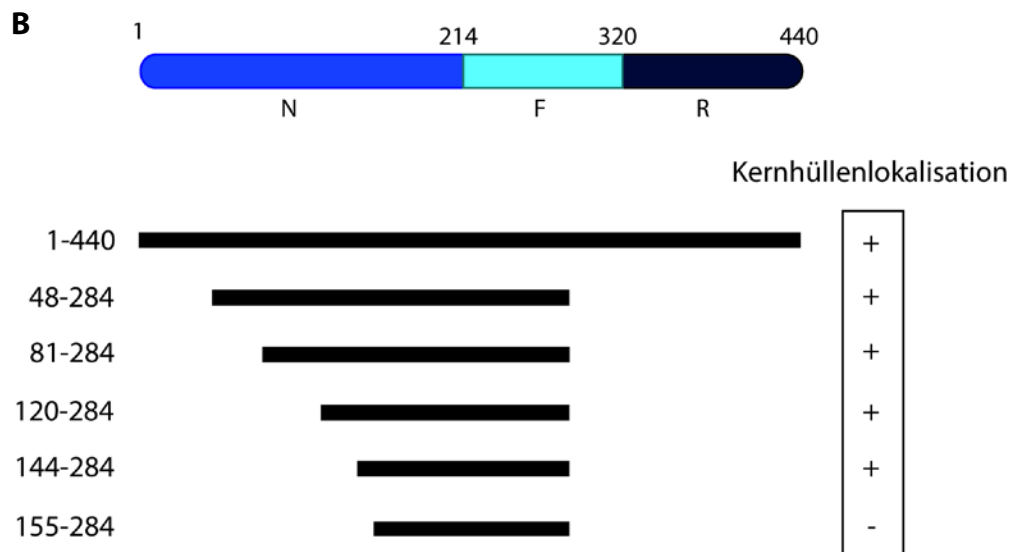


Abbildung 11: Der N-Terminus ist nicht entscheidend für die Lokalisation an die Kernhülle

A) N-terminale Verkürzungen von N-terminal eGFP fusioniertem Nup50 wurden generiert und in HeLa-Zellen transfiziert. 36 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen entweder direkt fixiert (linke Spalte, - Tx100) oder nach einem kurzen Waschen mit 0,1 % Triton X-100 in PBS (rechte Spalte, + Tx100) und anschließend durch konfokale Mikroskopie analysiert. Die Aminosäurepositionen der verschiedenen Fragmente sind angegeben. Die Triton X-100 vorbehandelte Probe der Fragmentlänge 120-284 konnte nicht verwendet werden. Allerdings ist bei diesem Konstrukt die Kernmembranlokalisierung auch schon ohne Triton sichtbar.

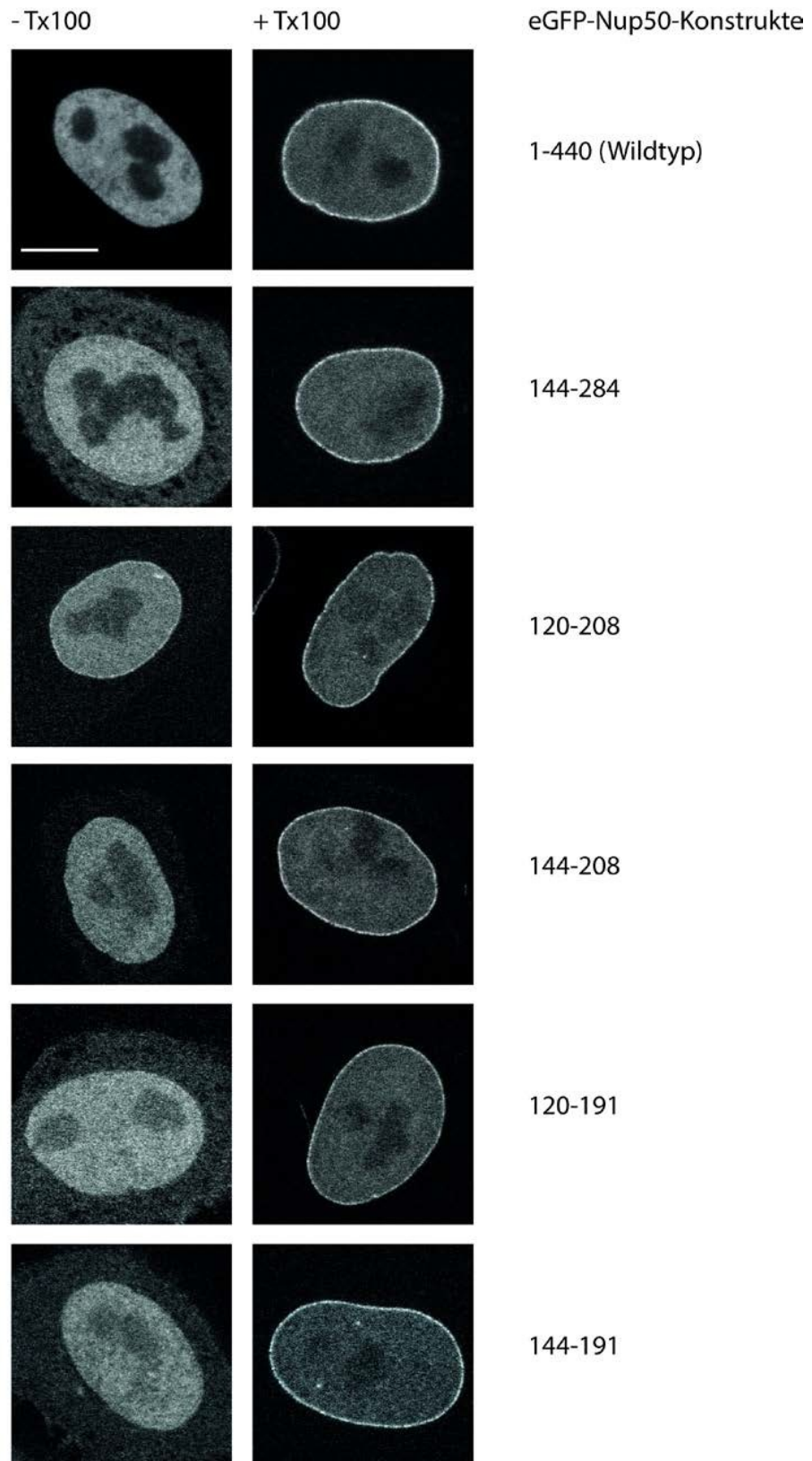
Balken 10 μm

(B) Die schematische Übersicht zeigt die in (A) verwendeten Nup50-Verkürzungen sowie die jeweilige Fragmentlänge mit Positionen der ersten und letzten Aminosäure und, ob sie an die Kernhülle lokalisieren. Im Verhältnis dazu werden die verschiedenen Regionen des Wildtyp-Nup50-Proteins (N, F, R siehe auch Abschnitt 1.6) dargestellt.

3.5 Ein minimales Bindungsfragment von 48 Aminosäuren lokalisiert Nup50 an der Kernhülle

Daraus resultiert die Frage, ob sich durch weitere kleinschrittige C-terminale Verkürzungen ein minimales Bindungsfragment finden lässt. Um dies zu überprüfen, wurden vier weitere Konstrukte generiert und in HeLa-Zellen transfiziert. Das Fragment 144-284 wurde zu Vergleichszwecken ebenfalls mitgetestet. Es wurden auch Konstrukte verwendet, die ihren N-Terminus vor der Aminosäure 144 haben. Damit sollten Fehlfaltungen durch zu kleine Fragmente ausgeschlossen werden.

A



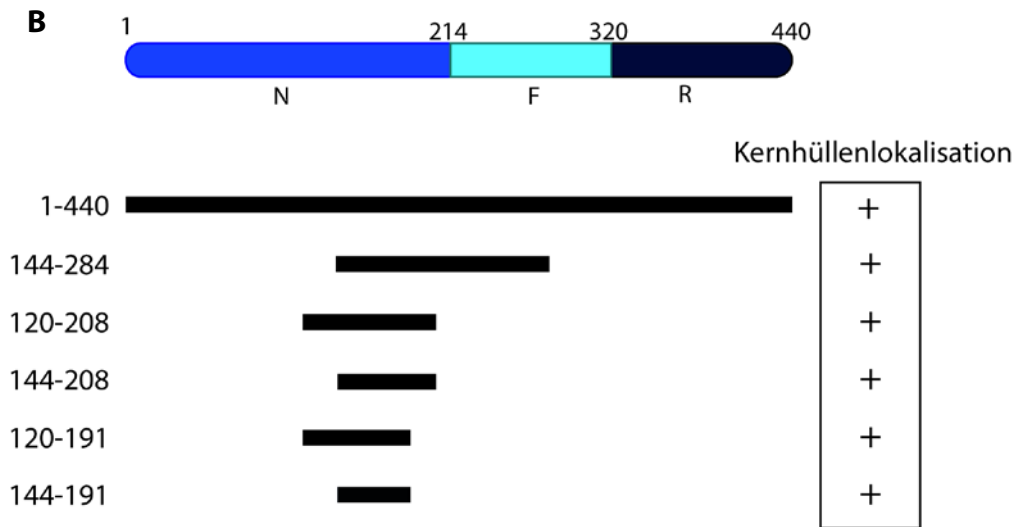


Abbildung 12: Ein minimales Bindungsfragment von 48 Aminosäuren sorgt für die Lokalisation von Nup50 an die Kernhülle

A) Weitere Verkürzungen von N-terminal eGFP fusioniertem Nup50 wurden generiert und in HeLa-Zellen transzifiziert. 36 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen entweder direkt fixiert (linke Spalte, - Tx100) oder nach einem kurzen Waschen mit 0,1 % Triton X-100 in PBS (rechte Spalte, + Tx100) und anschließend durch konfokale Mikroskopie analysiert. Die Aminosäurepositionen der verschiedenen Fragmente sind angegeben. Balken 10 μ m

(B) Die schematische Übersicht zeigt die in (A) verwendeten Nup50-Verkürzungen sowie die jeweilige Fragmentlänge mit Positionen der ersten und letzten Aminosäure und, ob sie an die Kernhülle lokalisieren. Im Verhältnis dazu werden die verschiedenen Regionen des Wildtyp-Nup50-Proteins (N, F, R siehe auch Abschnitt 1.6) dargestellt.

Zur Durchführung des Experiments siehe Abschnitt 3.2.

In der Abbildung 12 ist in den Aufnahmen der Proben ohne Triton-Behandlung nur teilweise eine Kernhüllenanfärbung erkennbar, wie beim Konstrukt 120-208. Die Proben zeigen ein unterschiedlich starkes zytoplasmatisches Signal. Im Gegensatz dazu weisen alle präextrahierten Zellen ein deutliches Kernhüllensignal auf.

Auch das kleinste getestete Fragment 144-191 kann an die Kernmembran lokalisieren. Dieses Fragment kann als kleinstes minimales Bindungsfragment angenommen werden. Da eine weitere Verkürzung die Wahrscheinlichkeit einer Proteinfehlfaltung erhöht und damit die Aussagekraft der Ergebnisse verringert, wurde darauf verzichtet, weitere Verkürzungen herzustellen. Außerdem wurden in vorherigen Experimenten die Fragmente 1-178 (siehe Abbildung 10) und 155-284 (siehe Abbildung 11) getestet und

eine fehlende Kernhüllenlokalisierung ist beobachtet worden (auch das Fragment 155-440 hat keine Kernhüllenlokalisierung mehr gezeigt. Diese Probe wird hier nicht dargestellt).

3.6 Die Sequenz des minimalen Bindungsfragmentes enthält konservierte Aminosäuren

Eine Analyse des minimalen Bindungsfragments ist notwendig, um die entscheidenden Aminosäuren für die Kernhüllenlokalisierung ausfindig zu machen. Deshalb wurde ein Alignment erstellt, dessen Ziel es ist, die in verschiedenen Spezies konservierten Aminosäuren zu finden, welche dann mit hoher Wahrscheinlichkeit essentiell für spezifische Proteinfunktionen sind. Verwendet wurden hierfür folgende Spezies: Zebrafisch, Krallenfrosch, Maus, Mensch, Rind, Ameise, Stechmücke und die Fruchtfliege.

Abbildung 13 stellt diesen Aminosäuresequenzabgleich dar. Aminosäuren, die sich über die Spezies erhalten haben oder nur durch eine Aminosäure mit gleichen Ladungseigenschaften ausgetauscht wurden, sind hier farbig unterlegt.

Anhand des Alignments wird deutlich, dass das minimale Bindungsfragment mehrere konservierte Aminosäuren enthält.

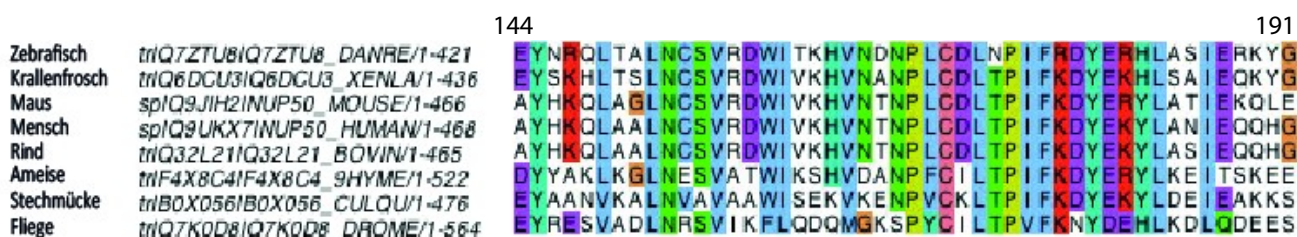


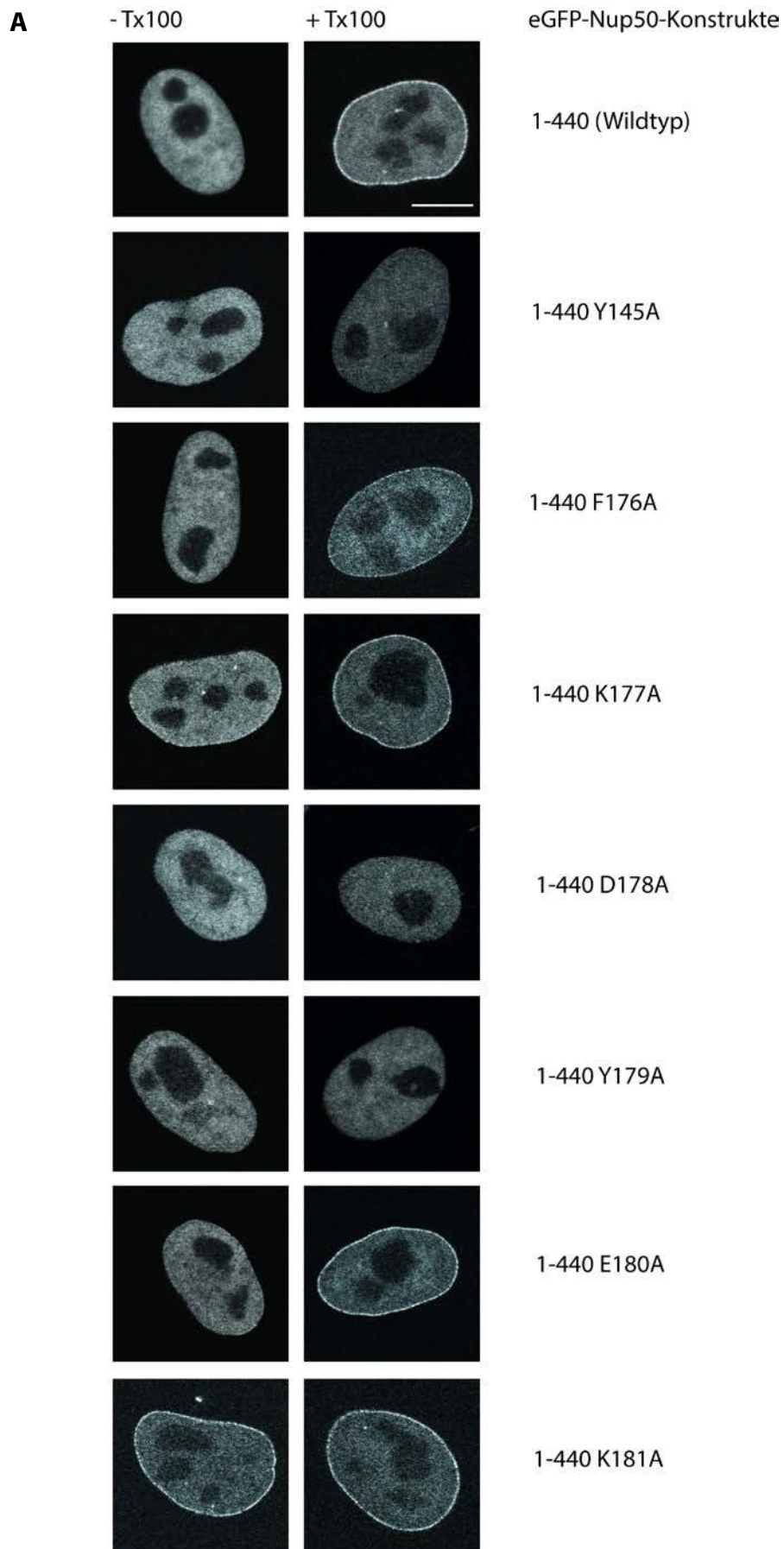
Abbildung 13: Das minimale Bindungsfragment 144-191 weist konservierte Aminosäuren auf

Ein Alignment des Nup50-Proteins wurde aus acht verschiedenen Spezies erstellt und die konservierten Aminosäuren farbig markiert: blau: unpolar/ hydrophop, grün: polar/ ungeladen, rot: polar/ positiv geladen, lila: polar/ negativ geladen, türkis: polar/ aromatisch; es folgen die Aminosäuren mit besonderen Eigenschaften: gelb: Prolin, orange: Glycin, rosa: Cystein.

3.7 Drei Aminosäuren innerhalb des minimalen Bindungsfragments sind relevant für die Kernhüllenlokalisierung von Nup50

Um herauszufinden, ob einzelne Punktmutationen ausreichen, um die Lokalisation von Nup50 an der Kernhülle zu blockieren, habe ich verschiedene Aminosäuren auf ihre Relevanz hin getestet. Hierzu wurden sieben Konstrukte kloniert und in HeLa-Zellen transfiziert. Diese Konstrukte kodieren das vollständige Nup50-Protein, in welchem je eine Aminosäure durch ein Alanin ausgetauscht worden ist. Unter den hochkonservierten Aminosäuren wurden jene ausgewählt, welche positiv oder negativ geladen sind (K177, D178, E180, K181) oder aromatische Seitenketten besitzen (Y145, F176, Y179). Die genannten Kriterien sind typisch für Aminosäuren, die essentiell für Interaktionen sind. In Abbildung 14 sind die Aufnahmen dieses Versuches aufgeführt. In den Aufnahmen direkt fixierter Zellen lässt sich nur ein schwaches Kernhüllensignal für die Probe K177A sowie ein stärkeres für die Probe E181A ausmachen. Die Transfektion der anderen Konstrukte führt zu einer homogenen nukleoplasmatischen Anfärbung. In keiner der Proben lässt sich ein zytoplasmatisches Nup50-Signal erkennen. Vergleicht man die mit Triton vorbehandelten HeLa-Zellen miteinander, wird ersichtlich, dass die Mutationen Y145A, D178A und Y179A die typische Kernhüllenanfärbung aufheben. Die Probe F176A zeigt ein deutlich schwächeres Kernhüllensignal. Im Gegensatz dazu weisen die Beispiele K177A, E180A und K181A eine dem Wildtyp ähnliche, deutliche Lokalisation an der Kernhülle auf.

Der Austausch der Aminosäuren an den Positionen 145, 178, 179 in ein Alanin führt also zu einer Inhibierung der Kernhüllenlokalisierung von Nup50. Wie spezifisch diese Positionen innerhalb des Proteins sind, zeigt sich anhand der angrenzenden Mutanten. 177 und 180 zeigen einen Wildtyp-ähnlichen Phänotyp und können eine Lokalisation des Proteins an der Kernmembran nicht verhindern. Bei benachbarten Aminosäuren der Position 145 handelt es sich nicht um konservierte Aminosäuren, weshalb auf eine Testung verzichtet wurde. Ob es sich bei dem schwächeren Signal der Probe 176 um eine noch vorhandene aber verminderte Lokalisation von Nup50 an die Kernhülle handelt, kann durch diese Versuche nicht beantwortet werden. Ebenfalls offen bleibt die Frage, welche Interaktionen diese drei Aminosäuren vermitteln beziehungsweise ob sie einen spezifischen Bindungspartner haben.



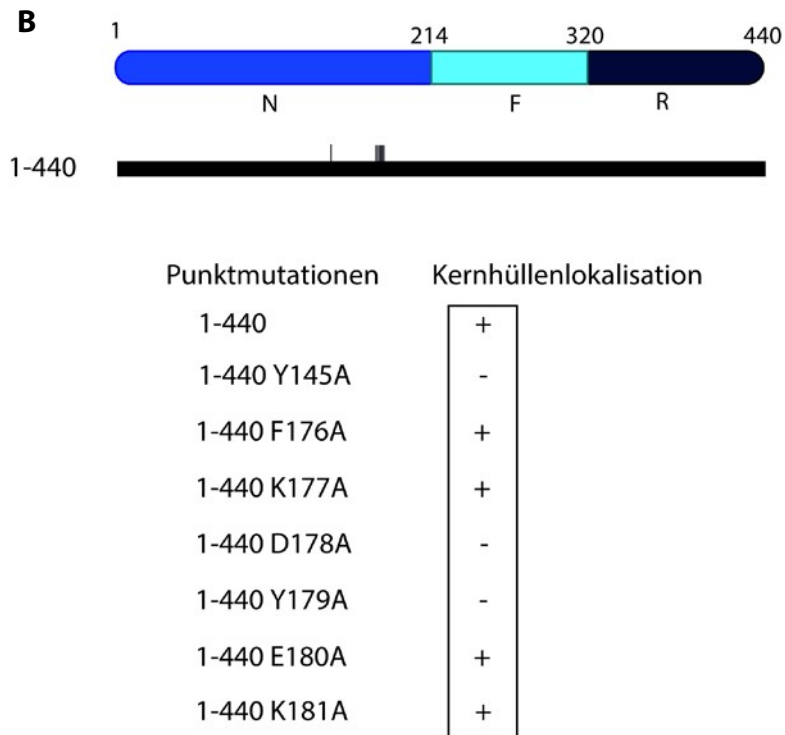


Abbildung 14: Innerhalb des minimalen Bindungsfragments gibt es drei Aminosäuren, deren Mutation die Lokalisation an die Kernmembran verhindern

A) Im vollständigen N-terminal eGFP fusionierten Nup50 wurden Punktmutationen einzelner Aminosäuren generiert und in HeLa-Zellen transzifiziert. 36 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen entweder direkt fixiert (linke Spalte, - Tx100) oder nach einem kurzen Waschen mit 0,1 % Triton X-100 in PBS (rechte Spalte, + Tx100) und anschließend durch konfokale Mikroskopie analysiert. Die Position der Punktmutation ist dargestellt, die Aminosäuren wurden immer durch ein Alanin ersetzt. Balken 10 μm

(B) Die schematische Übersicht zeigt die in (A) verwendeten Nup50-Punktmutationen und, ob eine Kernhüllenlokalisierung sichtbar war. Die verschiedenen Regionen des Wildtyp-Nup50-Proteins (N, F, R siehe auch Abschnitt 1.6) sind dargestellt.

3.8 Das minimale Bindungsfragment von Nup50 ist exprimierbar

Um das minimale Bindungsfragment und die Interaktion zu möglichen Bindungspartnern *in vitro* zu testen, habe ich das minimale Bindungsfragment mit und ohne Punktmutationen exprimiert und aufgereinigt.

Vorab wurde *Xenopus laevis* Nup50 als für die Expression in *E.coli* Codon-optimiertes Konstrukt in den pET28e-Vektor kloniert. Der pET28e-Vektor enthält sowohl sechs konsekutive Histidine am N-Terminus für die Aufreinigung als auch eine Glutathion-S-Transferase-Domäne (GST), welche für die Pulldown Assays benötigt wurde. Der Aufbau des Vektors ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt.

Um die optimalen Expressions- und Aufreinigungsbedingungen für dieses Fragment herauszufinden, habe ich eine Testexpression im kleineren Maßstab durchgeführt. Hierzu wurden die klonierten Konstrukte in *E. coli* BL21de3 transformiert und in einer Übernachtkultur wachsen gelassen. 18, 25, 30 und 37°C wurden als Temperaturen für die Expression getestet. Zur anschließenden Aufreinigung der rekombinanten Proteine wurden die Bakterien mittels Hochdruck aufgebrochen und die unlöslichen Bestandteile abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit Ni-NTA inkubiert. Nach einigen Waschschritten konnten die gebundenen Proteine eluiert werden. Von dem Pellet der aufgebrochenen Bakterien, von dem nicht an das Ni-NTA gebundenen Anteil und von dem Eluat wurden Proben genommen und mittels SDS-PAGE analysiert.

Das Ergebnis der Testexpression wird beispielhaft am Fragment 144-191 D178A in Abbildung 15 gezeigt. Abwechselnd sind das Eluat, das ungebundene Protein und das Pellet für die verschiedenen Temperaturen geladen worden. Das minimale Fragment ist also exprimierbar und die größte Proteinmenge kann bei 18°C erreicht werden. Die verwendete Menge von Ni-NTA scheint ausreichend zu sein.

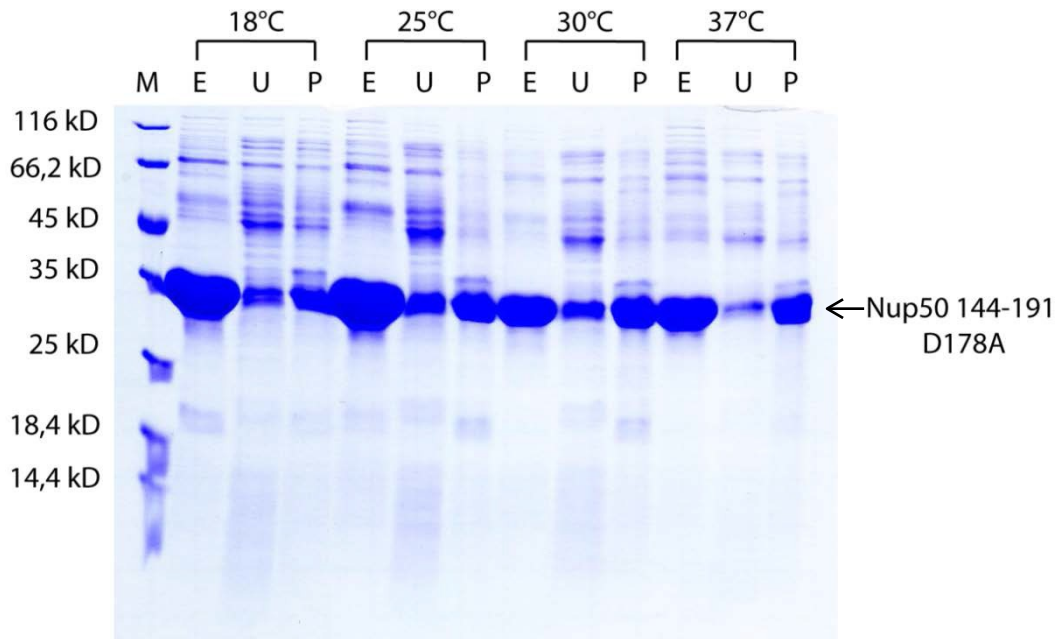
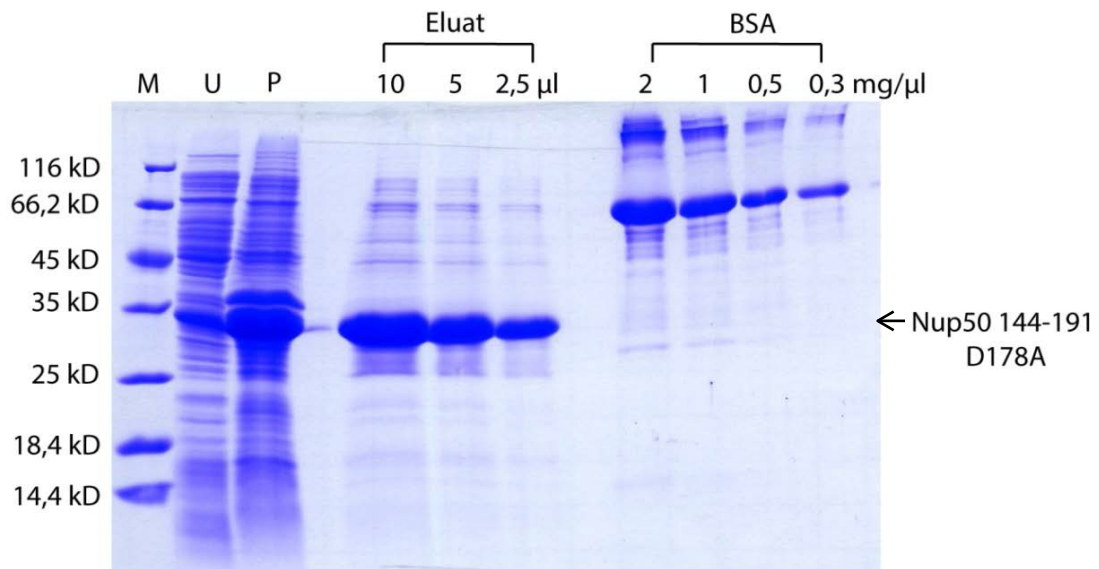


Abbildung 15: Testexpression und -aufreinigung von Fragment 144-191 D178A

Transformierte *E. coli* BL21de3 wurden über Nacht bei 18, 25, 30 und 37°C wachsen gelassen und mittels Hochdruck aufgebrochen. Die unlöslichen Bestandteile wurden abzentrifugiert, hier wurde eine Pelletprobe (P) entnommen. Der Überstand wurde mit Ni-NTA Agarose für zwei Stunden inkubiert. Die nicht an die Ni-Kügelchen anhaftenden Fragmente wurden als ungebundenes Protein (U) gesammelt. Nach dem Waschen wurde das gebundene Protein eluiert (E). Alle Proben wurden anschließend 2:1 mit SDS Proben-Puffer gemischt und 10 µl je Probe geladen. Ebenso wurden 8 µl niedermolekularer Marker (M) auf das 10% SDS-Gel geladen. Temperatur, Probenarten und die Beschriftung der Markerbanden sind angegeben.

Die optimierten Parameter der Testexpression wurden nun auf transformierte BL21de3 Bakterien im großen Maßstab angewendet. Alle Bakterien wurden nun über Nacht bei 18°C wachsen gelassen. Nach dem Aufbrechen der Bakterien durch die Emulsiflex, wurde der abzentrifugierte Überstand mit Ni-NTA-Agarose inkubiert. Abermals wurde nach einigen Waschsritten eluiert. Exemplarisch am Fragment 144-191 D178A sind die Expression und die Aufreinigung in Abbildung 16A dargestellt. Verschiedene Mengen des Eluats wurden geladen um im Anschluss die Proteinkonzentration anhand der BSA-Banden zu bestimmen. Ebenfalls sind das ungebundene Protein und das Pellet auf das SDS-Gel geladen worden. Vergleicht man dieses Ergebnis mit der Testexpression fällt diesmal eine stärkere Pellet-Bande auf.

A**B**

Fragment	Größe in kDa	Temperatur der Autoinduktion in °C	Volumen der Ni-NTA in ml	Konzentration in mg/ml
144-191	35	18	4	4
144-191 (Y145A)	35	18	4	5
144-191 (D177A)	35	18	4	2
144-191 (D178A)	35	18	4	2
144-191 (Y179A)	35	18	4	2
144-191 (E180A)	35	18	4	5

Abbildung 16: Expression und Aufreinigung im größeren Maßstab von Fragment 144-191 D178A

(A) Die Konstrukte wurden in *E. coli* BL21de3 transformiert und über Nacht bei 18°C wachsen gelassen. Die Bakterien sind anschließend via Emulsiflex aufgebrochen worden. Nach Zentrifugation wurde der Überstand für 2 Stunden mit Ni-NTA Agarose inkubiert. In Aufreinigungssäulen wurden die Ni-Kügelchen gewaschen und die Proteinfragmente eluiert. Proben wurden entnommen vom Pellet (P, 5 µl), vom Material, das nicht an die Ni-Agarose bindet (U, 5 µl) und vom Eluat (E, 10, 5 und 2,5 µl). Die Proben wurden mit SDS Proben-Puffer gemischt (Verhältnis 2:1) und auf ein 12% SDS-Gel geladen. Beim Marker (M) handelt es sich um 8 µl niedermolekularen Marker. Zur Abschätzung der Proteinkonzentration wurden noch 5 µl BSA unterschiedlicher Konzentration geladen.

(B) Expressions- und Aufreinigungsbedingungen aller verwendeten Konstrukte

3.9 Die Punktmutationen, welche eine Kernhüllenlokalisierung aufheben, inhibieren die Bindung zu Mel-28 und Nup153

Um zu untersuchen, ob einer der bekannten Interaktionspartner an das minimale Fragment bindet und ob die Mutation der drei oben genannten Aminosäuren (Position 145, 178, 179) die Bindung aufhebt, habe ich GST-Pulldown-Assays durchgeführt. Durch diese Methode können Protein-Protein-Interaktionen getestet werden. Dieses Experiment habe ich in Kooperation mit Ruchika Sachdev durchgeführt.

Die GST-gekoppelten Proteinfragmente wurden mit GSH-Sepharose inkubiert. Die danach noch vorhandenen unspezifischen Bindungsstellen wurden mittels Zugabe von BSA geblockt. Dem *Xenopus laevis* Hochgeschwindigkeits-Eiextrakt wurde ein Protease-Inhibitor hinzugefügt. Nach der Zentrifugation des Eiextrakt-Inhibitor-Gemischs, wurde der Überstand für zwei Stunden mit den GST-Nup50-Fragmenten gebundenen GST-Kügelchen inkubiert. Nach mehreren Waschschritten folgte dann die Elution der Proteinfragmente mittels TEV-Elution. Die TEV-Protease schneidet zwischen GST und dem Nup50-Fragment, so dass letzteres eluiert wird (für die TEV-Schnittstelle, siehe Vektorenübersicht Abbildung 6). Durch SDS-PAGE wurden die Proben aufgetrennt. Anschließend fand der Transfer der Proteine auf Membranen statt. Um die potentiellen Bindungspartner Mel-28, Nup153, Importin α und Importin β nachzuweisen, wurde ein Westernblot durchgeführt und der Blot mittels Chemilumineszenz analysiert.

In Abbildung 17 werden die Ergebnisse des GST-Pulldowns gezeigt. Für alle Proben wurde 2% des Starts geladen. Die Negativkontrolle zeigt keine Bindung von Nup153, Mel-28, Importin α oder β . Vergleicht man die Banden für das Protein Nup153, fällt die wesentlich schwächere Bande des minimalen Bindungsfragments 144-191 (siehe Abschnitt 3.5) neben der starken Bande im Eluat des vollständigen Proteins auf. Die beiden Mutationen K177A und E180A, welche im vollständigen Protein noch an die Kernhülle lokalisieren, zeigen auch in der Länge des minimalen Bindungsfragments noch eine klare Nup153-Bindung. Hierbei scheint das Signal von K177A etwas stärker zu sein. Im Gegensatz dazu wird durch die fehlende Bande der Mutationen Y145A, D178A und Y179A (Länge von 144-191) klar, dass diese die Lokalisation an die Kernhülle verhindernden Punktmutationen ebenfalls nicht mehr ans Nukleoporin 153 binden. Die Ergebnisse des Mel-28-Bindungsnachweises weisen ein ähnliches Muster

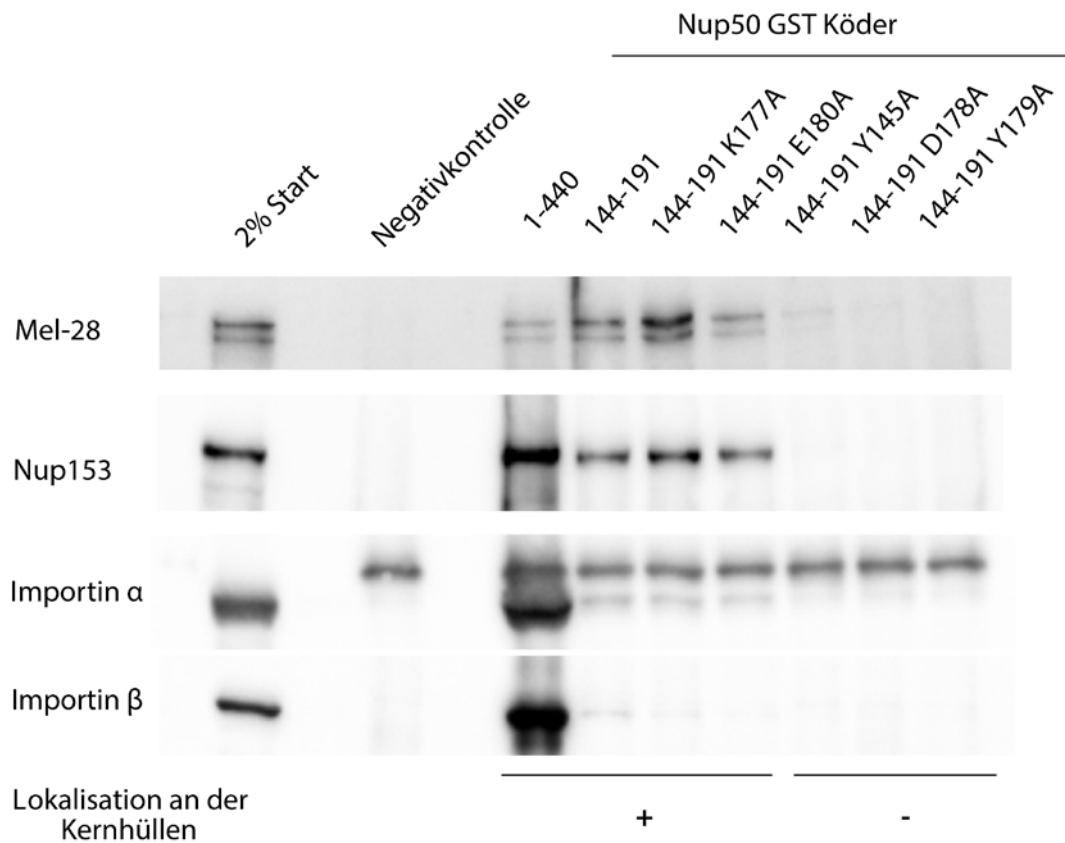


Abbildung 17: Das minimale Fragment bindet an Mel-28 und Nup153

In *E. coli* exprimierte und aufgereinigte GST gekoppelte Nup50 Proteinfragmente wurden mit GSH-gebundener Sepharose inkubiert. Diese Köder-Proteine wurden mit Hochgeschwindigkeits Froschei-Extrakt inkubiert und Proteine mittels Inkubation mit TEV-Protease eluiert. Eine Auftrennung fand durch SDS-PAGE statt. Anschließend wurden die Proteine via Westernblot analysiert. 2% des benutzen Eiextrakts wurden als Start geladen. Bei der Negativkontrolle handelt es sich um GST. Die Lokalisation an der Kernhülle bezieht sich auf Abschnitt 3.7.

auf. Hier zeigen das vollständige Protein, das minimale Bindungsfragment ohne Punktmutation und mit den Mutationen K177A, E180A die typischen Doppelbanden, wobei abermals die deutliche Bande von K177A 144-191 hervorsticht. Lässt sich bei der Punktmutante Y145A 144-191 noch eine Bande erahnen, ist bei den Punktmutanten D178A und Y179A der Länge 144-191 keinerlei Bande mehr sichtbar. Importin α und Importin β wurden bei diesem Experiment mitgetestet. Die negative Kontrolle von Importin α macht deutlich, dass die untere der beiden Banden

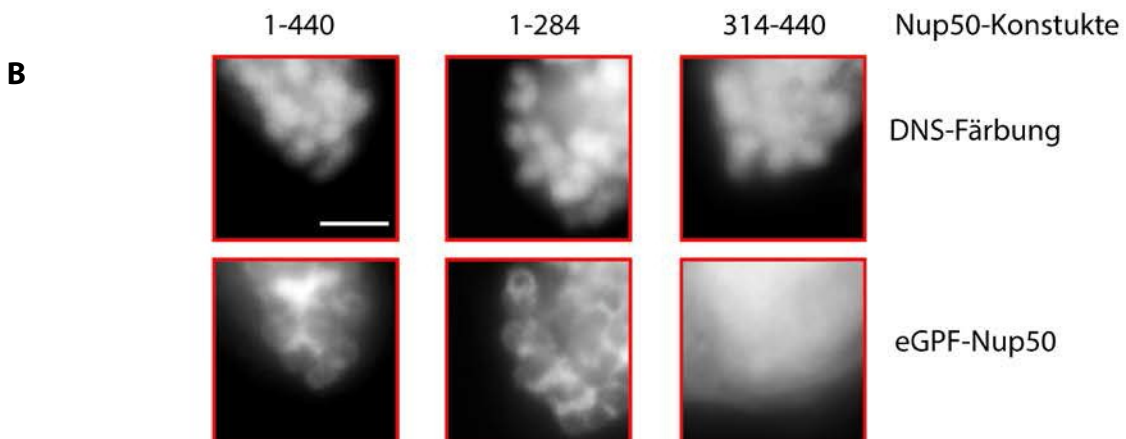
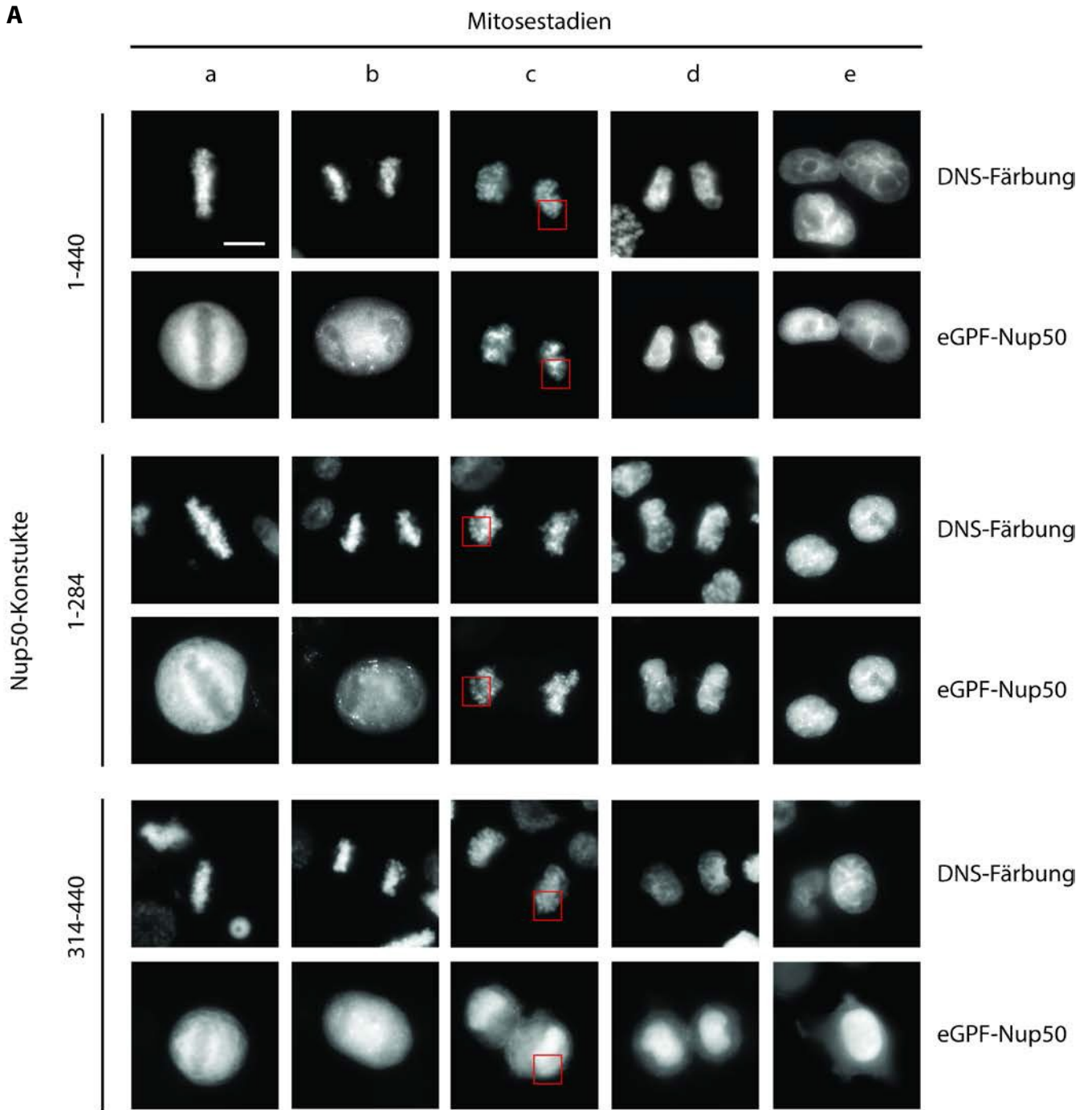
relevant ist. Im Verhältnis zur starken Bande des vollständigen Proteins, weist das minimale Bindungsfragment ohne Punktmutation sowie mit den beiden noch an die Kernhülle lokalisierenden Mutationen nur ein schwaches Signal auf. Die drei inhibierenden Punktmutationen zeigen keine Bindung zu Importin α . Außer dem vollständigen Protein und evtl. ganz leicht dem minimalen Fragment bindet keines der exprimierten Proteine an Importin β .

Das in Abschnitt 3.5 beschriebene minimale Fragment, welches Nup50 an die Kernmembran lokalisiert, bindet an Mel-28 und Nup153. Die inhibierenden Punktmutationen (Abschnitt 3.7) blockieren ebenfalls die Bindung zu den bekannten Bindungspartnern. Diese Tatsachen führen zur Annahme, dass eine fehlende Bindungsfähigkeit zu Mel-28 und Nup153 das Nup50-Protein nicht mehr an der Kernhülle lokalisieren lässt. Da Nup153 und Mel-28 ein sehr ähnliches Muster aufweisen, kann keines der beiden Proteine als alleiniger relevanter Bindungspartner ausgeschlossen oder bestätigt werden. Die Bindung von Importin α kann auch indirekt via Nup153 entstehen und hat daher keine weitere Aussagekraft. Die fehlende Importin β -Bindung war zu erwarten, da sich die Bindungsstelle in einem anderen Abschnitt des Proteins befindet.

3.10 Am Ende der Mitose ist die N-terminale Hälfte von Nup50 wichtig für die Chromatinbindung

Ungefähr 20% von Nup50 werden am Ende der Mitose früh an das Chromatin rekrutiert (Dultz et al., 2008). Bisher ist unklar, ob Nup50 direkt an das Chromatin binden kann oder ob es sich um eine indirekte Bindung handelt. Für letzteres wäre das ebenfalls früh rekrutierte Mel-28 ein möglicher Kandidat als verbindendes Protein. In Abschnitt 3.2 wurde gezeigt, dass Nup50 trotz fehlender funktionstüchtiger Importin α -Bindungsstelle an der Kernhülle lokalisiert ist. Eine mögliche Erklärung wäre, dass eine intakte Chromatinbindung am Ende der Mitose entscheidend für dessen letztendliche Position am Kernporenkomplex ist. Um herauszufinden, ob sich die Chromatinbindung am Ende der Mitose inhibieren lässt und welcher Teil von Nup50 von Relevanz sein könnte, habe ich die eGFP Nup50-Konstrukte in HeLa-Zellen transfiziert. Um einen Überblick zu gewinnen, habe ich das Wildtypprotein, ein N-terminales Fragment (1-284) und C-terminales Fragment (314-440) verwendet. Mindestens vier Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mittels Zugabe von Thymidin in der S-Phase arretiert. Am darauffolgenden Tag ist der Block aufgehoben worden. Hierzu wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in frisches Medium gesetzt. Nach drei Stunden habe ich die Zellen wiederum arretiert, diesmal jedoch in der Prometaphase mittels Nocodazol für 12 Stunden. Am dritten Tag sind die gesammelten Zellen abzentrifugiert und mit frischem Medium resuspendiert worden. Anschließend wurden sie auf Deckgläschen ausplattiert und zurück in den Brutschrank gestellt. Um die verschiedenen Mitosestadien zu analysieren habe ich die Zellen nach 30, 60, 120 und 180 Minuten fixiert und das Chromatin mittels DAPI angefärbt. Die Proben wurden am Weitfeld-Mikroskop fotografiert. Hierbei muss erwähnt werden, dass zu allen Fixierungszeitpunkten abgesehen von 30 Minuten verschiedene Mitosestadien beobachtet wurden und lediglich zu späteren Zeitpunkten die Prozentzahl der Zellen erhöht war, die sich schon in späteren Stadien befanden.

Abbildung 18A stellt das Chromatin und das Nup50 Signal der drei verwendeten Konstrukte nach Mitosestadien sortiert dar. Die Einordnung von Metaphase (a) bis hin zur Interphase (e) fand anhand des DAPI-Signals statt. In der Metaphase ist die typische äquatoriale Anordnung der Chromosomen sichtbar (a). Bei allen drei Konstrukten ist



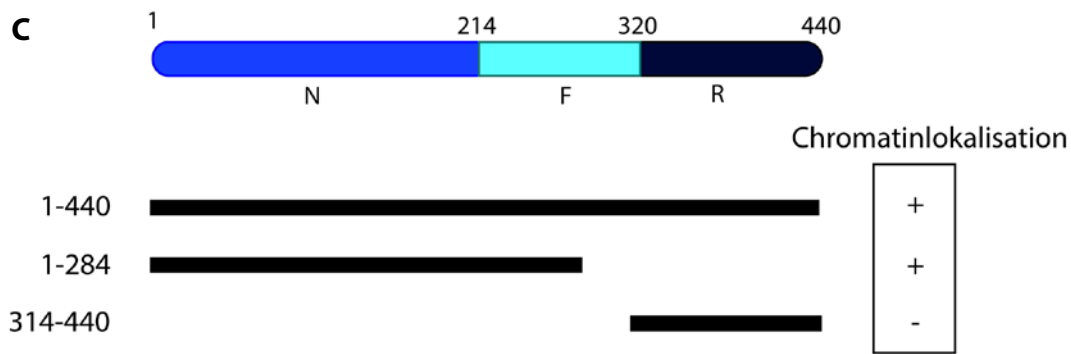


Abbildung 18: Die N-terminale Hälfte ist wichtig für die Chromatinbindung am Ende der Mitose

(A) N-terminal fusioniertes eGFP Nup50-Protein sowie Verkürzungen dessen wurden in HeLa-Zellen transzipiert. Sechs Stunden nach der Transfektion fand erst eine Arretierung mit 2 mM Thymidin und später mit 0,33 μ M Nocodazol statt. Diese Arretierungen wurden durch frisches DMEM full-Medium aufgehoben und anschließend die Proben nach 30, 90, 120 und 240 Minuten fixiert. Das Chromatin wurde mittels DAPI angefärbt und die Proben am Weitfeld-Mikroskop analysiert. a-e stellen die verschiedenen Stadien des Mitoseausgangs dar. a: Metaphase bis e: Interphase. Die Aminosäurepositionen der jeweiligen Fragmente sind angegeben. Die roten Rahmen markieren die Bildausschnitte, die in (B) vergrößert dargestellt sind. Balken 10 μ m

(B) Vergrößerung der rot markierten Bildausschnitte des Stadiums c (A). Balken 2 μ m

(C) Die in A verwendeten Fragmentlängen (erste und letzte Aminosäureposition sind angegeben) werden schematisch dargestellt und im Verhältnis dazu die verschiedenen Regionen des Wildtyp-Nup50-Proteins (N, F, R siehe auch Abschnitt 1.6). Des Weiteren wird aufgezeigt, ob die Konstrukte im Stadium c (siehe A) eine klare Lokalisation am Chromatin aufweisen.

das Nup50-Protein diffus in der Zelle verteilt. Das Chromatin bleibt vom Nup50-Signal ausgespart, wobei ein heller Saum im eGFP-Kanal auszumachen ist. Die Aufnahmen der Spalte b stellen die frühe Anaphase dar. Im DAPI-Kanal sind die kondensierten Chromatiden zu sehen, welche grade getrennt werden. Im eGFP-Kanal weist das Nup50-Signal Ähnlichkeiten zur vorherigen Phase auf, wobei in manchen Proben bereits eine erste Lokalisierung um das Chromatin sichtbar wird. Vergleicht man hingegen die Zellen in der späten Anaphase (c), fallen Unterschiede zwischen den Konstrukten auf.

Um die Unterschiede besser beurteilen zu können, sind die rotmarkierten Ausschnitte in Abbildung 18B im größeren Maßstab dargestellt. In den Aufnahmen der Konstrukte 1-

440 und 1-284 sieht man ein klares Nup50-Signal, welches sich um die einzelnen Chromosomen anordnet. Im Vergleich dazu zeigt 314-440 eine diffuse Anfärbung der ganzen Zelle mit einem verstärkten Signal am Chromatin. Hierbei muss darauf hingewiesen werden, dass das Konstrukt 314-440 im Vergleich zu den anderen beiden Chromatinfärbungen eine schwächere Kondensation und glattere Kanten aufweist und somit in einem etwas späteren Stadium zu sein scheint.

In der Telophase 18A (d) ähnelt das Nup50-Signalmuster in den ersten beiden Konstrukten dem Chromatinsignal. Das C-terminale Proteinfragment zeigt weiterhin eine schwächere diffuse Zytoplasmaanfärbung zusätzlich zum starken Chromatinsignal. Ein ähnliches Bild bleibt auch in der Interphase (e) erhalten.

Anhand dieses Assays lässt sich die Lokalisation von Nup50 in diversen Stadien im Ausgang der Mitose beobachten. Hierbei scheint vor allem die späte Anaphase (c) interessant für den Vergleich zwischen den Konstrukten zu sein. In diesem Experiment wird deutlich, dass die N-terminale Hälfte des Proteins relevant ist für dessen Lokalisation an die Chromatinoberfläche. Denn diese Hälfte zeigt im Gegensatz zum C-terminalen Fragment einen dem Wildtyp ähnelnden Phänotyp. Die Einteilung der Mitosestadien anhand des Chromatinmusters ist ungenau, auch weil nur ein sehr geringer Anteil der Zellen in Stadium c fotografiert werden kann. Somit bleibt die Aussagekraft dieses Assays eingeschränkt.

3.11 Im Stadium c der Mitose ist die Kernhülle noch nicht geschlossen

Bisher wurde davon ausgegangen, dass im Stadium c (siehe Abbildung 18) ein Rekrutieren von Nup50 an das Chromatin stattfindet und nicht bereits der Import des Proteins beobachtet wird. Letzteres würde zu einer anderen Interpretation des Experiments führen. Um den aktiven Import auszuschließen, muss getestet werden, ob zu diesem Zeitpunkt bereits eine geschlossene Kernhülle und funktionsfähige Kernporenkomplexe vorhanden sind. Zu diesem Zweck wurden die nukleären Kernporen mittels Immunfluoreszenz visualisiert. eGFP-gekoppeltes Nup50 Wildtyp Protein wurde in HeLa-Zellen transfiziert und 36 Stunden später fixiert. Anschließend habe ich das Chromatin mit RedDot2 angefärbt und zur Markierung des Kernporenkomplexes eine Immunfluoreszenz mit mAB414 als primärem Antikörper

durchgeführt. Das Stadium c ist in allen drei Kanälen am konfokalen Mikroskop einschichtig aufgenommen worden.

Das eGFP-Signal in Abbildung 19 weist das typische Chromosomen-umhüllende Signal von Nup50 auf. Ein schwaches Nup50-Signal ist im Zytoplasma wahrzunehmen. Die DAPI-Färbung stellt zwei sich teilende Zellen mit hochkondensiertem Chromatin dar. Beim dritten Kanal handelt es sich um das Immunfluoreszenz-Signal des Kernporenkomplexes. Offensichtlich ist bereits ein für NPCs typisches punktiertes Muster um die Chromatineinheit als ganze auszumachen, allerdings ist diese noch relativ schwach und lückenhaft (Vergleich zu interphasischen Zellen ist hier nicht dargestellt). Es lässt sich ein diffuses Signal der Umgebung beobachten.

Die lückenhafte Anordnung der Kernporenkomplexe lässt auf eine unvollständige Kernhülle und einen für das Experiment irrelevanten Teil an aktivem Import schließen. Im Folgenden wird das Stadium c weiterhin für Studien zur Chromatinlokalisierung verwendet.

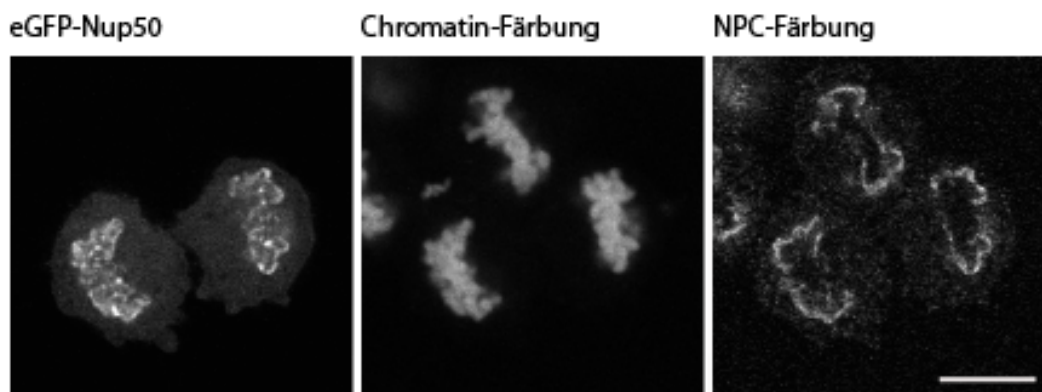


Abbildung 19: In der späten Anaphase sind die Kernporen noch nicht vollständig

eGFP-Nup50 transzierte HeLa-Zellen wurden nach 36 Stunden mit PFA fixiert. Das Chromatin wurde mittels RedDot2 angefärbt. Um Kernporenkomplexe (NPC) sichtbar zu machen, wurde eine Immunfluoreszenz durchgeführt. Der verwendete primäre Antikörper ist mAB414. Im Anschluss wurden die Proben durch konfokale Mikroskopie analysiert.

Balken 10 μm

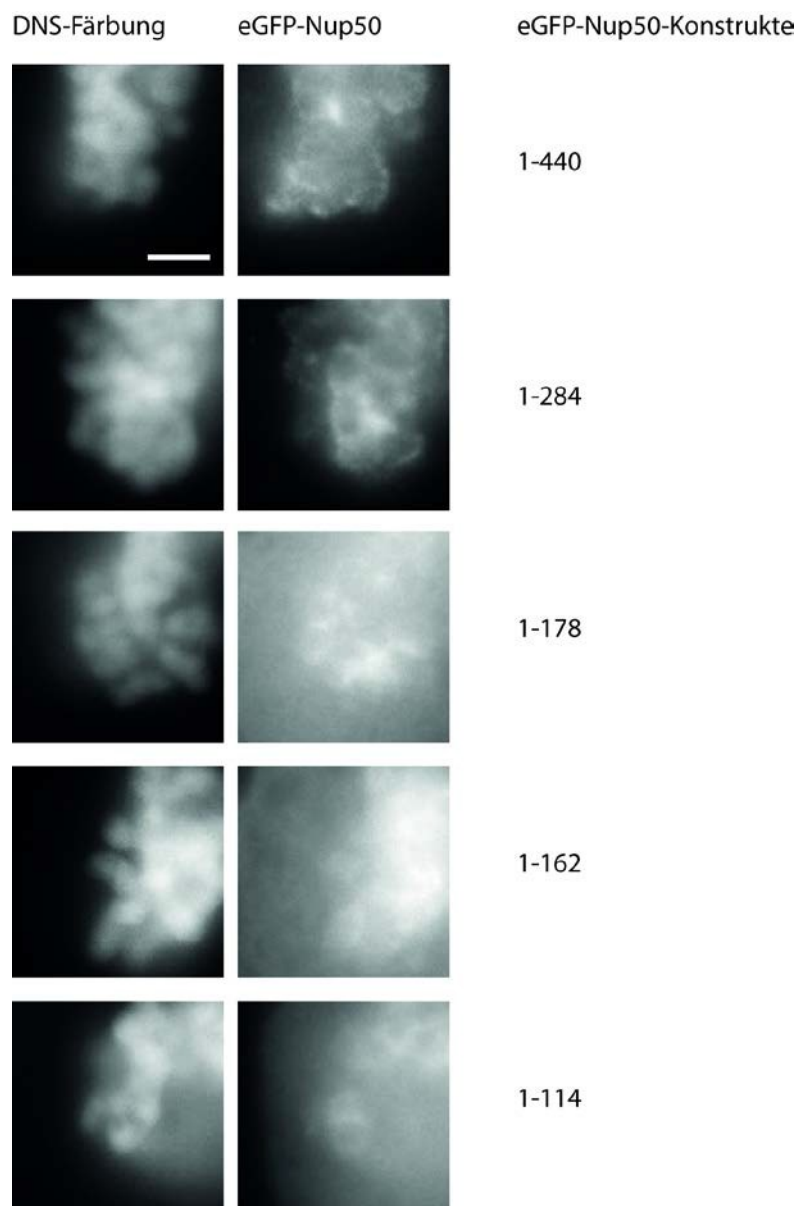
3.12 Die R- und die F-Domäne sind nicht relevant für die Nup50 Lokalisierung am Chromatin in der späten Anaphase

Da die N-terminale Hälfte von Nup50 entscheidend für dessen Chromatinlokalisierung ist, stellte sich die Frage, ob weitere C-terminale Verkürzungen diese Lokalisierung aufheben. Zur Untersuchung dieser Fragestellung habe ich dem Wildtyp und dem bereits verwendeten Fragment 1-284 drei kürzere N-terminale Fragmente gegenübergestellt. So wurden die transfizierten HeLa-Zellen auf die gleiche Weise synchronisiert wie in Abschnitt 3.10 beschrieben. Allerdings habe ich die ausplattierten Zellen nach 90, 120 und 150 Minuten fixiert, um den Prozentsatz der in Stadium c (siehe Abbildung 18A) befindlichen Zellen zu erhöhen. Nach der DAPI-Färbung wurden die Zellen, die durch das Chromatinmuster der späten Anaphase zuzuordnen sind, am Weitfeld-Mikroskop analysiert.

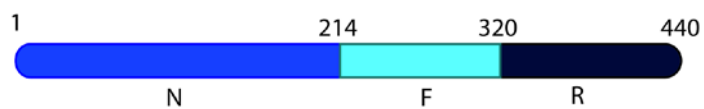
In Abbildung 20A werden die DAPI- und eGFP-Aufnahmen visualisiert. Im DAPI-Kanal sind vergleichbare Chromatinformen zu sehen, die alle dem Stadium c zuzuordnen sind, wohingegen im eGFP-Kanal nur bei den Konstrukten 1-400 und 1-284 ein scharfes „Chromosomen-ummantelndes“ Nup50-Signal aufgenommen wurde. Die Konstrukte 1-178, 1-162 und 1-114 weisen ein stärkeres Nup50-Signal im Zytoplasma auf, welches durch die mehrschichtige Aufnahme am Weitfeld-Mikroskop das Signal am Chromatin zum Teil überlagert. Wobei in allen drei Proben die typischen Ringe zu erkennen sind, die für eine Anordnung des Proteins um die Chromosomen spricht. Hierbei muss erwähnt werden, dass vom Konstrukt 1-114 Zellen aufgenommen wurden, die eine Aussparung des Nup50-Signals im Bereich des Chromatins aufweisen (hier nicht dargestellt). Ob es sich dabei um eine zu frühe Aufnahme handelt kann mit dieser Methode nicht geklärt werden.

Trotz Fehlen der R- und der F-Domäne (siehe Abbildung 20B) lokalisiert Nup50 augenscheinlich noch an das Chromatin am Ende der Mitose. Also ist anzunehmen, dass Ran und Importin β keine Rolle für diese Lokalisation spielen. Das zytoplasmatische Signal der Proben 1-114, 1-162 und 1-178 könnte bedeuten, dass die Rekrutierung von Nup50 noch vorhanden, aber abgeschwächt ist.

A



B



Chromatinlokalisierung

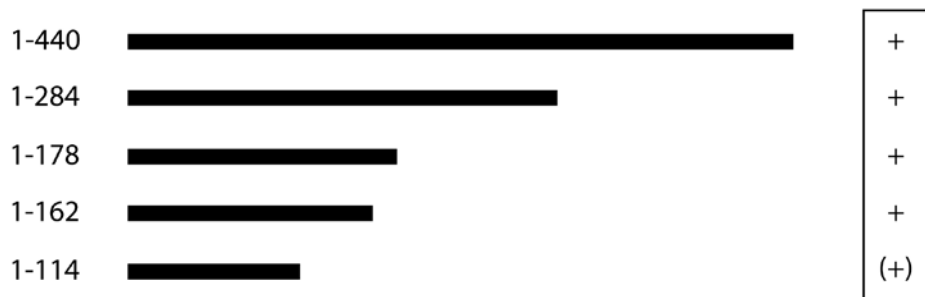


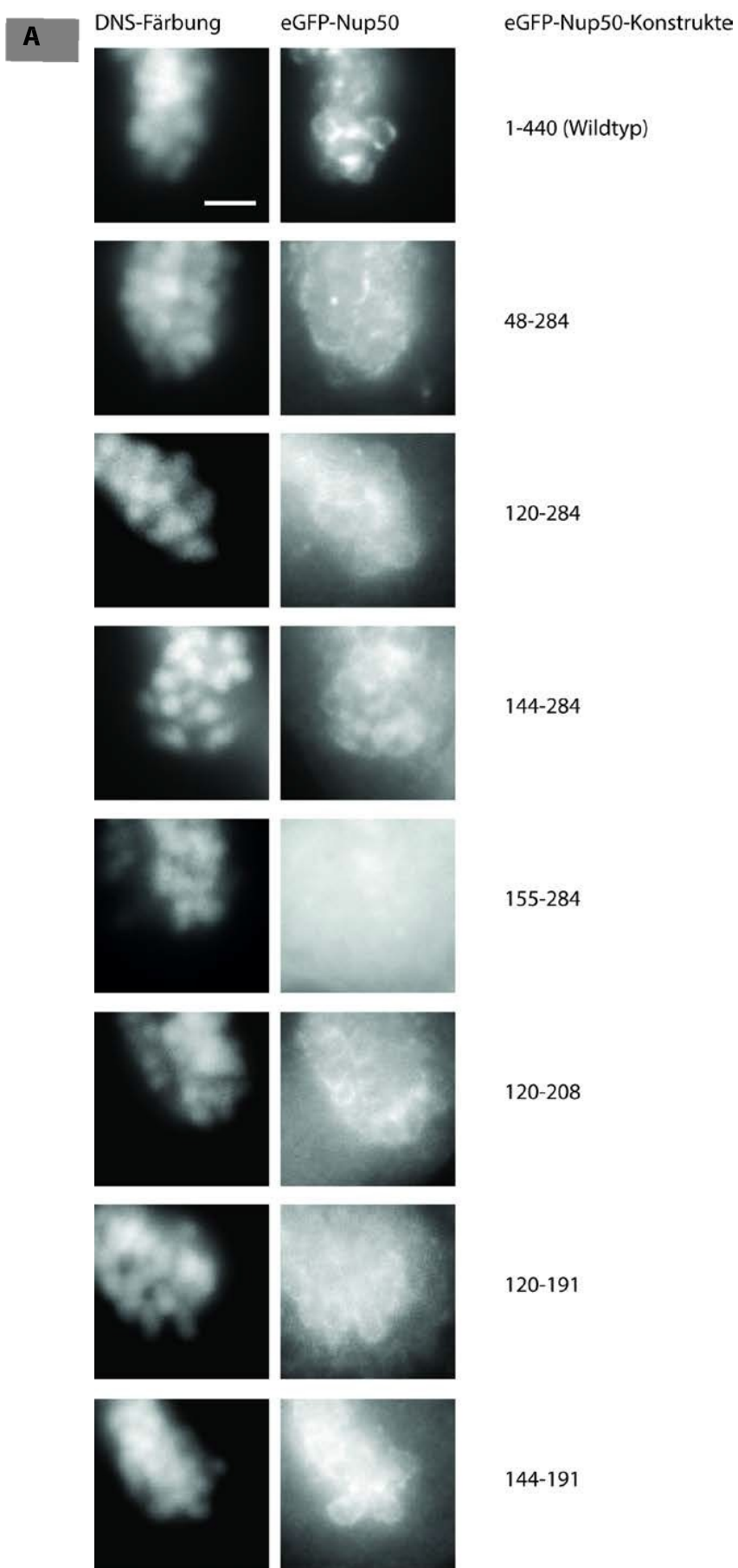
Abbildung 20: Die N-terminale Hälfte ist wichtig für die Chromatinlokalisierung am Ende der Mitose

(A) Verkürzungen des N-terminal eGFP fusionierten Nup50-Proteins wurden generiert und in HeLa-Zellen transzitiert. Sechs Stunden nach der Transfektion fand erst eine Arretierung mit 2 mM Thymidin und später mit 0,33 μ M Nocodazol statt. Diese Arretierungen wurden durch frisches DMEM full-Medium aufgehoben und anschließend die Proben nach 90, 120 und 150 Minuten fixiert. Das Chromatin wurde mittels DAPI angefärbt und das Stadium c (siehe Abbildung 18) am Weitfeld-Mikroskop analysiert. Die Positionen der ersten und letzten Aminosäure sind angegeben. Trotz Zytoplasmafärbung werden die Konstrukte als Chromatin-lokalisierend gewertet, wenn Konturen des Chromatins anhand des eGFP-Signals nachzuvollziehen sind. Balken 2 μ m

(B) Die schematische Übersicht zeigt die in (A) verwendeten Nup50-Verkürzungen sowie die jeweilige Fragmentlänge mit Positionen der ersten und letzten Aminosäure und ob sie an das Chromatin lokalisieren. Im Verhältnis dazu werden die verschiedenen Regionen des Wildtyp-Nup50-Proteins (N, F, R siehe auch Abschnitt 1.6) dargestellt.

3.13 Das minimale Bindungsfragment lokalisiert auch an Chromatin am Ende der Mitose

Interessant wäre nun zu wissen, ob sich ein minimales an das Chromatin lokalisierendes Fragment finden lässt. Ebenso ist noch unklar, ob das 48 Aminosäuren lange Fragment (siehe Abschnitt 3.5), welches noch an die Kernmembran interphasischer HeLa-Zellen lokalisiert, auch an das Chromatin am Ende der Mitose rekrutiert wird. Deshalb habe ich N-terminale eGFP-gekoppelte Verkürzungen in HeLa-Zellen transzitiert, die als C-Terminus die Aminosäure der Position 284 hatten. Dieser C-Terminus wurde gewählt, weil es sich um die kleinste C-terminale Verkürzung handelt, die keinerlei zytoplasmatische Anfärbung aufweist (siehe Abbildung 20A) und um so eine bessere Beurteilbarkeit zu erreichen. Außerdem wurde das Protein auch C-terminal weiter verkürzt, nachdem eine N-terminale Verkürzung gefunden worden ist, die eine Chromatinlokalisierung aufgehoben hat. Schlussendlich ist das minimale Bindungsfragment (siehe Abschnitt 3.5) getestet worden. Die Methode der Synchronisierung entspricht dem Abschnitt 3.10. In diesem Experiment wurden die



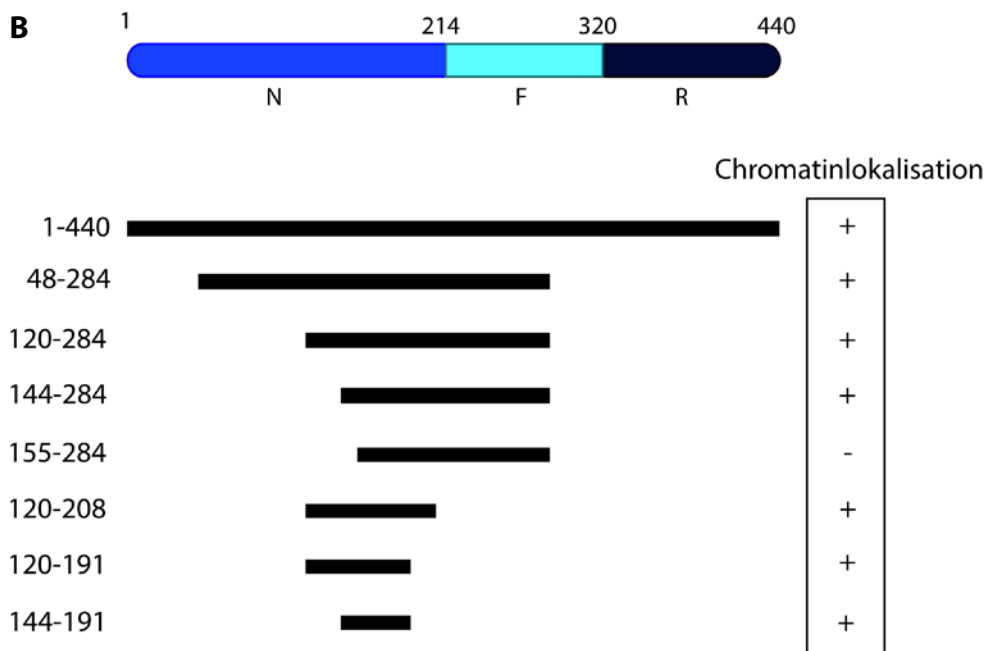


Abbildung 21: Das Minimalfragment von 48 Aminosäuren lokalisiert das Nup50-Protein auch an das Chromatin

(A) Verkürzungen des N-terminal eGFP Nup50-Proteins wurden generiert und in HeLa-Zellen transzitiert. Sechs Stunden nach der Transfektion fand erst eine Arretierung mit 2 mM Thymidin und später mit 0,33 μ M Nocodazol statt. Diese Arretierungen wurden durch frisches DMEM full-Medium aufgehoben und anschließend die Proben nach 90, 120 und 150 Minuten fixiert. Das Chromatin wurde mittels DAPI angefärbt und das Stadium c (siehe Abbildung 18) am Weitfeld-Mikroskop analysiert. Die Positionen der ersten und letzten Aminosäure sind angegeben. Trotz Zytoplasmafärbung werden die Konstrukte als Chromatin-lokalisierend gewertet, wenn Konturen des Chromatins anhand des eGFP-Signals nachzuvollziehen sind.

Balken 2 μ m

(B) Die schematische Übersicht zeigt die in (A) verwendeten Nup50-Verkürzungen sowie die jeweilige Fragmentlänge mit Positionen der ersten und letzten Aminosäure und ob sie an das Chromatin lokalisieren. Im Verhältnis dazu werden die verschiedenen Regionen des Wildtyp-Nup50-Proteins (N, F, R siehe auch Abschnitt 1.6) dargestellt.

Zellen nach 90, 120 und 150 Minuten fixiert und mit DAPI angefärbt. Aufgenommen wurden die HeLa-Zellen mittels Weitfeld-Mikroskop.

In der linken Spalte der Abbildung 21 ist die Chromatinfärbung aufgeführt, wobei die Zellen abgelichtet worden sind, die sich im Stadium c (siehe Abbildung 18A) der Zellteilung befinden. Im eGFP-Kanal zeigen alle Proben außer 155-284 eine deutliche „Chromosenummantelung“. Des Weiteren weisen alle Zellen außer dem

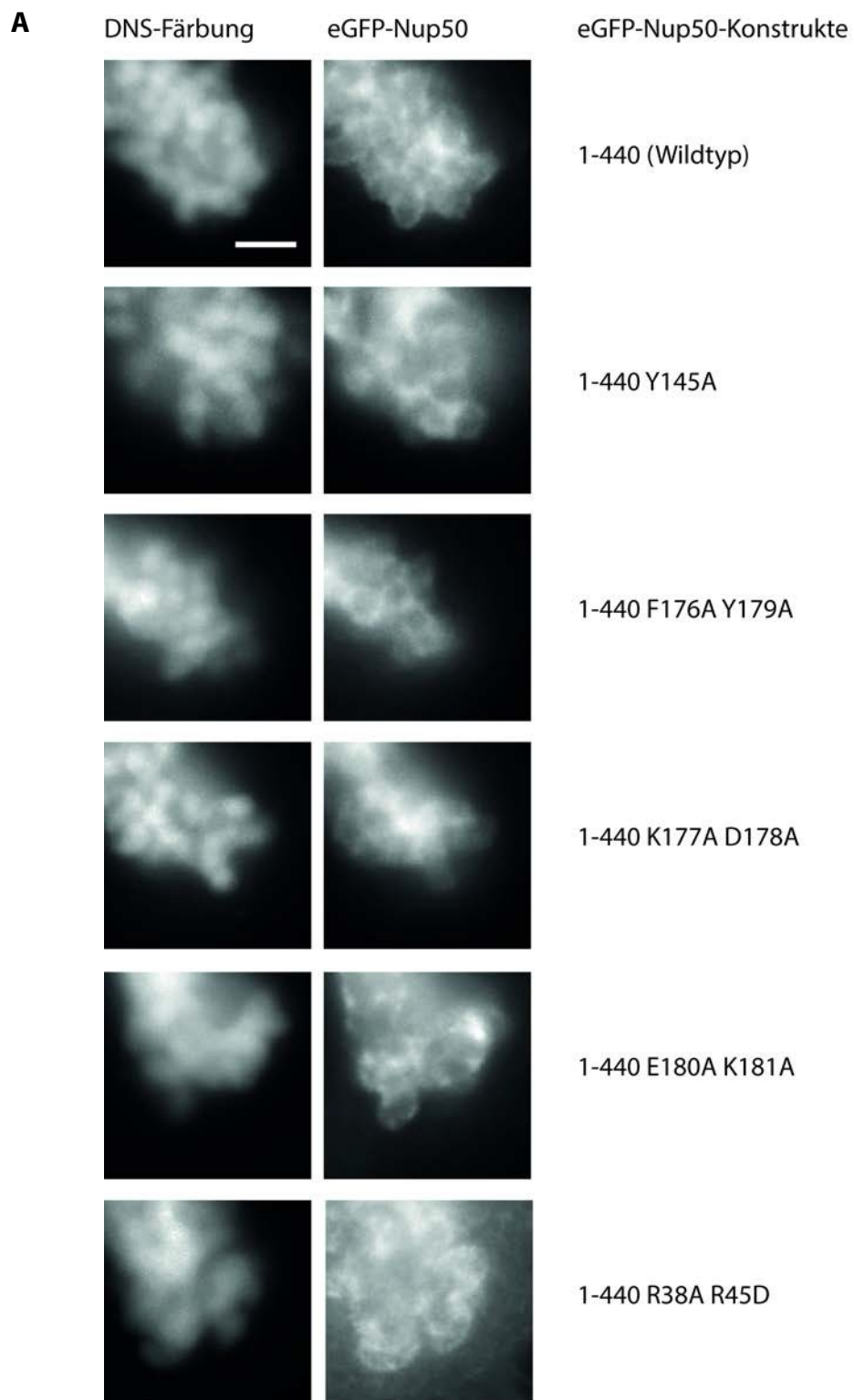
Wildtypprotein 1-440 ein zytoplasmatisches Nup50-Signal auf. 155-284 sticht durch sein starkes und relativ gleichmäßiges Nup50-Signal der gesamten Zelle hervor. Es kann keine verstärkte Nup50-Lokalisation am Chromatin in der späten Anaphase beobachtet werden. Auch bei diesem Konstrukt wurden einzelne Zellen aufgenommen, bei denen eine komplette Aussparung des Nup50-Signals im Bereich des Chromatins sichtbar ist (hier nicht dargestellt).

Die Importin α -Bindungsstellen sind ab dem Fragment 48-284 nicht mehr vorhanden. Dies führt zur Annahme, dass eine Nup50 Lokalisierung an das Chromatin nicht allein Importin α -vermittelt sein kann, da es trotz zytoplasmatischer Anfärbung immer noch zu einer klaren Lokalisation von Nup50 am Chromatin kommt. Die Tatsache, dass das minimale Bindungsfragment, welches noch an die Kernhülle lokalisiert, ebenfalls an das Chromatin am Ende der Mitose lokalisiert, lässt vermuten, dass es sich um einen verwandten Mechanismus handeln könnte.

3.14 Die Punktmutationen, die eine Kernhüllenlokalisierung inhibieren, blockieren die Chromatinlokalisierung von Nup50 nicht

Die gleiche Region des Nup50 Proteins, die für die Lokalisation an die Kernhülle interphasischer Zellen relevant ist, lokalisiert an das Chromatin der späten Anaphase. Daher bietet es sich an, die Punktmutationen in mitotischen Zellen zu testen, die eine Kernhüllenlokalisierung verhindern. So lässt sich herausfinden, ob es die gleichen Aminosäuren sind, die auch für die Nup50-Lokalisation entscheidend sind. Angefangen hatte ich mit der Analyse der einzelnen Aminosäuren, die das Kernhüllensignal aufheben und deren benachbarten Aminosäuren (hier nur zum Teil dargestellt). Da in diesem Experiment alle Proben ein wildtypähnliches Nup50-Signal aufwiesen, bin ich zur Analyse von Doppelmutanten übergegangen, um eine womöglich stärkere Inhibition zu generieren. Außerdem habe ich die stärkere der beiden Importin α Doppelmutationen R38A R45D getestet, um eine Aussage über eine spezifische Importin α Blockierung treffen zu können.

Außer der Probe R38A R45D, welche im Dekondensationsprozess weiter fortgeschritten scheint, zeigt die DAPI-Färbung in Abbildung 22 ein mitotisches Chromatin der Phase c (siehe Abbildung 18A). Die drei Bilder Y145A, F176A Y179



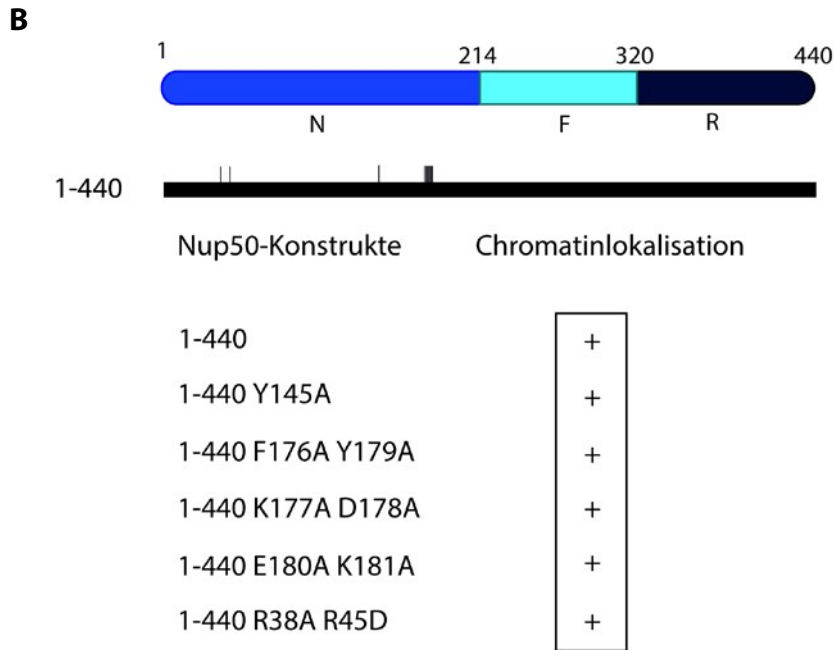


Abbildung 22: Keine der Punktmutationen, welche die Nup50-Bindung an die Kernhülle verhindern, blockiert die Lokalisation an Chromatin am Ende der Mitose

(A) Punktmutationen wurden in N-terminal fusioniertem eGFP-Nup50-Protein generiert und in HeLa-Zellen transzitiert. Sechs Stunden nach der Transfektion fand erst eine Arretierung mit 2 mM Thymidin und später mit 0,33 μ M Nocodazol statt. Diese Arretierungen wurden durch frisches DMEM full-Medium aufgehoben und anschließend die Proben nach 90, 120 und 150 Minuten fixiert. Das Chromatin wurde mittels DAPI angefärbt und das Stadium c (siehe Abbildung 18A) am Weitfeld-Mikroskop analysiert. Die Positionen der Punktmutationen sind angegeben. Die ersten vier Mutationen sind im Bereich des minimalen Bindungsfragments.

Die letzte Punktmutation schwächt die Bindung zu Importin α ab. Balken 2 μ m

(B) Die in (A) verwendeten Punktmutationen (Aminosäurepositionen sind angegeben) werden in einer Übersicht dargestellt. Des Weiteren wird aufgezeigt, ob die Konstrukte im Stadium c eine klare Lokalisation am Chromatin aufweisen.

und K177A D178A der eGFP-Aufnahmen enthalten je eine Punktmutation, welche die Kernhüllenlokalisierung aufgehoben hat. Man kann in diesen Bildern sowie in der Probe E180A K181A, welche keine inhibierende Punktmutation beinhaltet, ein ähnliches Nup50-Signal beobachten. Sie alle weisen mit dem Wildtyp vergleichbare Chromosomen-umgebende Signale auf.

Die Importin α -Bindungsstellen Mutante hat diese Signale zwar auch, jedoch ist eine diffuse zytoplasmatische Anfärbung erkennbar.

Keine der Aminosäuremutationen, die eine Kernhüllenlokalisierung unterbinden, verhindert die Lokalisation am Chromatin in der späten Anaphase. Es könnte sein, dass die Importin α -Bindungsmutante die Lokalisation von Nup50 am Chromatin reduziert. Jedoch scheint diese Probe in einem etwas späteren Stadium der Mitose zu sein, weshalb die Vergleichbarkeit eingeschränkt ist.

4. Diskussion

Der genaue Aufbau von Kernporenkomplexen ist noch nicht verstanden. Es ist immer noch Thema aktueller Forschung, welche Nukleoporene miteinander interagieren und welche Bedeutung die einzelnen Bausteine für diesen Proteinkomplex haben. Bei dem postmitotischen Wiederaufbau von Kernporen ist über die Ereignisse, die der initialen Rekrutierung von Mel-28 und Nup107-160 an das Chromatin folgen, relativ wenig bekannt. Dem nukleoplasmatischen Nukleoporin Nup50 wurde bisher keine große Bedeutung im postmitotischen Kernporenaufbau beigemessen, weil der größere Teil erst spät an die Kernpore lokalisiert (Dultz et al., 2008). Mitarbeiter der AG-Antonin konnten jedoch zeigen, dass die Depletion von Nup50 im zellfreien Kernaufbausystem (Abbildung 3) und in HeLa-Zellen zu einer Störung im Kernporenaufbau führt (Abbildung 4). Für beide Systeme ist bereits ein ähnlicher Phänotyp für das Schlüsselprotein Mel-28 beobachtet worden. Es kann also davon ausgegangen werden, dass Nup50 ebenfalls eine entscheidende Rolle im Kernporenaufbau spielt. In dieser Arbeit wurde gezeigt, welcher Teil von Nup50 und daraus folgernd welche Interaktionen wichtig sind, damit Nup50 an der Kernhülle lokalisieren kann. Außerdem wurde untersucht, welcher Abschnitt von Nup50 für dessen Lokalisation am mitotischen Chromatin von Bedeutung ist.

4.1 Die Rolle des Imports für die Nup50-Lokalisation an der Kernhülle

Nup50 interagiert mit unterschiedlichen Importfaktoren (Guan et al., 2000; Lindsay et al., 2002; Makise et al., 2012; Smitherman et al., 2000). Einerseits agiert Nup50 als ein Hilfsfaktor für den Kerntransport und bindet in diesem Rahmen an Importfaktoren (Lindsay et al., 2002). Andererseits muss es als nukleoplasmatisch gelegenes Protein (Guan et al., 2000), das wie alle Proteine im Zytoplasma translatiert wird, während der Interphase in das Kerninnere transportiert werden. Um herauszufinden, welche Bedeutung der Kernimport von Nup50 für dessen Lokalisation an der Kernhülle hat, wurden Experimente mit eGFP-Nup50 transfizierten HeLa-Zellen durchgeführt. Der Kernimport von Nup50 wurde durch Punktmutationen der Importin α -Bindungsstellen abgeschwächt. In diesem Experiment wurde bestätigt, dass die Punktmutante R38A

R45D eine stärkere Bindungsinhibition darstellt, als K3R R4D. Dies zeigte sich in der wesentlich stärkeren zytoplasmatischen Anfärbung der HeLa-Zellen (Abbildung 9). Auf die Generierung einer kombinierten vierfachen Punktmutation wurde verzichtet, da das Fragment 48-284 (Abbildung 11) keines der beiden N-terminal gelegenen Importin α -Bindungsstellen mehr enthält und ein ähnliches Muster wie die Doppelpunkt-Mutante R38A R45D aufwies. So fiel es ebenfalls durch ein starkes zytoplasmatisches Nup50-Signal auf. Dies lässt sich durch gestörten Nup50-Import und daraus resultierend vermindertes nukleoplasmatisches Nup50 erklären. In den Aufnahmen zum Fragment 48-284 (Abbildung 11), aber auch in denen der Punktmutanten (Abbildung 14), ließ sich eine deutliche Kernhüllen anfärbung erkennen. Eine Lokalisation von Nup50 an der Kernhülle und damit die Lokalisation am Kernporenkomplex wird durch fehlenden Kernimport von Nup50 also nicht gestört. Natürlich wäre es möglich, dass im Vergleich zum Wildtyp weniger Nup50 an der Kernhülle lokalisiert. Allerdings kann ein solcher quantitativer Vergleich nicht in diesem System durchgeführt werden, da der gesamte eGFP-Nup50-Gehalt von Zelle zu Zelle variiert.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Interaktion zwischen Nup50 und Importin α nicht ausschlaggebend für die Lokalisation von Nup50 an der Kernhülle ist und zumindest ein Großteil dieses Nukleoporins durch einen anderen Mechanismus als die direkte Bindung an Importin α an seine Position an der Kernmembran gelangt.

4.2 Das minimale Bindungsfragment

Das Nukleoporin Nup50 ist diffus im Nukleoplasma verteilt und an der nukleoplasmatischen Seite der Kernpore lokalisiert (Guan et al., 2000). Letzteres zeigt sich im für Kernkomplexe klassischen punktierten Muster an der Kernhülle (Smitherman et al., 2000). Um herauszufinden, welche Regionen von Nup50 entscheidend für dessen Lokalisation an der Kernhülle sind, habe ich eGFP-gekoppelte Verkürzungen des Nup50-Proteins in HeLa-Zellen transfiziert.

In diesen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die ganze R-Domäne (Abbildung 5, vergleiche Übersichtsartikel Moore, 2003) entfernt werden konnte, ohne das Kernhüllensignal von Nup50 aufzuheben (Abbildung 10). Es kann also davon

ausgegangen werden, dass die RanGTP-Nup50 Interaktion, die an der R-Domäne stattfindet, keine Relevanz für die Nup50-Lokalisation an der Kernpore hat.

Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass ein Teil der N-Domäne entscheidend für die Nup50-Lokalisation an der Kernhülle ist (Abbildung 10). Dieser Teil der N-Domäne konnte auf ein minimales Bindungsfragment mit einer Länge von 48 Aminosäuren eingeschränkt werden, welches immer noch ein deutliches Kernhüllen-Signal zeigt (Abbildung 12). Natürlich wiesen die Aufnahmen des minimalen Bindungsfragmentes 144-191 zusätzlich ein zytoplasmatisches Nup50-Signal auf. Dies konnte bei allen Fragmenten beobachtet werden, denen die für den Kernimport entscheidenden ersten 48 Aminosäuren fehlen (Abbildung 11). Weitere Verkürzungen des minimalen Fragments wurden nicht mehr durchgeführt, da die Verkürzungen 155-284 (Abbildung 11) und 1-178 (Abbildung 10) bereits gezeigt hatten, dass die randständigen Aminosäuren beider Enden des minimalen Bindungsfragments von Bedeutung für die Kernhüllenlokalisierung sind. Außerdem würde sich durch ein zu kleines Fragment die Wahrscheinlichkeit einer Fehlfaltung und somit einer falschen Aussage erhöhen. Interessanterweise ließ sich anhand eines Alignments des vollständigen Proteins (hier nicht dargestellt) zeigen, dass neben der Importin α -Bindungsregion am N-Terminus und der Ran-Bindungsregion am C-Terminus der Bereich des minimalen Bindungsfragmentes am meisten konservierte Aminosäuren aufweist. Diese Tatsache spricht dafür, dass in dem Fragment eine für verschiedene Spezies entscheidende Interaktion vermittelt wird. Innerhalb des minimalen Bindungsfragmentes wurden drei Aminosäuren (Y145, D178, Y179) gefunden, deren einzelne Mutationen in ein Alanin die Lokalisation von Nup50 an der Kernhülle aufhoben (Abbildung 14). Die Spezifität dieser drei Aminosäuren konnte dadurch bestätigt werden, dass die benachbarten Aminosäuren keine Abweichungen vom Wildtyp zeigten (Abbildung 14) oder nicht konserviert waren (Abbildung 13). Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass die Punktmutation F176A zu einer auffallend schwachen Kernhüllenanfärbung führt. Hier könnte eine Abschwächung der Funktion ohne vollständige Aufhebung die Ursache sein. Diese drei Aminosäuren Y145, D178 und Y179 sind also für eine Interaktion von Relevanz, die Nup50 an seine letzte Position an die Kernhülle lokalisiert. Abgesehen vom bereits ausgeschlossenen Kernimport (Abschnitt 4.1) gibt es auf dem Weg zur endgültigen Lokalisation verschiedene Schritte, die durch diese Mutationen blockiert werden

könnten: So könnten die Bindung an die Präpore, eine Rekrutierung an das Chromatin, Interaktionen zu anderen Nukleoporinen oder ein unbekannter Schritt verhindert werden.

4.3 Interaktionen von Nup50 mit Nukleoporinen

Um herauszufinden, ob die Punktmutationen, welche die Lokalisation von Nup50 an der Kernhülle verhindern (Abbildung 14), eine bestimmte Protein-Protein-Interaktion inhibieren, wurden bekannte Bindungspartner im GST-Pulldown Assay getestet. Antikörper gegen Mel-28, Nup153, Importin α und Importin β sollten zeigen, ob diese Proteine aus dem *Xenopus laevis* Eiextrakt an das minimale Bindungsfragment (Abschnitt 4.2) in Nup50 binden und ob die Mutationen Y145A, D178A, Y179A (Abschnitt 4.2) diese Bindung aufheben können.

Vorab musste Nup50 exprimiert und aufgereinigt werden. Das Nup50-Protein sowie das minimale Bindungsfragment (mit und ohne Punktmutationen) sind als rekombinante Proteine in *E. coli* Zellen exprimierbar (Abbildung 16). Die höchste Effizienz zeigt sich bei einer Expressionstemperatur von 18°C (Abbildung 15). Dieses Ergebnis ist auch für folgende Studien von Bedeutung. Es wäre interessant gewesen zu testen, ob die Mutante D176A ein schwächeres Kernhüllensignal als der Wildtyp zeigt (Abbildung 14), weil sie vergleichsweise weniger von dem entscheidenden Interaktionspartner binden kann. Bei genannter Mutante gab es jedoch Schwierigkeiten in der Expression, weshalb der Fokus auf die drei starken Lokalisations-Mutanten gelegt wurde.

Im GST-Pulldown Assay konnte kein alleiniger Bindungspartner nachgewiesen werden (Abbildung 17). Sowohl Mel-28 als auch Nup153 banden das minimale Fragment und alle Mutationen, die eine Kernhüllenanfärbung zulassen (K177A, E180A). In der Tat zeigten beide Nukleoporine keine Bindung zu den Mutationen, die eine Lokalisation an der Kernmembran im HeLa-Zell-System blockieren (Y145A, D178A, Y179A). Ungeklärt ist bisher, ob Nup153 und Mel-28 miteinander interagieren und deshalb das gleiche Muster im Protein-Bindungs-Assay aufweisen oder die Bindungsstellen für Mel-28 und Nup153 am Nup50-Protein überlappen. Es ist relativ unwahrscheinlich, dass die direkte Nup153-Bindung die entscheidende Interaktion ist, auf Grund derer

Nup50 essentiell für den Wiederaufbau von Kernporenkomplexen ist. So wurde gezeigt, dass eine Depletion von Nup153 im *in vitro* Kernaufbausystem den Aufbau des Kernporenkomplexes nicht verhindert (Walther et al., 2001). Ebenso führte das Herunterregulieren von Nup153 mittels RNAi nicht zu fehlenden Kernporen (Hase and Cordes, 2003, Mackay et al., 2009). Lediglich der nukleäre Korb war strukturell verändert. Als Teil dessen lokalisierte auch Nup50 nicht mehr an die Kernpore (Hase and Cordes, 2003). Es wäre also möglich, dass Nup153 Nup50 an die Kernpore lokalisiert und zwar mittels des hier identifizierten minimalen Bindungsfragments. Wobei die Nup50-Nup153-Interaktion nicht entscheidend für den postmitotischen Wiederaufbau des Kernporenkomplexes zu sein scheint.

Die Vermutung liegt nahe, dass die Interaktion zu Mel-28 eine entscheidende Rolle im Kernporenaufbau spielt. Mel-28 und Nup50 zeigen einen ähnlichen Phänotyp im zellfreien Kernaufbausystem (Franz et al., 2007, Abbildung 3): Ihre Depletion führt zu einer geschlossenen Kernhülle ohne Kernporen. Für Nup50 konnte gezeigt werden, dass durch die Gabe von rekombinantem Nup50 zum Nup50-depletierten Froschei-Extrakt im gleichen Assay Kernporenkomplexe wiederhergestellt werden konnten. Dieser Versuch verdeutlicht, dass nicht eine Kodepletion, zum Beispiel von Mel-28, ausschlaggebend für das Fehlen von Kernporen ist, sondern die Abwesenheit von Nup50 selbst. Dieser *rescue*-Versuch ist bisher nicht für Mel-28 durchgeführt worden und es wäre interessant, die Ergebnisse der beiden Nukleoporine zu vergleichen. Unklar ist, ob die Bindung zwischen Nup50 und Mel-28 direkt oder indirekt vermittelt wird. Ein Pulldown-Assay mit Nup50 als Köder und rekombinantem Mel-28 statt dem Froschei-Extrakt als Beute könnte der nächste Schritt sein, um diese Frage zu klären. Ebenfalls sollte dieses Experiment mit rekombinanten Nup153 als Beute durchgeführt werden, um herauszufinden, ob die Bindung an das minimale Fragment für beide potentielle Bindungspartner gilt und ob einer von beiden die Bindung zwischen Nup50 und dem anderen Bindungspartner vermittelt. Natürlich ist es auch möglich, dass mindestens ein weiterer unbekannter Interaktionspartner mit involviert ist.

Da im *in vitro* Zellkernaufbausystem gezeigt wurde, dass das vollständige Nup50-Protein die Kernporenkomplexe wiederherstellen kann (Abbildung 3), könnte man nun testen, ob die Verwendung von Nup50-Fragmenten zu einem vergleichbaren Ergebnis

führt. Man könnte die drei Domänen einzeln untersuchen und auch das gefundene minimale Bindungsfragment verwenden. Interessant zu wissen wäre auch, ob die Punktmutationen Y145A, D178A und Y179A im vollständigen Protein einen Kernporenaufbau *in vitro* verhindern. Sollten die Punktmutanten den Kernporenaufbau nicht wiederherstellen können und sollte sich im vorgeschlagenen Pulldown-Assay zeigen, dass die Punktmutationen eine direkte Bindung zu Mel-28 oder Nup153 verhindern, ist die Interaktion zwischen dem gefunden Bindungspartner und Nup50 entscheidend für dessen Funktion im Kernporenaufbau.

Wenn nachgewiesen werden kann, dass es sich bei den drei Punktmutationen um Bindungsmutanten von Nup50 zu Mel-28 oder Nup153 handelt, wäre der nächste Schritt, eine Mutation in dem Bindungspartner zu finden, die nicht mehr mit Nup50 interagiert. Diese Mutante könnte ebenfalls im zellfreien Kernaufbau-Assay geprüft werden. Ziel dessen wäre es zu erfahren, welches Nukleoporin das jeweils andere Nukleoporin rekrutiert.

Eine weitere mögliche Vorgehensweise wäre ein *rescue*-Versuch in HeLa Zellen. In die mit RNAi behandelten HeLa-Zellen (Abbildung 4) könnten vorab RNAi resistente Nup50 Fragmente transfiziert werden, um herauszufinden, ob zum Beispiel das minimale Bindungsfragment ausreicht, um die Anzahl der Kernporen aufrechtzuerhalten.

4.4 Die Interaktion von Nup50 und Chromatin

Beim postmitotischen Kernporenaufbau werden Nukleoporine ab der Anaphase an das Chromatin rekrutiert und können dann als Bindungsplattform für weitere Nukleoporine fungieren. Eine frühe Fraktion von Nup50 lokalisiert zeitgleich mit Nup153 in der späten Anaphase an die sich teilenden Chromatiden (Dultz et al., 2008). Es ist nicht geklärt, ob Nup50 direkt an Chromatin binden kann oder dies über weitere Interaktionspartner, wie zum Beispiel andere Nukleoporine, geschieht. Ein möglicher Bindungspartner wäre das Schlüsselnukleoporin Mel-28, das initial direkt an Chromatin bindet und bereits in der frühen Anaphase am Chromatin beobachtet wurde (Dultz et al., 2008). In den zuvor beschriebenen Experimenten (Abschnitt 4.2) wurden Mutanten

gefunden, die nicht mehr an die Kernhülle von HeLa-Zellen lokalisieren. Ein möglicher Schritt, der durch diese Mutationen inhibiert wird, könnte die Rekrutierung an das Chromatin sein. Eine fehlende frühe Nup50-Lokalisation könnte ebenfalls der Grund für fehlende Kernporen im *in vitro* Depletions-Versuch sein (Abbildung 3). In dieser Arbeit wurde in synchronisierten HeLa-Zellen getestet, welche Region des Nup50-Proteins wichtig für dessen Lokalisation am mitotischen Chromatin ist. Es konnte gezeigt werden, dass die Chromatinbindung nicht durch die Importin α - oder RanGTP-Bindungsstelle stattfindet, da Nup50 auch ohne die bindungsvermittelnden Domänen ein deutliches Signal am Chromatin zeigt (Abbildung 20, 21). Das minimale Bindungsfragment, welches in interphasischen Zellen noch an der Kernhülle zu beobachten ist (Abschnitt 4.2), wird ebenfalls in der späten Anaphase an das Chromatin lokalisiert. Überraschenderweise zeigte keine der Punktmutationen (Y145A, D178A, Y179A), die eine Lokalisation an der Kernhülle verhindern, einen auffälligen Phänotyp in mitotischen HeLa-Zellen. Dass diese Mutanten immer noch am Chromatin lokalisieren, lässt zwei verschiedene Mechanismen vermuten. So scheint die fehlende Lokalisation an der Kernhülle in interphasischen Zellen nicht auf einer mangelnden Rekrutierung von Nup50 am Chromatin zu basieren. Dass die Punktmutanten, die nicht mehr an Mel-28 binden können, immer noch ans mitotische Chromatin lokalisieren, lässt darauf rückschließen, dass die Mel-28-Nup50-Interaktion nicht wichtig für die Nup50-Lokalisation an das Chromatin ist. Da sich die für die Lokalisierung am Chromatin entscheidenden Aminosäuren ebenfalls in dem minimalen Bindungsfragment befinden könnten, wäre eine Analyse weiterer Aminosäuren als einfache und mehrfache Mutationen der nächste Schritt. Die im Folgenden von mir hergestellten Mutanten 41-46A, N153A, W159A, N167A, C170A wurden nicht mehr getestet.

Da die ersten Aminosäuren 1-114 (Abbildung 20) ebenfalls in den meisten Aufnahmen eine schwache Lokalisation am Chromatin zeigen, wäre es möglich, dass dieser Bereich ebenfalls entscheidende Aminosäuren enthält. In diesem Fall würden nur eine Inaktivierung beider Bereiche, wie durch das Konstrukt 155-284, zu einer vollständigen Aufhebung der Lokalisierung von Nup50 am Chromatin führen.

Der Assay, welcher zur Ermittlung der Chromatinbindung entwickelt wurde (Abschnitt 3.10), hat eine eingeschränkte Aussagekraft. Die Einteilung in das Stadium c

(Abbildung 18) fand nur anhand der Chromatinform (Hase and Cordes, 2003) statt. Abgesehen von 30 Minuten Inkubationszeit wurden zu allen Fixierungszeitpunkten verschiedene Mitosestadien beobachtet und zu späteren Zeitpunkten war lediglich die Prozentzahl der Zellen erhöht, die sich schon in späteren Stadien befanden. So konnte nicht durch einen festen Fixierungszeitpunkt das Teilungsstadium objektiviert werden, sondern ich musste anschließend die geeigneten Zellen heraussuchen. Dies führte dazu, dass nur annähernd das gleiche Stadium bestimmt werden konnte. Die Tatsache, dass trotz Synchronisierung nur wenige Zellen im Stadium c waren, führte dazu, dass das Ergebnis im Zweifelsfall falsch negativ ausfallen könnte. Trotz des unvollständigen Kernporensignals (Abbildung 19) ist nicht vollständig geklärt, welches Nup50-Signal durch Chromatinbindung und welches durch Import zustande kommt. Schließlich weist der Marker mAB414 nicht nur früh bindende Nukleoporine nach, sondern möglicherweise auch das Import-initierende Nup98. Um herauszufinden, wie viel Transport letztendlich beobachtet wird und genauere Phaseneinteilung zu gewährleisten, würde sich Life Cell Imaging anbieten. Hierfür könnten sowohl Importmarker als auch Mitosemarker verwendet werden, um den zeitlichen Ablauf genauer zu analysieren. Weiterführend könnte man testen, ob die Rekrutierung von anderen Nukleoporinen in Nup50 depletierten Zellen verhindert wird.

Um sich der Fragestellung zu nähern, ob eine direkte oder eine indirekte Nup50-Chromatinbindung möglich ist und welche die vermittelnde Interaktionspartner sind, bietet sich ein *in vitro* Chromatinbindungs-Assay an. Hierfür könnte einerseits membranfreies Froschei-Extrakt mit Spermienköpfen inkubiert werden (Franz et al., 2007). Dieser Assay ermöglicht es, indirekte Bindungen der Nukleoporine aus dem Froschei-Extrakt am Chromatin zu visualisieren. Ebenso könnte durch Hitzeinaktivierung des Froschei-Extrakts und Zugabe von rekombinantem Nup50 eine direkte Bindung ans Chromatin untersucht werden. Andererseits könnten magnetische Streptavidin-Kügelchen an biotinylierte DNA gebunden und mit rekombinanten Proteinen inkubiert werden (Ulbert et al., 2006). Die Analyse der Proteine an den durch einen Magneten gesammelten Kügelchen lässt Aussagen über direkte Chromatinbindung zu.

Trotz einiger offener Fragen, die durch die hier beschriebenen Experimente nicht geklärt werden konnten, konnte ich in dieser Arbeit erstens zeigen, dass eine inhibierte

Interaktion zu Mel-28 und/ oder Nup153 mit einer verhinderten Lokalisation von Nup50 an der Kernhülle einhergeht. Zweitens findet die Rekrutierung von Nup50 an das postmitotische Chromatin offensichtlich nicht via Mel-28 statt und ist irrelevant für eine fehlende Kernporenlokalisation in der Interphase.

5. Zusammenfassung

In eukaryontischen Zellen werden Zytoplasma und Nukleoplasma durch die Kernhülle voneinander getrennt. Große Moleküle können diese Barriere, die aus zwei Membranen besteht, nur durch sogenannte Kernporen passieren. Kernporen sind gigantische Proteinkomplexe, die neben der passiven Diffusion von Ionen den aktiven Transport von Makromolekülen vermitteln. In mehrzelligen Organismen bricht die Kernhülle mitsamt den darin eingebetteten Kernporenkomplexen während der Mitose zusammen, damit die Chromosomen auf die Tochterzellen aufgeteilt werden können. Am Ende der Mitose werden die Kernporen durch Rekrutierung einzelner Bausteine, der Nukleoporine, wieder am Chromatin aufgebaut. Wie diese Bausteine miteinander interagieren, welches Nukleoporin durch ein anderes rekrutiert wird und welche Nukleoporine direkt an das Chromatin binden, ist ein zurzeit intensiv untersuchtes Forschungsgebiet.

Die AG-Antonin hatte herausgefunden, dass das an der nukleoplasmatischen Seite der Kernporenkomplexe lokalisierte Nukleoporin Nup50 essentiell für den Wiederaufbau von Kernporenaufbau am Ende der Mitose ist. Über Nup50 wusste man bisher nur, dass es beim Import von Proteinen in den Zellkern beteiligt ist, aber über diese zusätzliche Funktion waren keine Details bekannt.

In dieser Arbeit habe ich gezeigt, dass ein Nup50-Fragment von 48 Aminosäuren dafür verantwortlich ist, dass dieses Protein an Kernporen lokalisiert. Innerhalb dieses entscheidenden minimalen Bindungsfragments wurden drei Aminosäuren identifiziert, deren Mutationen die Lokalisation von Nup50 an der Kernhülle aufheben und die damit notwendig für die Kernporenlokalisation sind.

Durch GST-Pulldown-Versuche mit zellulären Extrakten konnte nachgewiesen werden, dass die drei genannten Mutanten die Bindung zwischen rekombinanten Nup50 und zwei weiteren Nukleoporinen, Mel-28 und Nup153, verhindern.

Darüber hinaus stelle ich vor, wie in HeLa-Zellen die Lokalisation von Nup50 an Chromatin während des Austritts aus der Mitose analysiert werden kann. Ich konnte zeigen, dass jene drei Mutanten die Chromatinlokalisation nicht inhibieren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Interaktion von Nup50 mit dem Chromatin am Ende der Mitose nicht durch Bindung an Mel-28 oder Nup153 stattfindet.

6. Literaturverzeichnis

Antonin, W., J. Ellenberg, et al. (2008). "Nuclear pore complex assembly through the cell cycle: Regulation and membrane organization." *FEBS Lett* **582**(14): 2004-2016.

Brohawn, S. G., J. R. Partridge, et al. (2009). "The nuclear pore complex has entered the atomic age." *Structure* **17**(9): 1156-1168.

D'Angelo, M. A. and M. W. Hetzer (2008). "Structure, dynamics and function of nuclear pore complexes." *Trends Cell Biol* **18**(10): 456-466.

De Souza, C. P. and S. A. Osmani (2009). "Double duty for nuclear proteins--the price of more open forms of mitosis." *Trends in genetics : TIG* **25**(12): 545-554.

Dultz, E., E. Zanin, et al. (2008). "Systematic kinetic analysis of mitotic dis- and reassembly of the nuclear pore in living cells." *J Cell Biol* **180**(5): 857-865.

Franz, C., R. Walczak, et al. (2007). "MEL-28/ELYS is required for the recruitment of nucleoporins to chromatin and postmitotic nuclear pore complex assembly." *EMBO Rep* **8**(2): 165-172.

Fried, H. and U. Kutay (2003). "Nucleocytoplasmic transport: taking an inventory." *Cell Mol Life Sci* **60**(8): 1659-1688.

Guan, T., R. H. Kehlenbach, et al. (2000). "Nup50, a nucleoplasmically oriented nucleoporin with a role in nuclear protein export." *Molecular and cellular biology* **20**(15): 5619-5630.

Hase, M. E. and V. C. Cordes (2003). "Direct interaction with nup153 mediates binding of Tpr to the periphery of the nuclear pore complex." *Mol Biol Cell* **14**(5): 1923-1940.

Hetzer, M. W. and S. R. Wentz (2009). "Border control at the nucleus: biogenesis and organization of the nuclear membrane and pore complexes." *Dev Cell* **17**(5): 606-616.

Lindsay, M. E., K. Plafker, et al. (2002). "Npap60/Nup50 is a tri-stable switch that stimulates importin-alpha:beta-mediated nuclear protein import." *Cell* **110**(3): 349-360.

Mackay, D.R., Elgort, S.W. et al. (2009). "The nucleoporin Nup153 has separable roles in both early mitotic progression and the resolution of mitosis." *Mol Biol Cell* **20**(6), 1652-1660.

Makise, M., D. R. Mackay, et al. (2012). "The Nup153-Nup50 protein interface and its role in nuclear import." *The Journal of biological chemistry* **287**(46): 38515-38522.

Moore, M. S. (2003). "Npap60: a new player in nuclear protein import." *Trends in cell biology* **13**(2): 61-64.

Ogawa, Y., Y. Miyamoto, et al. (2010). "Two isoforms of Npap60 (Nup50) differentially regulate nuclear protein import." *Mol Biol Cell* **21**(4): 630-638.

Schooley, A., B. Vollmer, et al. (2012). "Building a nuclear envelope at the end of mitosis: coordinating membrane reorganization, nuclear pore complex assembly, and chromatin decondensation." *Chromosoma* **121**(6): 539-554.

Smitherman, M., K. Lee, et al. (2000). "Characterization and targeted disruption of murine Nup50, a p27(Kip1)-interacting component of the nuclear pore complex." *Molecular and cellular biology* **20**(15): 5631-5642.

Ulbert, S., Platani, M. et al. (2006). "Direct membrane protein-DNA interactions required early in nuclear envelope assembly." *J Cell Biol* **173**(4), 469-476.

7. Erklärung

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit PD Dr. Wolfram Antonin, Betreuer und Arbeitsgruppenleiter am Friedrich-Miescher-Laboratorium der Max-Planck-Gesellschaft, Tübingen.

Die Transfektionsexperimente und Auswertungen in den Zellkulturversuchen habe ich eigenständig durchgeführt. Die dafür verwendeten Konstrukte und Vektoren wurden zum Teil von Cornelia Sieverding, Technische Assistentin der AG-Antonin, hergestellt. Konstrukte, die ich selber generiert habe, sind aus dem Material- und Methodenteil ersichtlich. Ebenso habe ich die Methode zur Synchronisierung und zur Auswertung der Mitosestadien selbst entwickelt.

Die rekombinanten Proteine habe ich exprimiert und aufgereinigt. Die GST-Pulldown-Experimente habe ich in Zusammenarbeit mit Ruchika Sadev, Doktorandin der AG-Antonin, durchgeführt. Die dafür verwendeten Konstrukte habe ich selbst hergestellt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig verfasst zu haben und keine weiteren als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Tübingen, den 27.11.14

Danksagung

Zuerst möchte ich Wolfram Antonin danken, der mir die Chance gegeben hat in seinem Labor zu arbeiten und dort viele Dinge zu lernen. Insbesondere vielen Dank für die gute Betreuung dieser Arbeit.

Danke an Allana und Nathalie für ihre Hilfe, an Conny für ihre Geduld am Anfang, an Katharina für die gute Arbeitsplatz-Nachbarschaft, an Micha und Ben für alle ihre Antworten und an Ruchika für ihre Unterstützung bei den Pulldown-Experimenten.

Außerdem möchte ich mich bei Christian für die Einführung in die Mikroskopie bedanken und beim evangelischen Studienwerk Villigst, das mein Stipendium für diese Doktorarbeit verlängert hat.

Ebenso ein großes Merci an meine Familie, meine Freunde und an Max dafür, dass sie da waren und für das Interesse an meiner Arbeit.