

**Charakterisierung eines
ribosomenassoziierten Proteinkomplexes
der Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

vorgelegt von
Diplom-Ingenieurin
Jacqueline Franke
aus Berlin

von der Fakultät III - Prozeßwissenschaften
der Technischen Universität Berlin
- Institut für Biotechnologie -
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -
genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Helmut Görisch

Berichter: Prof. Dr. Ulf Stahl

Berichter: Prof. Dr. Enno Hartmann

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 18.9.2001

Berlin 2001

D83

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	4
I Theoretischer Teil Intrazellulärer Proteintransport	6
1. Überblick	6
1.1. Der Transport von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum	8
1.1.1. Der Sec61p-Komplex	8
1.1.2. Der posttranslationale Proteintransport in das Endoplasmatische Retikulum	9
1.1.3. Der cotranslationale Proteintransport in das Endoplasmatische Retikulum	11
1.1.4. Wann co-, wann posttranslatonaler Transport?	14
1.1.5. Proteinmodifikationen im Endoplasmatischen Retikulum	15
1.2. Der Transport von Proteinen in den Zellkern	18
1.2.1. Der Kernporenkomplex	18
1.2.2. Kernlokalisierungssignale	19
1.2.3. Der „klassische“ NLS-abhängige Import von Proteinen in den Zellkern	19
1.2.4. Der Import von Proteinen in den Zellkern durch Importin β -ähnliche Transportrezeptoren	21
1.2.5. Triebkraft des Kerntransports	23
II Praktischer Teil Charakterisierung des Nascent-polypeptide Associated Complex (NAC) der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	26
1. Einleitung	26
1.1. Nascent-polypeptide Associated Complex (NAC) im Säuger	26
1.2. Nascent-polypeptide Associated Complex in der Hefe <i>S. cerevisiae</i>	28
2. Zielsetzung	30
3. Material und Methoden	31
3.1. Material	31
3.1.1. Bakterienstämme	31
3.1.2. Hefestämme	31
3.1.3. Plasmide	32
3.1.4. Oligonucleotide	34
3.1.5. Antikörper	34
3.2. Methoden	35
3.2.1. Allgemeines	35
3.2.2. Anzucht von Zellen	35
3.2.3. Transformation von <i>E. coli</i>	36
3.2.4. Transformation von <i>S. cerevisiae</i>	36
3.2.5. Herstellung von genomischen Deletionsmutanten in <i>S. cerevisiae</i>	36
3.2.6. Klonierung von GFP-Fusionsplasmiden	36

3.2.7. Überexpression von Proteinen in <i>S. cerevisiae</i>	37
3.2.8. Überexpression von His-Egd1p und His-Egd2p in <i>E.coli</i>	37
3.2.9. Wachstumskurven	38
3.2.10. Zellfraktionierung von <i>S. cerevisiae</i>	38
3.2.11. Gelfiltration	38
3.2.12. Co-Immünpräzipitation	38
3.2.13. Präparation von <i>in vitro</i> -Translationslysaten aus <i>S. cerevisiae</i>	39
3.2.14. Herstellung von RNCs	39
3.2.15. Präparation von Mikrosomen	39
3.2.16. Flotationsassay	40
3.2.17. Photoquervernetzung	40
3.2.18. <i>In vitro</i> -Kernimport in HeLa-Zellen	40
3.2.19. Fluoreszenzmikroskopie	41
4. Ergebnisse	42
4.1. <i>EGD1</i> , <i>EGD2</i> und <i>BTT1</i> sind nicht essentiell	42
4.2. Die gleichzeitige Deletion von <i>EGD1</i> und <i>BTT1</i> verursacht Lethalität bei 37°C	42
4.3. Egd1p, Egd2p und Btt1p bilden einen festen Komplex	44
4.4. Hefe-NAC ist über Egd1p mit Ribosomen assoziiert	45
4.5. Die ersten 11 Aminosäuren des Egd1p sind essentiell für die Ribosomenbindung des Hefe-NAC	46
4.6. Hefe-NAC bindet an die naszierende Kette	47
4.7. Hefe-NAC verhindert <i>in vitro</i> das Targeting cytosolischer RNCs an ER-Membranen	49
4.8. GFP-Fusionsproteine von Egd1p und Egd2p sind cytosolisch lokalisiert	50
4.9. Egd1p-2GFP und Egd2p-GFP sind im Kern lokalisiert, wenn ihre Ribosomenbindung aufgehoben wird	51
4.10. Der <i>in vitro</i> -Kernimport von Egd1p und Egd2p ist energieabhängig und wird durch verschiedene Importin α -Proteine vermittelt	53
4.11. Der <i>in vivo</i> -Import von Egd1p in den Kern ist in verschiedenen Kernimportmutanten gehemmt	56
4.12. Die Deletion der ersten 14 Aminosäuren von Egd1p-2GFP verhindert den Kap123p/Pse1p-abhängigen Kernimport	58
5. Diskussion	60
5.1. NAC aus <i>S. cerevisiae</i> spielt eine Rolle in der Regulation des cotranslationalen Proteintransportes in das ER	60
5.2. NAC wird in <i>S. cerevisiae</i> aktiv in den Kern transportiert	63
6. Zusammenfassung	69
7. Literaturverzeichnis	70
8. Anhang	86
8.1. Eigene Veröffentlichungen	86
8.2. Danksagung	87
8.3. Lebenslauf	88

Abkürzungsverzeichnis

aa	amino acids
ADH	Alkoholdehydrogenase
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
CAT	Chloramphenicolacetyltransferase
CuSO ₄	Kupfersulfat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Kulturmedium Gewebezellen)
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-aminoethylether)- tetraacetat
EKRM	EDTA-Kaliumacetat gewaschene rauhe Membranen
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin
HeLa	Humanzelllinie („Helen Lane“)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1- ethansulfonsäure
Hsp70	Hitzeschockprotein 70 kDa
IgG	Immunglobulin G
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-Thio-β-D-Galactopyranosid
kDa	Kilodalton
KOAc	Kaliumacetat
LiOAc	Lithiumacetat

Mg(OAc) ₂	Magnesiumacetat
min	Minuten
NAC	Nascent-polypeptide Associated Complex
NES	Nuclear Export Signal
Ni-NTA	Nickel-Nitrolotriacetat
NLS	Nuclear Localization Signal
NPC	Nuclear Pore Complex
NPL	Nucleoplasmin
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PEG	Polyethylenglycol
PI	Proteaseinhibitor
PMSF	Phenylmethylnsulfonsäurefluorid
RBB	Ribosome Binding Buffer
RNC	Ribosome Nascent-chain Complex
RT	Raumtemperatur
S	Svedberg-Einheit
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	synthetisches Minimalmedium mit Glucose
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS/PAGE	SDS/Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SRP	Signal Recognition Particle
SSB	Single-Strand Binding Protein
TCA	Trichloressigsäure
TDBA	4-(3-Trifluoromethyldiazirino-) Benzoesäure
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
ts	temperature sensitive
UV	Ultraviolettes Licht
WT	Wildtyp
YPD	Yeast Peptone Dextrose (Kulturmedium Hefe)

I Theoretischer Teil

Intrazellulärer Proteintransport

1. Überblick

Eines der wichtigsten Merkmale von lebenden Zellen ist die Abgrenzung biochemischer Prozesse in distinkten Räumen. Diese als Kompartimente bezeichneten Räume werden von biologischen Membranen umgeben. Für jedes Kompartiment und jede Membran existieren eigene molekulare Ausstattungen und Strukturen, die durch spezifischen, gerichteten Transport von Proteinen, Nucleinsäuren, Lipiden und niedrigmolekularen Bestandteilen zwischen diesen Kompartimenten aufrechterhalten werden müssen. Proteine spielen dabei nicht nur eine Rolle als Strukturkomponenten, sie nehmen als Enzyme, Rezeptoren und Transporter eine aktive Funktion wahr.

In Prokaryonten ist der Proteintransport nur auf ein Kompartiment beschränkt. Im Cytoplasma synthetisierte Proteine können über die innere Plasmamembran in den periplasmatischen Raum transportiert oder in sie inseriert werden. Im Gegensatz dazu existieren für Proteine in Eukaryonten eine Vielzahl von Transportmöglichkeiten. End- oder Zwischenstation für Proteine sind Organellen wie z.B. der Zellkern, Mitochondrien, Peroxisomen, Lysosomen, der Golgi-Apparat, das Endoplasmatische Retikulum (ER) sowie alle Membranen, die Kompartimente umschließen. Organellen können wie im Falle der Mitochondrien aus Subkompartimenten bestehen, zwischen denen wiederum Transportvorgänge ablaufen. Eine Übersicht der verschiedenen Transportwege ist in Abbildung 1 aufgezeigt.

Die offensichtliche Verwandtschaft verschiedener Transportwege kann durch die Endosymbiontentheorie erklärt werden. Die Theorie besagt, daß eukaryontische Zellen aus anaeroben Archaeobakterien entstanden, indem diese eine stabile endosymbiontische Verbindung mit Eubakterien eingegangen sind, die zur oxidativen Phosphorylierung fähig waren. Durch unvollständige Phagocytose oder „Umwachsen“ des Symbionten entstand die Eucyte (Gupta und Golding, 1996; Martin und Müller, 1998). Demnach besitzen Membranen gleichen phylogenetischen (eu- oder archaeobakteriellen) Ursprungs ähnliche Translokationsmaschinerien.

Man kann die wichtigsten Mechanismen des Proteintransportes in drei Gruppen einteilen. Der Transport in und aus dem Zellkern wird als einziger als „gated transport“ bezeichnet, da die Kernpore als selektiver Durchgang durch die Kernmembran funktioniert, der spezifischen Transport oder freie Diffusion von Makromolekülen bestimmter Größe erlaubt. Beim

vesikulären Transport werden Proteine in Vesikeln von einem Kompartiment in das andere befördert. Beispielsweise wird dieser Weg von Proteinen beschriftet, die vom ER-Lumen in den Golgi-Apparat oder vom Golgi in Lysosomen transportiert werden. In die dritte Gruppe gehören der Transport von Proteinen in die Mitochondrien, in die Thylakoiden der Chloroplasten, in Peroxisomen und der Proteintransport in und aus dem ER. Diese Prozesse werden als Transmembrantransport zusammengefaßt. Sie haben gemein, daß Proteine meist ungefaltete einen Translokationskanal in der Membran passieren.

Charakteristisch für alle Varianten des Transports sind Sortierungssignale in den Transportsubstraten, die sich meist durch distinkte Sequenzmotive auszeichnen (Blobel et al., 1979). Transportrezeptoren vermitteln durch spezifische Wechselwirkungen mit den Signalsequenzen den gerichteten Transport des Substrates an den Zielort.

Aufgrund der Funktion, des Verhaltens und der Herkunft des in dieser Arbeit untersuchten Proteinkomplexes wird in diesem theoretischen Teil näher auf den Transport von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum und in den Zellkern der Hefe *S. cerevisiae* eingegangen.

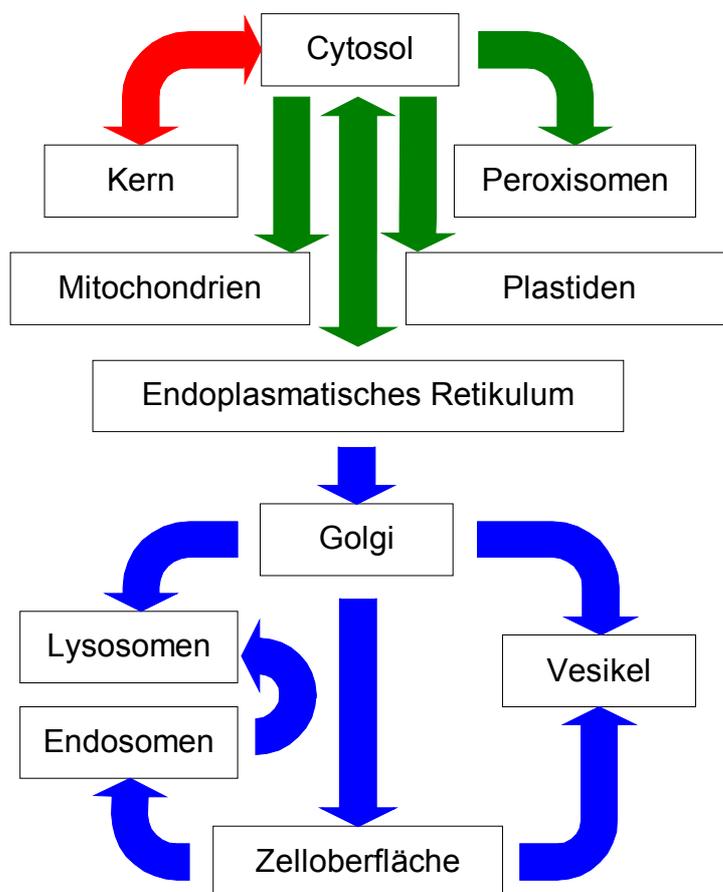


Abbildung 1: Überblick über die verschiedenen Mechanismen des Proteintransports. Proteine können von einem zum anderen Kompartiment durch den sogenannten “gated” Transport (rot), Transmembrantransport (grün) oder vesikulären Transport (blau) gelangen (übernommen aus Alberts et al., 1994).

1.1. Der Transport von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum

Das Endoplasmatische Retikulum spielt als Ausgangspunkt für sekretorische Proteine eine Schlüsselrolle in der Zelle. Von hier beginnt der Transport in weitere Kompartimente des sekretorischen Weges und zur Zelloberfläche (Palade, 1975).

Spezifische Signalsequenzen in den Transportsubstraten sind dafür verantwortlich, daß Proteine von ihrem Synthesort zur ER-Membran geleitet werden. Diese Signalsequenzen befinden sich meist am N-Terminus des Proteins und werden nach dem Membrandurchtritt durch den Signalpeptidase-Komplex abgespalten. Charakteristisch für Signalsequenzen sekretorischer Proteine ist eine Sequenz von 6 bis 20 hydrophoben Aminosäuren, die N-terminal von positiv geladenen und C-terminal von polaren Aminosäuren flankiert wird (Blobel et al., 1979; Nilsson et al., 1994; von Heijne, 1985). Bei einer Reihe von Membranproteinen wird die Funktion der Signalsequenz von der ersten Transmembrandomäne übernommen. Diese „Signalankersequenz“ besitzt in der Regel einen längeren hydrophoben Teil (High und Dobberstein, 1992). Die Erkennungsstelle für die Signalpeptidase fehlt bei diesen Proteinen.

Für sekretorische Proteine gibt es zwei Möglichkeiten das Lumen des ER zu erreichen: den post- oder den cotranslationalen Weg (Kalies und Hartmann, 1998). Der Sec61p-Komplex ist die Hauptkomponente beider Transportvarianten.

1.1.1. Der Sec61p-Komplex

Sec61p ist ein integrales Membranprotein, das zehn membranspannende Domänen aufweist und dessen N- und C-Terminus im Cytoplasma lokalisiert ist (Görlich et al., 1992; High et al., 1993; Panzner et al., 1995). Ursprünglich wurde Sec61p in *S. cerevisiae* durch genetische Screens nach Mutanten isoliert, die einen Defekt im sekretorischen Weg aufwiesen (Deshaies und Schekman, 1987). Sec61p ist evolutionär konserviert (Hartmann et al., 1994). SecY aus *E. coli* ist zu 20 % identisch mit Sec61p aus der Hefe, die Homologie zum Säuger Sec61 α beträgt 55 %. Sec61p bildet mit zwei weiteren Proteinen einen trimeren Komplex – Sbh1p und Sss1p (Panzner et al., 1995). Diese Proteine durchspannen die ER-Membran einmal. Ssp1p, das Homologe des *E. coli* SecE bzw. des Säuger Sec61 γ , ist wie Sec61p essentiell für die Hefe und interagiert mit Sec61p über dessen Transmembransegmente 6 bis 8. Da diese Region des Sec61p vermutlich auch für die Bindung der Signalsequenz verantwortlich ist, wurde die Hypothese aufgestellt, daß Sss1p den Translokationskanal verschließt, wenn dieser

nicht in Benutzung ist (Plath et al., 1998). Elektronenmikroskopische Bilder zeigen, daß drei oder vier der trimeren Sec61p-Komplexe eine ringförmige Struktur und somit einen Kanal durch das ER bilden können (Hanein et al., 1996).

1.1.2. Der posttranslationale Proteintransport in das Endoplasmatische Retikulum

Der posttranslationale Transport in das ER zeichnet sich dadurch aus, daß Proteine im Cytoplasma komplett translatiert werden und das Ribosom verlassen, bevor sie durch die ER-Membran transportiert werden (Rapoport et al., 1999). Eine vollständige Faltung des neu entstandenen Proteins, die für die Translokation durch die Membran störend wirken könnte, wird durch Bindung sogenannter Chaperone verhindert (Bukau et al., 2000). Die Chaperone, die zur Klasse der Hitzeschockproteine (Hsp) gehören, interagieren schon während der Translation mit dem entstehenden Protein und halten es in einer transportkompetenten Konformation. Dieser Mechanismus ist ATP-abhängig. Für den eigentlichen Translokationsprozeß durch die Membran scheinen die cytosolischen Chaperone jedoch keine Bedeutung zu haben, da in *in vitro*-Experimenten auch Harnstoff die Funktion der Chaperone übernehmen konnte, d.h. einen effizienten Transport ermöglichte (Chirico et al., 1988). Plath und Rapoport zeigten, daß die Freisetzung des Translokationssubstrates von Chaperonen spontan, ohne die Beteiligung der Komponenten des Translokationskanals erfolgt und daß kein cytosolischer Faktor spezifisch an die Signalsequenz bindet (Plath und Rapoport, 2000). Der Sec61p-Komplex ist Bestandteil der Translokationsmaschinerie von post- und cotranslationalem Transport. Charakteristisch für den posttranslationalen Weg in *S. cerevisiae* ist ein zusätzlicher tetramerer Komplex, der zusammen mit dem trimeren Sec61p-Komplex einen heptameren Sec-Komplex bildet (Deshaies et al., 1991; Panzner et al., 1995). Der tetramere Komplex, auch Sec62/63p-Komplex genannt, besteht aus den Membranproteinen Sec62p, Sec63p, Sec71p und dem membranassoziierten Protein Sec72p. Sec62p und Sec63p sind essentielle Proteine. Deletion der für diese Proteine codierenden Gene führt zur Akkumulation von Precursoren der Transportsubstrate *in vivo* und *in vitro*. Sec63p enthält eine sogenannte J-Domäne (eine Domäne ähnlich der im *E. coli*-Hitzeschockprotein DnaJ), die ins ER-Lumen gerichtet ist. Diese Region interagiert mit dem Hsp70-Homologen Kar2p (Brodsky et al., 1995; Matlack et al., 1997; Panzner et al., 1995).

Wie gelangt das entfaltete Transportsubstrat durch den Translokationskanal? Für die Beantwortung dieser Frage wurden zwei Modelle vorgeschlagen. In einem Modell agiert Kar2p als Motor, der die Kraft für die Translokation liefert (Glick, 1995). Kar2p bindet in

Anwesenheit von ATP an die J-Domäne des Sec63p und bindet gleichzeitig das Translokationssubstrat (Brodsky et al., 1995; Brodsky und Schekman, 1993; Lyman und Schekman, 1995). Dabei tritt durch Hydrolyse des an Kar2p gebundenem ATP eine Konformationsänderung von Kar2p auf, die ein aktives Hineinziehen des Substrates bewirkt. Durch wiederholtes Binden und Freisetzen des Substrates, aber fester Lokalisation von Kar2p an Sec63p, wäre es möglich, das gesamte Substrat in das Lumen des ER zu bewegen.

In neueren Publikationen wird das Modell der sogenannten „Brownschen Ratsche“ gegenüber dem Motormodell präferiert (Liebermeister et al., 2001; Matlack et al., 1999; Simon et al., 1992). Es geht davon aus, das Kar2p an das Substrat bindet und die Diffusion zurück ins Cytoplasma blockiert (siehe Abbildung 2). Eine so sonst ungerichtete Brownsche Bewegung wird verhindert und das Gleichgewicht verlagert sich auf die Seite des Transports in Richtung Lumen. Die Bindung mehrerer Kar2p-Moleküle an ein Substrat erhöht die Effizienz der Bewegung (Elston, 2000).

Die Erkennung der Signalsequenz des posttranslationalen Substrats durch die Komponenten des Transportkanals erfordert kein Kar2p oder ATP. Es wird spekuliert, daß Sec72p und Sec71p als eine Art „Signalsequenz-Antenne“ funktionieren, die posttranslationale Substrate an die Membran dirigiert (Dünnwald et al., 1999; Lyman und Schekman, 1996; Wittke et al., 2000).

Durch Quervernetzungsexperimente konnte gezeigt werden, daß die Signalsequenz eine helicale Form annimmt und zwischen zwei Transmembrandomänen des Sec61p einwandert (Plath et al., 1998). Offensichtlich ist die Sequenz senkrecht zur Membran orientiert und befindet sich an der Grenzfläche zwischen Lipid und Sec61p. Der restliche Anteil des Proteins wurde nicht in Kontakt mit Lipiden gefunden. Es wurde postuliert, daß sich das Substrat nach Bindung der Signalsequenz in der Bindungstasche von Sec61p in Form einer Haarnadel durch den hydrophilen Kanal bewegt. Am Ende der Translokation befindet sich das gesamte Protein bis auf die Signalsequenz im Lumen des ER. Die Signalsequenz wird abgespalten sobald die Signalsequenzschnittstelle für den Signalpeptidase-Komplex zugänglich ist (Blobel und Dobberstein, 1975).

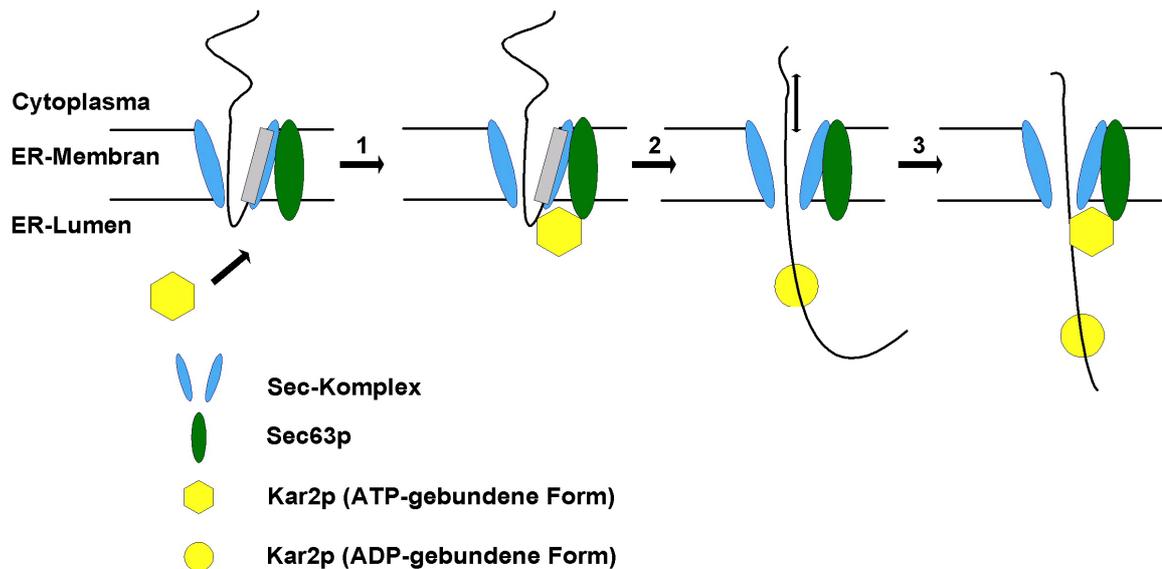


Abbildung 2: Modell des posttranslationalen Transport in das ER. Das Translokationssubstrat wird nach der Translation vom Ribosom freigesetzt und durch cytosolische Chaperone in transportkompetenter Konformation gehalten. Das Translokationssubstrat wird aufgrund seiner Signalsequenz an den Sec-Komplex gebunden und in Form einer Schleife in den Translokationskanal inseriert. Kar2p bindet in ATP-gebundener Form an die J-Domäne von Sec63p (1). Die J-Domäne aktiviert Kar2p zur Peptidbindung. Nach ATP-Hydrolyse wandelt sich die offene Bindungstasche von Kar2p-ATP in eine Bindungstasche (Kar2p-ADP), die sich fest um das Substrat schließt (2). Die Signalsequenz wird durch den auf luminaler Seite lokalisierten Signalpeptidasekomplex abgespalten. Das Substrat wird durch die Bindung von Kar2p-ADP daran gehindert, den Translokationskanal wieder in Richtung Cytoplasma zu verlassen, es kann sich aufgrund der Brownschen Molekularbewegung hin- und zurückbewegen. Durch Binden eines neuen Moleküls Kar2p und Wiederholung des Prozesses bis das gesamte Protein in das Lumen des ER gelangt ist, entsteht eine gerichtete Bewegung (3).

1.1.3. Der cotranslationale Proteintransport in das Endoplasmatische Retikulum

Im Gegensatz zur posttranslationalen Translokation sind bei dem cotranslationalen Prozeß Transport und Translation des Substrates gekoppelt.

Die Synthese der meisten Proteine beginnt an cytosolischen Ribosomen. Hat die Signalsequenz das Ribosom verlassen, wird sie vom Signalerkennungspartikel (SRP) erkannt. SRP ist ein Ribonucleoprotein, das in *S. cerevisiae* aus einer scR1-RNA und sechs Proteinen besteht (Srp72p, Srp68p, Srp54p, Sec65p, Srp21 und Srp14p) (Brown et al., 1994; Hann und Walter, 1991; Mason et al., 2000). Alle Proteine bis auf Srp21p besitzen Homologe im Säuger-SRP. Die Erkennung der Signalsequenz wird durch Srp54p/SRP54 vermittelt (Bernstein et al., 1989; High und Dobberstein, 1991). Der Kontakt von SRP an die naszierende Peptidkette führt zu einer Bindung von GTP an die G-Domäne von Srp54p/SRP54 (Bernstein et al., 1989; High und Dobberstein, 1991). Die weitere Elongation des Substrates wird verhindert, wahrscheinlich durch Interaktion eines Dimers des SRP mit dem Peptidyltransferasezentrum des Ribosoms (Mason et al., 2000). Es existiert eine Theorie, in der ein weiterer Proteinkomplex, Nascent-polypeptide Associated Complex (NAC), schon

vor dem Erkennen der Signalsequenz durch SRP, an das austretende Peptid bindet (Wiedmann et al., 1994). Diese Bindung verhindert den Zutritt anderer cytosolischer Faktoren zur naszierenden Kette, einschließlich SRP. Erst wenn die Signalsequenz vollständig translatiert ist, wird die Affinität der Sequenz zu SRP größer und NAC wird verdrängt (Wang et al., 1995).

Das Targeting des Komplexes aus Ribosom, naszierender Polypeptidkette, SRP und GTP an die ER-Membran erfolgt durch Interaktion des SRP mit seinem Rezeptor oder „docking protein“ (Wiedmann et al., 1987b). Dieser membranständige Rezeptor besteht aus einem Dimer zweier GTP-bindender Proteine – SR α und SR β . Die Interaktion mit SRP54 erfolgt nur mit der α -Untereinheit des SRP-Rezeptors, jedoch müssen beide Untereinheiten in GTP-gebundener Form vorliegen (Miller et al., 1995; Nicchitta et al., 1991; Rapiejko und Gilmore, 1992). Die kooperative Bindung von GTP an SRP54 und SRP-Rezeptor stabilisiert deren Interaktion (Rapiejko und Gilmore, 1997). Nachfolgend wird SRP54 von der Signalsequenz freigesetzt, SRP löst sich unter GTP-Hydrolyse vom Komplex aus naszierender Kette und Ribosom, und der Elongationsarrest wird aufgehoben (Connolly et al., 1991; Fulga et al., 2001; Miller et al., 1993). Das Substrat kann jetzt in den Translokationskanal eintreten und wird wahrscheinlich durch die Kraft der Translation durch den Kanal geschoben. Es ist nicht sicher, ob auch bei dieser Translokation luminal Chaperone, wie Kar2p eine Rolle spielen. Zumindestens für ein Substrat der Hefe, die sekretorische Invertase, konnte gezeigt werden, daß Kar2p für den *in vitro*-Transport in Mikrosomen notwendig ist (Nguyen et al., 1991). Der Komplex aus SRP und der α -Untereinheit des SRP-Rezeptors dissoziiert nach Hydrolyse von GTP. Damit stehen beide Komponenten für einen neue Runde des ER-Targetings zur Verfügung.

Hauptkomponente des Translokationskanals ist auch beim cotranslationalen Transport der trimere Sec61p-Komplex. Zwei Stadien sind während der Translokation zu beobachten. Zuerst ist die Bindung zwischen Ribosom und Sec61p-Komplex relativ schwach, so daß Ribosomen durch Hochsalzbehandlung abgewaschen werden können (Jungnickel und Rapoport, 1995). Bei weiterem Fortschreiten der Translokation wird das translatierende Ribosom fest an die Membran gebunden, Hochsalzbehandlung kann das Ribosom nicht von der Membran entfernen. Sec61p und die naszierende Kette sind vor Proteaseabbau geschützt. Es wird ein zweiter Signalsequenzerkennungsschritt im Sec61p-Komplex postuliert, der die Öffnung der Pore und die vollständige Insertion des Substrates initialisiert. Das luminal Ende des Translokationskanals kann durch das ER-Chaperon Kar2p regulatorisch geschlossen

werden (Hamman et al., 1998). Kar2p kann die luminal Seite aktiver und inaktiver Translokons blockieren und spielt damit eine wichtige Rolle in der Erhaltung der Durchlässigkeitsbarriere der ER-Membran. Das Öffnen und Schließen des Translokationskanals auf beiden Seiten der Membran ist in Abhängigkeit von der Länge der naszierenden Kette und der Anwesenheit von Transmembranregionen im Substrat sehr strikt reguliert. Es wird so sichergestellt, daß die cytosolische und luminal Seite des Translokationskanals nie zur gleichen Zeit geöffnet sind, um die Aufrechterhaltung von chemischen Gradienten an der ER-Membran zu gewährleisten.

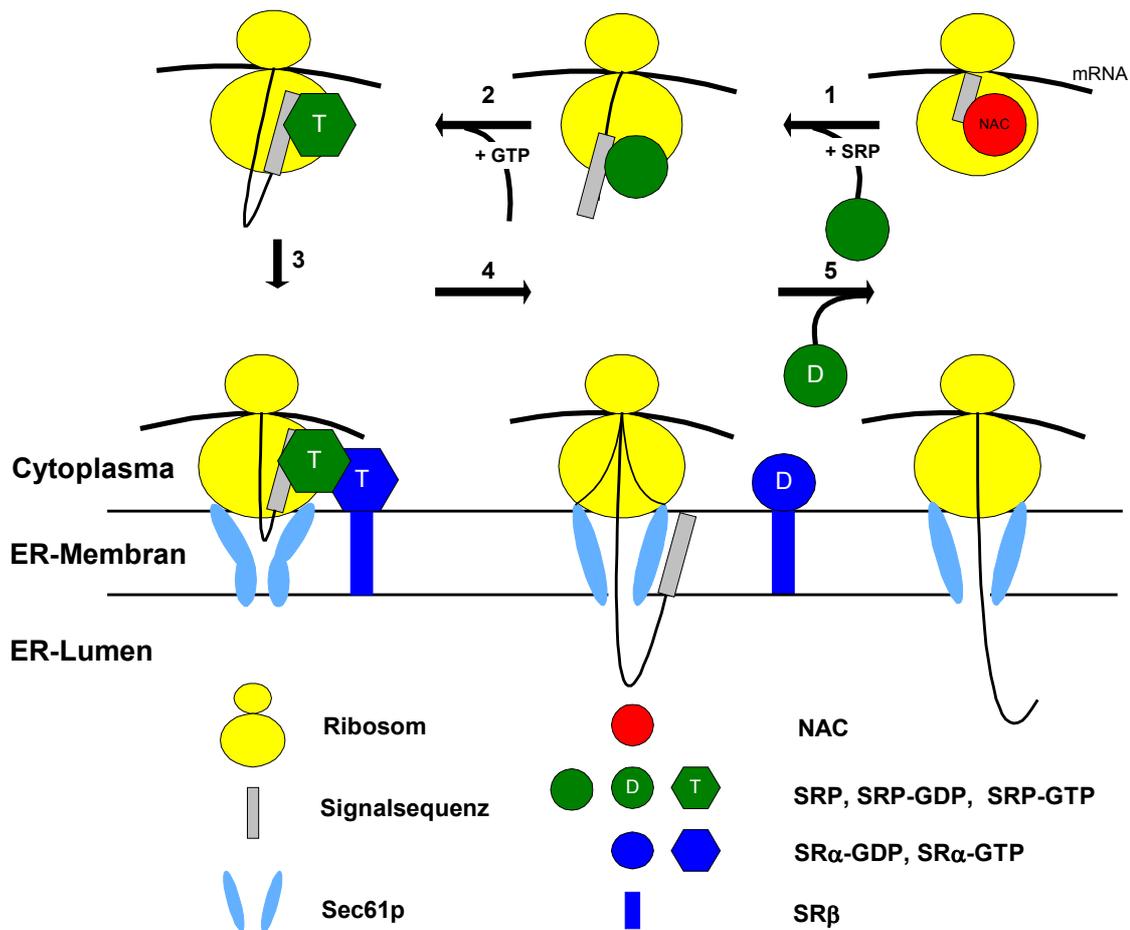


Abbildung 3: Modell des cotranslationalen Transports. NAC bindet an jede neu translatierte Proteinsequenz und verhindert die Interaktion mit cytosolischen Proteinen. Enthält ein Protein eine Signalsequenz und ist diese vollständig exponiert, verdrängt SRP NAC (Schritt 1). Die Interaktion von SRP mit der Signalsequenz bewirkt die Bindung von GTP an SRP54 (Schritt 2). Der Komplex aus Ribosom, naszierender Kette und SRP gelangt zum SRP-Rezeptor (bestehend aus α - und β -Untereinheit) an der ER-Membran. SRP bindet an den SRP-Rezeptor und ermöglicht die Bindung des Ribosoms an Sec61p (Schritt 3). SRP löst sich von der Signalsequenz. GTP-Hydrolyse führt zur Dissoziation von SRP und SRP-Rezeptor (Schritt 4). Die naszierende Kette wird in den Translokationskanal inseriert, wobei die Signalsequenz in die Membran integriert wird und der reife Teil des Substrates in Haarnadelform mittels der Kraft der Translation durch den Kanal transportiert wird (Schritt 5). Die Signalsequenz wird in die Membran integriert und noch während des Transfers des reifen Anteils des Substrates auf luminaler Seite des ER abgespalten.

Neueste Untersuchungen zeigen, daß Sec61p neben dem „docking protein“ als Rezeptor für den Komplex aus Ribosom, naszierender Kette und SRP fungiert. An dieser Bindung ist ribosomale RNA beteiligt (Prinz et al., 2000a; Prinz et al., 2000b).

Interessanterweise wurde in *S. cerevisiae* ein zweiter Komplex gefunden, der einen Translokationskanal bilden kann und unabhängig vom Sec61p-Komplex existiert (Finke et al., 1996). Dieser Komplex besteht aus der Hauptkomponente Ssh1p (Sec sixty-one homolog), Sbh2p und dem Sss1p, das auch im Sec61p-Komplex vertreten ist. Dieser sogenannte Ssh1p-Komplex ist nicht mit dem Sec62/Sec63p-Komplex assoziiert. Deshalb wird angenommen, daß er im Gegensatz zum Sec61p-Komplex nur im cotranslationalen Transport eine Funktion übernimmt. Möglicherweise wird dieser Komplex nur in Situationen benutzt, in denen cotranslationaler Transport besonders häufig abläuft.

1.1.4. Wann co-, wann posttranslationaler Transport?

In *S. cerevisiae* können Proteine post- und cotranslational in das ER gelangen. Die Komponenten des posttranslationalen Transportweges sind essentiell (Rothblatt et al., 1989). Fehlt SRP, kann die Zelle im Gegensatz zu höheren Eukaryonten diesen Defekt ausgleichen. Die Deletionsmutanten wachsen jedoch drei- bis sechsfach langsamer (Ogg et al., 1992). In *in vitro*-Experimenten war es möglich, Substrate in beiden Modi zu translozieren, andere aber nicht (Hansen et al., 1986; Hansen und Walter, 1988). Mutka und Walter (2001) konnten zeigen, daß die Translokationseffizienz eines SRP-abhängigen Substrates bei Fehlen von Srp54p *in vivo* schon nach einigen Stunden wieder der des Wildtypes entspricht. In der Abwesenheit von SRP könnten SRP-abhängige Substrate, möglicherweise mit geringerer Effizienz, posttranslational transportiert werden. Es wird auch die Möglichkeit erwogen, daß Proteine ohne die Anwesenheit von SRP cotranslational transportiert werden. Die Hypothese wurde aufgestellt, daß die kleine ribosomale Untereinheit nach der Translation eines sekretorischen Proteins freigesetzt wird und die große Untereinheit an der ER-Membran verbleibt (Hogan und Korner, 1968; Potter et al., 2001). Die nächste Translationsrunde beginnt, wenn ein neuer Initialisierungskomplex aus kleiner ribosomaler Untereinheit, mRNA und Methionyl-tRNA an die membrangebundene 60S-Untereinheit bindet.

Es ist bekannt, daß die Signalsequenz nicht nur die Richtung des Transports vorgibt, sondern auch den Mechanismus, wie das Protein in das ER gelangt (Ng et al., 1996). Substrate mit einer hydrophoberen Signalsequenz werden bevorzugt cotranslational und Proteine mit einer hydrophileren Signalsequenz überwiegend posttranslational transportiert. Andere

Arbeitsgruppen zeigen, daß zusätzliche Elemente in der Primärstruktur eines Substrates eine Rolle spielen (Rothblatt et al., 1987).

Die Existenz zweier paralleler Transportwege kann verschiedene Ursachen haben. Einerseits ist es möglich, daß bestimmte Eigenschaften eines Substrates für dessen effizienten Transport einen der beiden Transportmodi erfordern. Interessanterweise werden im Säuger scheinbar nur sehr kurze Proteine posttranslational transportiert, bei denen die Termination der Translation erfolgt bevor SRP an die Signalsequenz binden kann (Müller und Zimmermann, 1987). Möglicherweise kommt der posttranslationale Transport zum Einsatz, wenn SRP aus sterischen Gründen nicht an die Signalsequenz binden kann, zu lange für die Bindung braucht oder nicht genügend SRP zur Verfügung steht. Eine weitere limitierende Größe für den cotranslationalen Transport könnte das Verhältnis der Ribosomenzahl zur Zahl der Translokationsorte sein.

Besonders einzellige Organismen müssen auf Schwankungen in ihrer Umgebung schneller reagieren und ihre Proteinausstattungen schnell verändern. Es ist denkbar, daß in diesen Situationen, in denen die Zelle mit besonders hoher Syntheserate translatiert, der posttranslationale Transportweg zum Einsatz kommt. Dafür spricht, daß Bakterien mit einer generell sehr hohen Translationsrate, Proteine hauptsächlich posttranslational in den periplasmatischen Raum transportieren.

1.1.5. Proteinmodifikationen im Endoplasmatischen Retikulum

Das Endoplasmatische Retikulum ist das Zellkompartiment, in dem Proteine des sekretorischen Weges ihre Tertiär-, in machen Fällen Quartärstruktur erhalten. Proteine, die nicht korrekt gefaltet sind, werden nicht weiter in den Golgi-Apparat transportiert. Es konnte für einige Proteine gezeigt werden, daß eine irreversible Falschfaltung im ER zu einem retrograden Transport durch den Sec61p-Kanal führt, auf den der Abbau durch cytosolische Proteasomen folgt (Römisch, 1999).

Modifikationen des sekretorischen Proteins erfolgen noch während der Translokation durch die ER-Membran. Dies sind die Abspaltung der Signalsequenz durch den Signalpeptidase-Komplex (SPC), die Glykosylierung des Proteins durch den Oligosaccharyltransferase-Komplex (OST) und die Ausbildung von Disulfidbindungen. Die membranständigen Enzymkomplexe SPC und OST sind zum größten Teil im Lumen des ER lokalisiert und beim Membrandurchtritt des Substrates mit dem Transportkanal assoziiert (Antonin et al., 2000; Kalies et al., 1998; Knauer und Lehle, 1999).

Der Signalpeptidase-Komplex spaltet das N-terminale Signalpeptid eines sekretorischen Proteins sobald die Schnittstelle für die Signalpeptidase das Lumen des ER erreicht hat. Wird die Funktion des SPC *in vivo* ausgeschaltet, stirbt die Zelle, da eine Prozessierung sekretorischer Proteine nicht möglich ist (Bohni et al., 1988; Meyer und Hartmann, 1997). In der Hefe sind bisher 4 Untereinheiten des Signalpeptidase-Komplexes identifiziert worden: Sec11p, Spc1p, Spc2p und Spc3p. Sec11p und Spc3p scheinen direkt an der Abspaltung des Signalpeptids mitzuwirken (Bohni et al., 1988; Meyer und Hartmann, 1997; Mullins et al., 1996).

Signalpeptidasen, die N-terminale Signalpeptide abspalten, werden als Typ I Signalpeptidasen bezeichnet. Dazu gehören unter anderem die bakteriellen Leaderpeptidasen, die Signalpeptidasen der inneren Mitochondrienmembran sowie die ER-Signalpeptidasen. Die Funktion dieser Signalpeptidasen ist stark konserviert: *in vitro* können prokaryontische Leaderpeptidasen eukaryontische Signalsequenzen abspalten sowie eukaryontische Signalpeptidasen prokaryontische Signalsequenzen prozessieren (Dalbey et al., 1997).

Die N-glycosidische Kopplung von Oligosacchariden an die Polypeptidkette entsteht durch den Oligosaccharyltransferase-Komplex (OST). Dieser überträgt einen Zucker, bestehend aus 14 Resten N-Acetylglucosamin, Mannose und Glucose ($\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$) auf die NH_2 -Gruppe eines Asparagins. Nur Asparagine in der Reihenfolge Asn-X-Ser oder Asn-X-Thr (wobei X jede Aminosäure außer Prolin sein kann) werden glykosyliert (Yan und Lennarz, 1999). Die Vorstufe des übertragenen Zuckers wird durch Dolicholbindung in der ER-Membran gehalten. Er wird durch einen einzigen enzymatischen Schritt noch während der Translokation des Proteins auf dieses übertragen, sobald eine Glykosylierungsstelle das ER-Lumen erreicht hat. Die Energie für diesen Prozeß wird durch Spaltung der Pyrophosphatbindung bereitgestellt, die den Zucker an das membranständige Dolichol bindet. Das Oligosaccharid entsteht an der Membran, jedoch zuerst auf der cytosolischen Seite. Die Zucker werden im Cytoplasma durch Bildung von Nucleotid-Zucker-Intermediaten aktiviert und an das Dolichol gebunden. Die Synthese des Oligosaccharids wird nach Wechseln („Flip“) des Intermediates auf luminaler Seite fortgesetzt (High et al., 2000).

N-Glykosylierungen sind für das korrekte Falten vieler Proteine notwendig. Sofort nach dem Transfer von $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ auf das Protein agieren nacheinander die Glucosidasen I und II und entfernen die Glucose vom Glycan. Dieses „Glucose-Trimming“ ist Voraussetzung für die Interaktion des Substrates mit einem Chaperonsystem, bei dem zuerst die Kalzium-abhängigen ER-Lectine Calnexin und Calreticulin an die Kohlenhydratkette binden. Die Lectine sind wahrscheinlich notwendig, um das Chaperon ERp57 und das Substrat

zusammenzubringen (Parodi, 2000; Trombetta und Helenius, 1998). ERp57 gehört zu der Familie der Proteindisulfidisomerasen (PDI). Die Proteindisulfidisomeraseaktivität von ERp57 wird durch die Bindung von Calnexin und Calreticulin erhöht (Zapun et al., 1998). Man nimmt an, daß die Kombination aus ERp57 und Calnexin oder Calreticulin die Faltung des Glycoproteins durch Unterstützung der Ausbildung nativer Disulfidbindungen ermöglicht.

1.2. Der Transport von Proteinen in den Zellkern

Eine Haupteigenschaft, die Eukaryonten von Prokaryonten unterscheidet, ist die Existenz eines Zellkerns. Er ist durch eine Doppelmembran umschlossen, die mit dem ER verbunden ist und Nucleoplasma von Cytoplasma trennt. Im Zellkern finden u.a. Transkription, DNA-Replikation und der Zusammenbau von Proteinkomplexen statt. Alle daran beteiligten Faktoren müssen vom Ort ihrer Synthese, dem Cytoplasma, in den Kern gelangen. Umgekehrt müssen Komponenten, die nach der Kernpassage im Cytoplasma gebraucht werden bzw. im Kern generiert werden, den Kern verlassen. Der nucleocytoplasmatische Austausch von Molekülen erfolgt durch Kernporenkomplexe (Nuclear Pore Complex = NPC). Das kann einerseits bei kleinen Molekülen durch passive Diffusion und andererseits durch Rezeptorvermittelte, aktive Translokation geschehen. Auf den Import von Proteinen in den Kern wird in folgenden Abschnitten näher eingegangen.

1.2.1. Der Kernporenkomplex

Der Kernporenkomplex in höheren Eukaryonten besteht aus 50 bis 100 verschiedenen Proteinen, Nucleoporine genannt, und hat eine Größe von ca. 125 MDa (Fontoura et al., 1999; Reichelt et al., 1990). NPCs der Hefe sind kleiner und besitzen eine Größe von ca. 66 MDa (Ryan und Wentz, 2000). NPCs zeichnen sich durch eine 8-fache Rotationssymmetrie aus. Zusätzlich zu einem zentralen Kern (Zentralgranulum, central plug) findet man Filamente im Cytoplasma und im Kerninnerem (Allen et al., 2000). Die Zahl der Kernporenkomplexe in der Zelle variiert sehr stark und ist abhängig von Zellgröße und -aktivität. In der Hefe wurden etwa 30 verschiedene Nucleoporine identifiziert (Rout et al., 2000). Viele der Nucleoporine besitzen als charakteristisches Proteinmotiv Wiederholungen der Aminosäuren Phenylalanin und Glycin, sogenannte FG repeats. Nucleoporine sind nicht nur die strukturbildenden Faktoren der Pore, sie können außerdem als Bindungsstellen für lösliche Transportfaktoren dienen und so die Translokation durch die Kernpore ermöglichen. Sehr kleine Moleküle diffundieren schnell durch die Kernpore (Paine et al., 1975). Auch Proteine, die kleiner als 50 kDa sind, können durch Diffusion in den Kern gelangen. Dieser Weg ist jedoch sehr ineffizient. Proteine dieser Größe und Substrate, die nicht fähig sind, durch Diffusion in den Kern zu gelangen (> 50 kDa), werden deshalb aktiv und signalabhängig mit der Hilfe von Transportfaktoren, den Importinen, in den Kern transportiert (Görllich und Kutay, 1999).

1.2.2. Kernlokalisierungssignale

Proteine mit dem Bestimmungsort Zellkern sind durch Kernlokalisierungssignale (Nuclear Localization Signals = NLS) gekennzeichnet. Sogenannte „klassische NLS“ zeichnen sich durch Gemeinsamkeiten in der Primärstruktur aus (Makkerh et al., 1996). Man unterscheidet einfache NLS, die durch eine Anhäufung basischer Aminosäuren gekennzeichnet sind (zuerst charakterisiert im SV40 T-Antigen) und zweifache („bipartite“) NLS, zwei Sequenzabschnitte basischer Aminosäuren, die durch ca. 10 Aminosäuren voneinander getrennt sind (z.B. Nucleoplasmin). Weiterhin existieren Signalsequenzen, welche zum größten Teil aus polaren Resten bestehen und mit unpolaren Aminosäuren durchsetzt sind (z.B. Mat α 2) oder Anhäufungen basischer Aminosäuren, die von beiden Seiten von Prolin und Asparagin flankiert werden (Dingwall und Laskey, 1991).

In vielen Fällen weist die Primärstruktur des Proteins keine „klassische“ NLS auf und wird nicht über den „klassischen“ Importweg (siehe I.1.2.3.) in den Kern transportiert. Eines dieser „nicht-klassischen“ Signale ist die M9-Domäne, die z.B. im RNA-bindenden Protein hnRNP A1 (Nab2p in *S. cerevisiae*) gefunden wurde (Izaurrealde et al., 1997; Truant et al., 1998). In einem weiteren mRNA-bindenden Protein, dem hnRNP K, existieren neben einer klassischen zweifachen NLS eine sogenannte KNS (K nuclear shuttling domain) (Michael et al., 1997). In einigen Substraten sind die Signalsequenzen relativ kryptisch und sehr lang. Das ribosomale Protein L25 z.B. besitzt ein Signal von 41 Aminosäuren. In den ribosomalen Proteinen S22 und S25 treten nicht-klassische Kernlokalisierungssignale auf, die teilweise mit Zielsignalen für den Transport in den Nucleolus überlappen (Schaap et al., 1991; Timmers et al., 1999).

1.2.3. Der „klassische“ NLS-abhängige Import von Proteinen in den Zellkern

Die ersten Studien über den Ablauf des Kernimports wurden mit Hilfe von Mikroinjektionen in *Xenopus*-Oocyten und *in vitro*-Transportexperimenten in permeabilisierte HeLa-Zellen durchgeführt (Adam et al., 1990; Newmeyer et al., 1986). In letzterem Versuchsansatz wurde die Zellmembran durch Detergenz durchlässig gemacht und das Cytosol ausgewaschen. Ein markiertes Substrat konnte dann durch Zusatz definierter cytosolischer Fraktionen in den Kern transportiert werden. Mit Hilfe dieser Technik wurden Faktoren identifiziert, die für den Kernimport essentiell sind. Als Hauptkomponenten des Imports wurden der NLS-Rezeptor Importin α , Importin β , die GTPase Ran und NTF2 (Nuclear Transport Factor 2) beschrieben (Görlich und Kutay, 1999; Görlich et al., 1994; Görlich et al., 1995). Die am Kerntransport

beteiligten Komponenten sind evolutionär konserviert und mittlerweile auch in *S. cerevisiae* nachgewiesen worden.

Importin α ist für die Erkennung der NLS verantwortlich und interagiert mit Importin β . Importin β vermittelt die Bindung an den Kernporenkomplex und ist der eigentliche Transportrezeptor. In der Hefe existiert ein Importin α -Homologes – Srp1p, welches essentiell ist (Yano et al., 1994). Dieses Protein wurde ursprünglich als ein Suppressor von temperatursensitiven Mutationen der RNA Polymerase I identifiziert. In Säugern existieren sechs Isoformen des Importin α : Importin α 1/Rch1, Importin α 3/Qip1, Importin α 4/hSRP1 γ , Importin α 5/hSrp, Importin α 6 und Importin α 7 (Cuomo et al., 1994; Köhler et al., 1997; Seki et al., 1997). Die humanen Formen werden ubiquitär, aber in verschiedenen Geweben unterschiedlich hoch exprimiert. Es wurde gezeigt, daß Substratspezifitäten für einige Isoformen existieren (Köhler et al., 1999). Die Vielfalt der humanen Importin α -Proteine im Gegensatz zu *S. cerevisiae* kann mit der hohen Spezialisierung der Säugerzelle und höheren Anforderungen an die Regulation vieler Prozesse in Zusammenhang gebracht werden. Auch in *Drosophila*, Maus und einigen Pflanzen wurden Homologe des Importin α identifiziert (Smith et al., 1997; Torok et al., 1995; Tsuji et al., 1997). Allen Homologen und Isoformen gemein ist das Vorhandensein der IBB (Importin β binding)-Domäne am N-Terminus, von acht sogenannten „arm“-Motiven und einem stark sauren C-Terminus (Herold et al., 1998). Arm-Motive wurden bisher in vielen Proteinen gefunden, die Wechselwirkungen zu Proteinen vermitteln, z.B. in *Armadillo*-Plakoglobin und β -Catenin. Die IBB-Domäne ist der Teil des Proteins, der mit Importin β assoziiert (Görlich et al., 1996a). Deletion dieser Region inhibiert den Kerntransport. Neueste Studien ergaben, daß in der IBB-Domäne des Importin α eine interne NLS existiert, die mit der NLS-Bindungsstelle interagieren kann. Dieser „autoinhibitorische“ Effekt wird durch Importin β -Bindung und folgender Konformationsänderung aufgehoben. Es existiert eine Hypothese, daß Importin α cytosolische Aggregate bildet und diese durch NLS-Bindung aufgehoben werden (Conti und Kuriyan, 2000; Kobe, 1999; Percipalle et al., 1999). Importin α , das mit dem Substrat in den Kern gelangt ist, wird über Bindung des Exportfaktors Cse1p an den C-Terminus und Bindung von RanGTP wieder ins Cytoplasma transportiert (Hood und Silver, 1998; Kunzler und Hurt, 1998; Kutay et al., 1997a; Solsbacher et al., 1998). Nach Dissoziation dieses Komplexes steht Importin α für einen neuen Transportzyklus zur Verfügung.

Importin α -Proteine fungieren als Adapter zwischen Substrat und Transportrezeptor. Eigentlicher Transporter ist Importin β (Görlich et al., 1995). In Importin β wurden

verschiedene Bindungsdomänen für interagierende Proteine identifiziert (Chi et al., 1997). Es wurde gezeigt, daß Importin β direkt an Nucleoporine binden kann (Seedorf et al., 1999). Die Bindung an RanGTP erfolgt am N-Terminus des Proteins. Die beiden Domänen überlappen teilweise. Der C-Terminus von Importin β wechselwirkt mit Importin α .

Auf der nucleoplasmatischen Seite der Pore bindet die kleine GTPase Ran in GTP-gebundener Form an Importin β und verursacht die Dissoziation des Importkomplexes (Görlich et al., 1996b; Melchior et al., 1995; Moore und Blobel, 1993). Der Export von Importin β ist weitgehend unklar. Ein funktionelles Kernexportsignal (Nuclear Export Signal = NES) wurde bisher nur im Hefe-Importin β – Kap95p – gefunden (Iovine und Went, 1997). Der Export ist jedoch unabhängig von der GTPase Ran (Kose et al., 1999).

1.2.4. Der Import von Proteinen in den Zellkern durch Importin β -ähnliche Transportrezeptoren

Neben den „klassischen“ Kernlokalisierungssignalen existieren Signale, die sich durch Analyse der Aminosäuresequenz nicht als NLS identifizieren lassen. Trotzdem werden Substrate, die diese Signale tragen, in den Kern importiert. Es hat sich herausgestellt, daß ein großer Teil des Kernimports über direkte Wechselwirkung von Importin β -ähnlichen Rezeptoren mit diesen Importsubstraten abläuft. Auch Importin β kann allein, ohne die Hilfe von Importin α , den Transport in den Kern ermöglichen. U snRNPs und ribosomale Proteine werden neben anderen über diesen Weg transportiert (Moy und Silver, 1999; Palacios et al., 1997).

Zur Importin β -Familie gehören in Hefe 14 Proteine, acht wurden als Importer identifiziert, vier als Exporter. Die Funktion zweier Faktoren ist noch nicht bekannt. Im Säugern konnten bisher acht Proteine funktionell charakterisiert werden, die zur Importin β -Familie gehören. Eine Übersicht der Importin β -ähnlichen Faktoren von *S. cerevisiae*, die am Kernimport beteiligt sind, ist in Tabelle 1 dargestellt. Gemeinsame Eigenschaften aller Proteine der Importin β -Familie sind das N-terminale RanGTP-Bindungsmotiv, die Bindungsdomäne für Nucleoporine, eine Substrat-bindende Domäne, die ähnliche Größe (von 90 bis 130 kDa) und ein saurer isoelektrischer Punkt. Kristallstrukturanalysen von Importin β ergaben, daß diese Proteine α -helicale Strukturen und tandemförmige Wiederholungen von Motiven enthalten, die HEAT und Arm-Motiven ähneln (Chook und Blobel, 1999; Cingolani et al., 1999). Die meisten Importin β -ähnlichen Faktoren sind nicht essentiell in *S. cerevisiae*. Wahrscheinlich

existieren parallele Transportwege in der Zelle, so daß bei Wegfall eines Weges essentiellen Substraten ermöglicht wird über alternative Mechanismen in den Kern zu gelangen.

Tabelle 1: Übersicht der in *S. cerevisiae* identifizierten Kernimportrezeptoren

Importrezeptor (alternative Bezeichnung)	Funktion	Referenz
Imp β (Kap95p, Rsl1p)	zusammen mit Imp α (Kap60p) Import „klassischer NLS“	Enenkel et al., 1995; Shulga et al., 1996
Kap104p (Transportin)	Import von Nab2p, Hr1p (Nap4p) und mRNA-bindender Proteine	Aitchison et al., 1996
Kap108p (Sxm1p)	Import von Lhp1p und von ribosomalen Proteinen	Rosenblum et al., 1997
Kap111p (Mtr10p)	Import von Npl3p	Pemberton et al., 1997
Kap114p (HRC1004p)	Import von TATA-bindenden Proteinen	Pemberton et al., 1999
Kap119p (Nmd5p)	Import von HOG1, MAPK, TFIIS	Ferrigno et al., 1998
Kap121p (Pse1p)	Import ribosomaler Proteine und des Transkriptionsfaktors Pho4p	Rout et al., 1997; Schlenstedt et al., 1997; Seedorf und Silver, 1997
Kap123p (Yrb4p)	Import ribosomaler Proteine	Rout et al., 1997; Schlenstedt et al., 1997; Seedorf und Silver, 1997
Kap122p (Pdr6p)	Import von Toa1p und Toa2p	Titov und Blobel, 1999
Kap142p (Msn5p)	Import des ss-DNA bindenden Proteinkomplexes RPA	Yoshida und Blobel, 2001

1.2.5. Triebkraft des Kerntransports

Für den Kerntransport wird Energie benötigt, da Substrate entgegen ihres Konzentrationsgradienten akkumuliert werden (Shulga et al., 1996). Eine wichtige Rolle bei der Überwindung dieses Gradienten spielt die GTPase Ran (Moore, 1998). Entgegen früheren Meinungen, daß Energie für den Translokationsschritt durch die Kernpore benötigt wird, weiß man heute, daß die Hydrolyse von Ran für das „Recycling“ der Importfaktoren und die Assoziation und Dissoziation von Substrat-Importfaktor-Komplexen verantwortlich ist (Englmeier et al., 1999; Ribbeck et al., 1999). Ran, das in der Hefe zwei Homologe – Gsp1p und Gsp2p – besitzt, kann in GDP- und GTP-gebundener Form auftreten (Belhumeur et al., 1993). Für den Wechsel zwischen diesen beiden Stadien ist die Lokalisation der beiden Regulatoren RanGEF und RanGAP1 wichtig. Ran GEF (RanGTP Exchange Factor, Prp20p) ist chromatingebunden und ausschließlich im Kern lokalisiert (Bischoff und Ponstingl, 1991; Lee et al., 1993). Dort erfolgt der Übergang von RanGDP zu RanGTP durch Nucleotidaustausch. Die Geschwindigkeit dieser Reaktion ist ohne Katalysator sehr niedrig, läuft aber bei Anwesenheit von RanGEF 100 000-fach schneller ab. Die Umwandlung von RanGTP zu RanGDP wird von RanGAP1 (Ran GTPase-activating protein, Rna1p) katalysiert und findet im Cytoplasma statt (Corbett et al., 1995). Die GTPase-Aktivierung durch RanGAP1 wird durch RanBP1 (in Hefe Yrb1) stimuliert, das an den C-Terminus von RanGTP bindet und damit einen ungehinderten Zugang von RanGAP1 ermöglicht (Schlenstedt et al., 1995). Die räumliche Abtrennung des Nucleotidaustausches und der GTP-Hydrolyse verursacht einen GTP-Gradienten zwischen Kern und Cytosol, der Grundlage für Import und Export ist und als deren Triebkraft diskutiert wird. Die Bindung von RanGTP an den Importrezeptor im Kern induziert die Freisetzung des Importin α -Substrat-Dimers von Importin β bzw. die Freisetzung des Substrates vom Importin β -ähnlichen Faktor (siehe Abbildung 4). RanGTP wird zusammen mit dem Importfaktor aus dem Kern transportiert. Im Cytoplasma wird es vom Importfaktor entfernt und mit Hilfe von RanGAP zu RanGDP hydrolysiert. Die Aufrechterhaltung des RanGTP-Gradienten wird durch NTF2 (Nuclear Transport Factor 2) gewährleistet (Ribbeck et al., 1998). NTF2 importiert RanGDP in den Kern, wo wiederum Nucleotidaustausch mit Hilfe von RanGEF erfolgt (Floer et al., 1997).

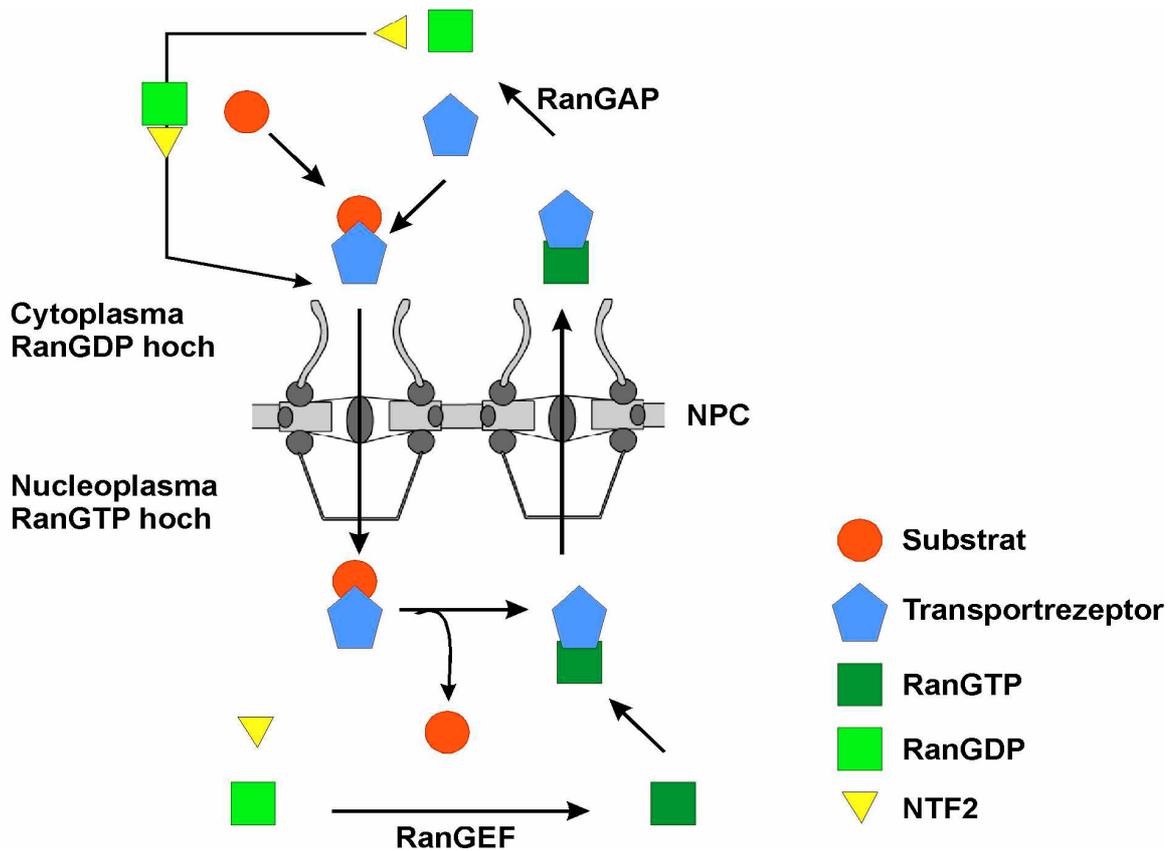


Abbildung 4: Import von Proteinen in den Zellkern. Transportrezeptor und Importsubstrat bilden bei geringer RanGTP-Konzentration im Cytoplasma einen Komplex. Der Komplex wird durch die Kernpore in das Nucleoplasma transportiert, wo RanGTP die Dissoziation des Importsubstrates vom Transportrezeptor induziert. Der Transportrezeptor wird im Komplex mit RanGTP in das Cytoplasma zurücktransportiert und steht für einen neuen Importvorgang zur Verfügung. RanGTP wird im Cytoplasma mit Hilfe von RanGAP zu RanGDP hydrolysiert. RanGDP wird durch NTF2 in den Kern importiert, wo RanGEF den Austausch von GDP gegen GTP katalysiert.

Der RanGTP-Gradient kann nicht allein Ursache des gerichteten Importes in den Kern sein, da nicht alle Substrate Ran benötigen, um in den Kern zu gelangen (Hetzler und Mattaj, 2000; Ribbeck et al., 1999; Sachdev et al., 2000; Takizawa et al., 1999). Die Bindung von Transportkomplexen an Nucleoporine allein reicht aus, um eine Bewegung durch die Kernpore zu ermöglichen (Kose et al., 1997). Rout et al. (2000) schlagen für den gerichteten Transport in der Pore ein Modell vor, in dem die Brownsche Molekularbewegung der cytosolischen Filamente der Kernpore als wichtige Kraft angesehen wird. Die Brownsche Bewegung verursacht eine Bewegung der Filamente. Sehr kleine Moleküle könnten durch diese beweglichen Strukturen hindurchschlüpfen. Große Moleküle werden vom Eintritt in die Pore abgehalten, es sei denn sie können durch Komplexbildung mit einem löslichen Transportrezeptor an die FG-Regionen der Nucleoporine binden, die sich in den cytosolischen Filamenten befinden (Rout et al., 2000). Der Komplex aus Substrat und Transportrezeptor könnte mit unterschiedlicher Affinität an verschiedene Kernporenproteine binden und das

Substrat durch die Kernpore befördern. Steigende Bindungsaffinitäten zu Nucleoporinen könnten der Grund für eine gerichtete Bewegung innerhalb der Pore sein (Ben-Efraim und Gerace, 2001). Der Einfluß von Motorproteinen, die den Transport ins ER oder in die Mitochondrien ermöglichen, konnte durch Reinigung und Identifizierung der Komponenten des Kernporenkomplexes ausgeschlossen werden (Rout et al., 2000).

Neueste Experimente mit Säugerzellen unterstützen ein Modell, daß das Zentralgranulum der Kernpore (central plug) eine wichtige Rolle im Rezeptor-vermittelten Transport spielt (Ribbeck und Görlich, 2001). Im Zentralgranulum findet man eine Konzentration von Phenylalanin-reichen Regionen (Bayliss et al., 1999). Möglicherweise entsteht durch hydrophobe Wechselwirkung der Phenylalanin-reichen Regionen untereinander eine siebartige Struktur, die den Durchtritt kleiner Moleküle erlaubt und den großer Moleküle verhindert. Transportrezeptoren könnten durch direkte Bindung an die hydrophoben Regionen in diese Struktur interkalieren und somit die Permeabilitätsbarriere weiter aufrechterhalten.

II Praktischer Teil

Charakterisierung des Nascent-polypeptide Associated Complex (NAC) der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*

1. Einleitung

1.1. Nascent-polypeptide Associated Complex (NAC) im Säuger

Säuger-NAC ist ein abundanter Proteinkomplex, der in Konzentrationen von 3 – 10 μM in verschiedensten Geweben zu finden ist (Möller et al., 1998a). Im Allgemeinen besteht er aus zwei Untereinheiten – einer α -Untereinheit von 33 kDa und einer β -Untereinheit von 21 kDa. Mit einem aus Rinderhirncytosol gereinigten Komplex konnte gezeigt werden, daß NAC einer der ersten Faktoren ist, die mit der entstehenden Peptidkette am Ribosom interagieren. NAC wurde mit der wachsenden Proteinkette schon ab einer Kettenlänge von 17 aa quervernetzt (Wang et al., 1995; Wiedmann et al., 1994). Es wurde vorgeschlagen, daß der Komplex das neu entstehende Protein vor vorzeitiger und inkorrektur Wechselwirkung mit cytosolischen Proteinen wie Chaperonen oder Proteasen schützt (Wang et al., 1995).

Nichttranslatierende Ribosomen besitzen eine Affinität zu ER-Membranen (Borgese et al., 1974; Rolleston, 1972). Es wurde postuliert, daß NAC die Bindung von translatierenden Ribosomen an das ER verhindert bis die Signalsequenz eines sekretorischen Substrates das Ribosom verläßt. Besitzt das entstehende Protein keine Signalsequenz, verhindert NAC die Bindung des Komplexes aus Ribosom und naszierender Kette (Ribosome Nascent Chain Complex = RNC) solange bis die Translation des Proteins beendet ist und es vom Ribosom abfällt. Bei Proteinen, die eine Signalsequenz enthalten, interagiert NAC mit der naszierenden Kette bis die Signalsequenz vollständig exponiert ist, SRP an die Signalsequenz binden kann und dann das Ribosom an die ER-Membran leitet. Wird NAC von translatierenden Ribosomen durch Hochsalzbehandlung entfernt, erfolgt eine Fehlleitung signalsequenzloser Proteine an die Membran und zu einem Teil auch eine Fehltranslokation in das Lumen des ER. Dieses Phänomen wurde dadurch erklärt, daß bei Fehlen von NAC, SRP auch an Proteine ohne Signalsequenz binden kann bzw. Ribosomen aufgrund ihrer Eigenaffinität an die Membranen gelangen. Laurig et al. (1995a) stellten die Hypothese auf, daß NAC und SRP um eine sogenannte M-site (Membrane attachment site) am Ribosom konkurrieren. NAC okkupiert diese Stelle am Ribosom, bis eine Verdrängung durch SRP erfolgt. Der SRP-Rezeptor in der ER-Membran bewirkt die Ablösung des SRP vom RNC, das Ribosom kann

an die Membran binden und die Translokation des Substrates durch den Sec61-Kanal beginnen.

Diese Theorie ist umstritten, da mit anderen *in vitro*-Systemen andere Ergebnisse erzielt wurden. Neuhof et al. (1998) und Raden und Gilmore (1998) konnten die NAC-abhängige Hemmung der Ribosomenbindung an Membranen, die durch Puromycinbehandlung von Ribosomen befreit wurden, nicht reproduzieren. Möller et al (1998a) wiesen nach, daß in diesen Experimenten jedoch Konzentrationen eingesetzt wurden, die nicht dem hohen physiologischen Niveau entsprechen (Beatrix et al., 2000; Möller et al., 1998a). Alle diese Aussagen wurden durch Anwendung heterologer *in vitro*-Systeme erzielt, in denen mit Hilfe von Weizenkeimcytosol oder Kaninchenreticulocytenlysate radioaktiv markierte Proteine translatiert und in Hundepankreas-mikrosomen transportiert wurden.

Neben der ribosomenassoziierten Funktion des Komplexes wurden den einzelnen NAC-Proteinen in Säugern weitere Aufgaben zugeschrieben. So wurde gezeigt, daß α NAC an Nucleinsäuren binden kann und somit möglicherweise an der Regulation der Transkription beteiligt ist. *In vitro*-Studien mit rekombinanten Proteinen ergaben, daß α NAC die Aktivität des homodimeren c-jun-Aktivators erhöht (Moreau et al., 1998). In skelettalem Muskelgewebe wurde eine 220 kDa Isoform des α NAC (skNAC) gefunden, die durch alternatives Splicing entsteht (Munz et al., 1999; Yotov und St-Arnaud, 1996). skNAC wird als DNA-bindender Faktor in Myotuben, Oestoblasten und Zellen, die mit der Wundheilung in Verbindung stehen, gefunden. Die DNA-Bindung wurde durch Gelshift-Experimente nachgewiesen. Auch die β -Untereinheit des humanen NAC ist unter dem Namen BTF3 als Transkriptionsfaktor bekannt (Zheng et al., 1987). Das Protein soll mit RNA-Polymerase II einen festen Komplex bilden. Einer transkriptionsinaktiven Form von BTF3 - BTF3b - fehlen 44 aa des BTF3. Die kurze Form wird mit der Funktion am Ribosom in Verbindung gebracht (Zheng et al., 1990).

In allen untersuchten Eukaryonten wurden Homologe beider Untereinheiten des Säuger-NAC gefunden (BLAST-Suchen NCBI und TIGR). Darüber hinaus existiert in *Archae*-Bakterien ein Protein, das signifikante Homologien zu α NAC aufweist (Mitteilung E. Hartmann).

Eine Deletion des β NAC-Homologen in der Maus führt zum frühen Sterben von Embryonen (Deng und Behringer, 1995). Das Vorkommen unterschiedlicher Isoformen der β -Untereinheit des NAC scheint typisch für höhere Organismen zu sein. In *D. melanogaster* wurden vier Sequenzhomologe gefunden. Eine Mutation in einem der β NAC-Gene verursacht

den sogenannten *bicaudal*-Phänotyp, den Spiegelbild-Verdopplungen entlang der anterior/posterior-Achse charakterisieren (Markesich et al., 2000).

1.2. Nascent-polypeptide Associated Complex in der Hefe *S. cerevisiae*

Ein Vergleich der Primärstrukturen des humanen β NAC und des zu ihm homologen Proteins Egd1p aus *S. cerevisiae* ergab, daß 38 % der Aminosäuren beider Proteine identisch sind und 53 % der Aminosäuren ähnliche chemische Eigenschaften besitzen. Der N-Terminus von Egd1p weist 60 % Identität zum humanen Homologen BTF3 auf. Egd1p wurde durch Parthun et al. (1992) als Faktor identifiziert, der an der Bindung von Gal4p an DNA beteiligt sein soll. Diese Arbeiten beruhen auf *in vitro*-Bindungsstudien an DNA. Egd1p stabilisierte die Bindung des Transkriptionsaktivators Gal4p an eine DNA-Affinitätssäule (Parthun et al., 1992). Hu und Ronne (1994) konnten ein weiteres β NAC-Homologes klonieren, das 90 % Übereinstimmung mit Egd1p zeigt. Das zweite β -Homologe (Btt1p) ist möglicherweise durch Genduplikation entstanden. Auch hier wurde eine Rolle in der Regulation der Expression von *GAL*-Genen diskutiert. Beide Gene wurden deletiert, ein Wachstumsphänotyp konnte nicht festgestellt werden. Egd2p ist das *S. cerevisiae*-Homologe des α NAC. Die Primärstruktur ist zu 42 % identisch und 67 % ähnlich zu der des α NAC. Egd2p wurde im Komplex mit Egd1p aufgereinigt und ist nicht essentiell (Shi et al., 1995). Einen Sequenzvergleich der NAC-Proteine einiger Organismen sowie der beiden β -Untereinheiten (Egd1p und Btt1p) aus *S. cerevisiae* zeigt Abbildung 5.

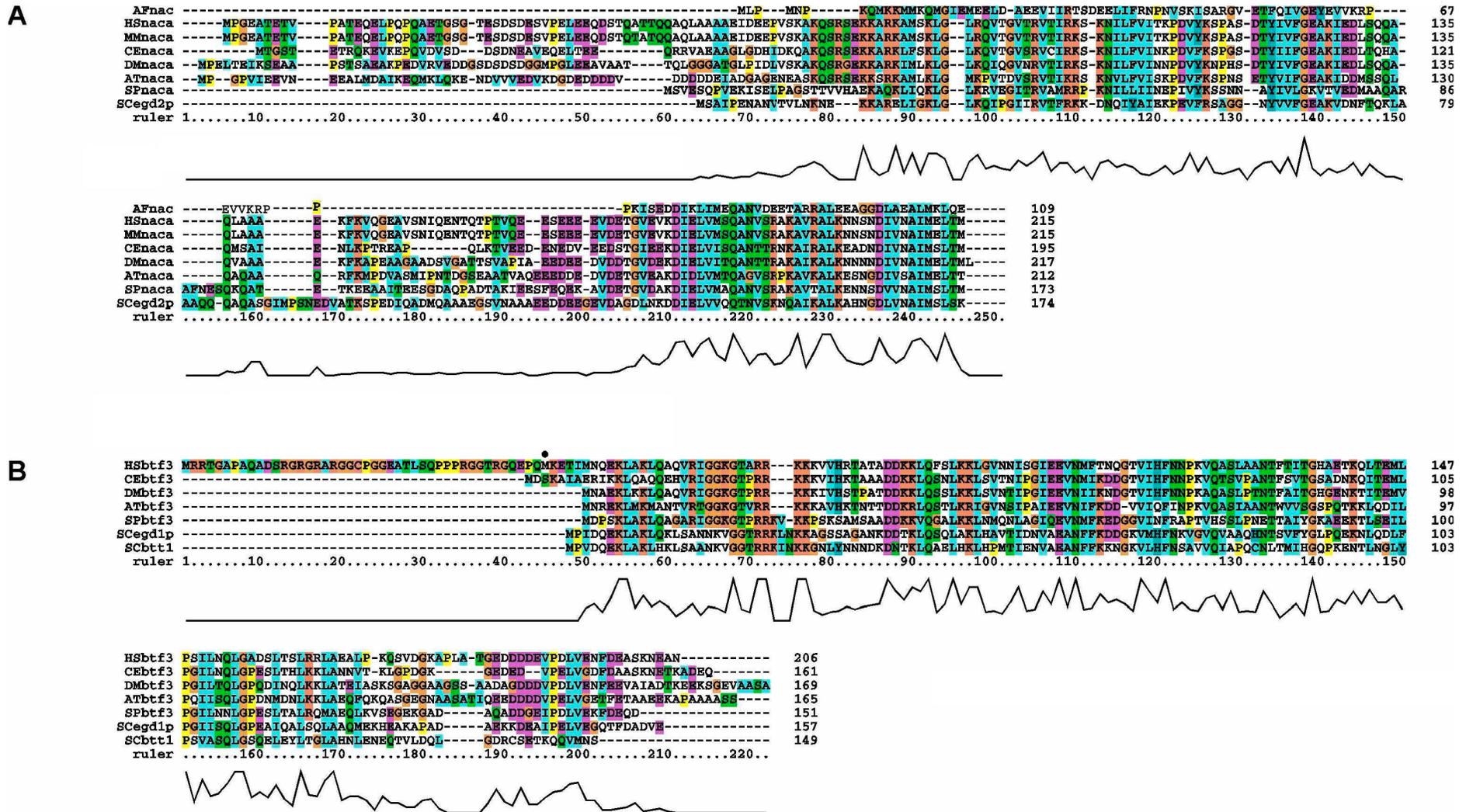


Abbildung 5: Multipler Sequenzvergleich ausgewählter α NAC (A)- und β NAC-Untereinheit(en) (B) aus *Archaeoglobus fulgidus* (AF), Mensch (HS), Maus (MM), *Caenorhabditis elegans* (CE), *Drosophila melanogaster* (DM), *Arabidopsis thaliana* (AT), *Saccharomyces pombe* (SP) und *Saccharomyces cerevisiae* (SC).

Der Punkt über der Sequenz des humanen BTF3 markiert das Start-Codon des kürzeren, transkriptionsinaktiven BTF3b.

Da kein β NAC-Homologes in *A. fulgidus* existiert, ist der Organismus in B nicht vertreten. Abbildung B zeigt auch den Sequenzvergleich der beiden *S. cerevisiae*- β NAC-Homologe Egd1p und Btt1p untereinander. Die Anordnung der Aminosäuresequenzen erfolgte mit Hilfe des ClustalX-Algorithmus (Thompson et al., 1994). Aminosäuren mit ähnlichen chemischen Eigenschaften sind in gleicher Farbe markiert. Der Grad der Übereinstimmung ist als Kurve unter den Sequenzen dargestellt.

2. Zielsetzung

Wiedmann et al. isolierten aus Rinderhirn einen Proteinkomplex, der mit translatierenden Ribosomen assoziiert ist und eine Rolle in der Regulation des cotranslationalen Proteintransportes spielt. Dieser als NAC (Nascent-polypeptide Associated Complex) bezeichnete Komplex besteht aus zwei Untereinheiten, die zuvor von anderen Arbeitsgruppen als Transkriptionsfaktoren beschrieben wurden. Die Hefe *S. cerevisiae* besitzt Homologe zu den NAC-Untereinheiten, die ebenfalls in Zusammenhang mit transkriptionellen Prozessen gebracht wurden. Die vorliegende Arbeit soll Diskrepanzen zwischen den unterschiedlichen Interpretationen der Ergebnisse zur Funktion des NAC verkleinern.

Die Untersuchung der NAC-Untereinheiten in *S. cerevisiae* bot den Vorteil der Kombination eines gut manipulierbaren, eukaryontischen genetischen Systems und biochemischer Experimente, die auf homologen Komponenten basieren.

Mit Hilfe von genomischen Deletionsmutanten sollte eine biochemische Charakterisierung der NAC-Proteine erfolgen. Eine Aufgabe bestand darin, die Komplexbildung der möglichen Partner und ihre Ribosomenassoziation zu untersuchen. Die Fähigkeit der Interaktion der Proteine mit der naszierenden Polypeptidkette sollte mittels Quervernetzungsexperimenten überprüft werden. Ein homologes *in vitro*-System aus translatierenden Ribosomen und Mikrosomen aus *S. cerevisiae* sollte zu Membranbindungsstudien etabliert werden.

Da eine Transkriptionsaktivität der NAC-Proteine einen aktiven Transport in den Zellkern voraussetzt, sollte die Fähigkeit der Proteine, in den Zellkern zu gelangen, untersucht werden. Fusionen der NAC-Proteine mit GFP sollten die Lokalisation des Komplexes bzw. einzelner Proteine in lebenden Zellen ermöglichen und Rückschlüsse auf die Funktion des NAC geben.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Chemikalien, Kits und Enzyme wurden von Sigma-Aldrich, Amersham Pharmacia Biotech, Roche Molecular Biochemicals, Promega, Biorad und Calbiochem bezogen.

3.1.1. Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Verwendung und Herkunft
TOP10	F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) f80lacZ Δ M15 Δ lacX74 deo ^R recA1 ara Δ 139 Δ (ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG	Klonierung Invitrogen
SURE2	e14-(McrA-) (mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ	Klonierung Stratagene
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F'proAB lacI q Z M15 Tn 10 (Tet r)]	Klonierung Stratagene
M15(Rep4)	Nal ^S Str ^S rif ^S lac ⁻ ara ⁻ gal ⁻ mtl ⁻ F ⁻ recA ⁺ uvr [pREP4(kanamycin ^R)]	Expression Qiagen
BL21	B F- dcm ompT hsd ^S (r B- m B-)gal	Expression Stratagene

3.1.2. Hefestämme

Stamm	Genotyp	Herkunft
W303-1A	<i>MATa ade2 his3-11,15 leu2-3,113 trp1-1 ura3-1</i>	Rothstein
yJF13	<i>MATa ade2 Δade3 his3-11,15 leu2-3, 113, trp1-1 ura3-1</i>	diese Arbeit
yJF14	<i>MATa btt1::HIS3 ade2 Δade3 leu2-3, 113, trp1-1, ura3-1</i>	diese Arbeit
469	<i>MATa btt1::HIS3 ade2 leu2-3, 113, trp1-1, ura3-1</i>	H. Ronne
Δ btt1	<i>MATa btt1::HIS3 ade2 Δade3 leu2-3, 113, trp1-1, ura3-1</i>	H. Ronne
Δ egd1	<i>MATa Δegd1 ade2 Δade3 leu2-3, 113 trp1-1 ura3-1</i>	diese Arbeit
Δ egd2	<i>MATa Δegd2 ade2 Δade3 leu2-3, 113 trp1-1 ura3-1</i>	diese Arbeit
Δ egd2 Δ btt1	<i>MATa Δegd2 btt1::HIS3 ade2 Δade3 leu2-3, 113 trp1-1 ura3-1</i>	diese Arbeit

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>Δegd1Δbtt1</i>	<i>MATa Δegd1 btt1::HIS3 ade2 Δade3 leu2-3, 113 trp1-1 ura3-1</i>	diese Arbeit
<i>Δegd1Δegd2Δbtt1</i>	<i>MATa Δegd2 Δegd1 btt1::HIS3 ade2 Δade3 leu2-3, 113 trp1-1 ura3-1</i>	diese Arbeit
<i>Δegd1Δegd2</i>	<i>MATa Δegd1 Δegd2 ade2 Δade3 leu2-3, 113 trp1-1, ura3-1</i>	diese Arbeit
<i>Δkap123</i>	<i>MATa kap123::HIS3 ura3-52 leu2Δ1 his 3Δ200 trp1</i>	P. Silver
<i>pse1-1</i>	<i>MATα pse1-1 ura3-52 leu2Δ1 trp1Δ63</i>	P. Silver
<i>srp1-31</i>	<i>MATα srp1-31 ura3 leu2 trp1 his3 ade2</i>	M. Nomura
<i>srp1-49</i>	<i>MATα srp1-49 ura3 leu2 trp1 his 3 ade2</i>	M. Nomura

3.1.3. Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pGEMT	Vektor für direkte Klonierung von PCR-Produkten	Promega
pRS414	ARS-CEN-Vektor, TRP1-Auxotrophiemarker	Stratagene
pRS415	ARS-CEN-Vektor, LEU2-Auxotrophiemarker	Stratagene
pRS426	2μ-Vektor, <i>URA3</i> -Auxotrophiemarker	Stratagene
p2UG	2μ-Vektor für die Überexpression in Hefe, <i>URA3</i> -Marker, GRE-Promotorelement reguliert durch ADH-Glucocorticoidrezeptor	K. Yamamoto
pN797	ARS-CEN-Vektor, LEU2-Marker, exprimiert den Glucocorticoidrezeptor unter Kontrolle des ADH-Promotors	K. Yamamoto
pQE30	Überexpressionsvektor mit N-terminalem 6xHis-tag	Qiagen
pRS414-2GFP	GFP- <i>KpnI</i> -GFP über <i>SacI/NotI</i> in pRS414 kloniert	U. Lenk
pMPY-3xHA	Ausgangsvektor für PCR-basierte Herstellung von genomischen Deletionsmutanten in <i>S. cerevisiae</i>	B. Schneider
pRS426-CUP	CUP-Promotor über <i>KpnI/EcoRI</i> in pRS426 kloniert	E. Jarosch
pJF17	<i>EGD2</i> und <i>EGD2</i> -Promotor über <i>BamHI/SalI</i> in pRS 415 kloniert	diese Arbeit

Plasmid	Beschreibung	Herkunft
pJF19	<i>EGD1</i> und <i>EGD1</i> -Promotor über <i>Bam</i> HI/ <i>Sa</i> II in pRS 415 kloniert	diese Arbeit
ΔN11-EGD1/EGD2	ΔN11- <i>EGD1</i> und <i>EGD1</i> -Promotor durch <i>Cl</i> aI miteinander verknüpft über <i>Sac</i> II/ <i>Eco</i> RI in pRS414-2GFP kloniert	diese Arbeit
ΔN14-EGD1/EGD2	ΔN14- <i>EGD1</i> und <i>EGD1</i> -Promotor durch <i>Cl</i> aI miteinander verknüpft über <i>Sac</i> II/ <i>Eco</i> RI in pRS414-2GFP kloniert	diese Arbeit
ΔN44-EGD1/EGD2	ΔN44- <i>EGD1</i> und <i>EGD1</i> -Promotor durch <i>Cl</i> aI miteinander verknüpft über <i>Sac</i> II/ <i>Eco</i> RI in pRS414-2GFP kloniert	diese Arbeit
EGD1-2GFP	<i>EGD1</i> und <i>EGD1</i> -Promotor über <i>Sac</i> II/ <i>Eco</i> RI in pRS414-2GFP kloniert	diese Arbeit
ΔN11-EGD1-2GFP	ΔN11- <i>EGD1</i> und <i>EGD1</i> -Promotor aus ΔN11-EGD1/EGD2 über <i>Sac</i> II/ <i>Eco</i> RI in pRS414-2GFP kloniert	diese Arbeit
ΔN14-EGD1-2GFP	ΔN14- <i>EGD1</i> und <i>EGD1</i> -Promotor aus ΔN14-EGD1/EGD2 über <i>Sac</i> II/ <i>Eco</i> RI in pRS414-2GFP kloniert	diese Arbeit
ΔN27-EGD1-2GFP	ΔN27- <i>EGD1</i> und <i>EGD1</i> -Promotor aus ΔN27-EGD1/EGD2 über <i>Sac</i> II/ <i>Eco</i> RI in pRS414-2GFP kloniert	diese Arbeit
ΔN44-EGD1-2GFP	ΔN44- <i>EGD1</i> und <i>EGD1</i> -Promotor aus ΔN44-EGD1/EGD2 über <i>Sac</i> II/ <i>Eco</i> RI in pRS414-2GFP kloniert	diese Arbeit
EGD2-2GFP	<i>EGD2</i> und <i>EGD2</i> -Promotor über <i>Sac</i> II/ <i>Eco</i> RI in pRS414-2GFP kloniert	diese Arbeit
pQE30-EGD1	<i>EGD1</i> über <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III in pQE30 kloniert	diese Arbeit
pQE30-EGD2	<i>EGD2</i> über <i>Bam</i> HI/ <i>Hind</i> III in pQE30 kloniert	diese Arbeit
p2UG-BTT1	<i>BTT1</i> über <i>Bam</i> HI/ <i>Sac</i> I in p2UG kloniert	diese Arbeit
pRS426-CUP-EGD1	<i>EGD1</i> über <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI in pRS426-CUP kloniert	diese Arbeit
pRS426-CUP-EGD2	<i>EGD2</i> über <i>Bam</i> HI/ <i>Eco</i> RI in pRS426-CUP kloniert	diese Arbeit
pGEM SP6-WT-Invertase	WT-Invertase (PCR-Produkt) hinter SP6-Promotor in pGEMT kloniert	diese Arbeit
pGEM SP6-Δss-Invertase	Δss-Invertase (PCR-Produkt) hinter SP6-Promotor in pGEMT kloniert	diese Arbeit
pGEM SP6-CAT	CAT (PCR-Produkt) hinter SP6-Promotor in pGEMT kloniert	diese Arbeit

3.1.4. Oligonucleotide

Oligonucleotide wurden von der Firma BioTez, Berlin synthetisiert.

Für die Herstellung der Deletionsmutanten verwendete Oligonucleotide wurden im HPLC-gereinigten Zustand eingesetzt. Für Klonierungen wurden die gewünschten Restriktionsstellen am 5'-Ende der jeweiligen Oligonucleotide eingefügt (siehe Informationen zu den hergestellten Konstrukten unter I.3.1.3).

Die Sequenzierungen wurden mit fluoreszenzmarkierten Primern der Firma MWG durchgeführt.

3.1.5. Antikörper

Der Kaninchen-Antikörper gegen GFP wurde von der Firma Molecular Probes bezogen und für Western Blots 1:5000 verdünnt eingesetzt.

Für die Detektion His-getaggtter Proteine mittels Western Blot-Analyse wurde der Maus-Antikörper gegen 5xHis der Firma Qiagen in einer Verdünnung von 1:1000 verwendet.

Für Western Blots und Immunpräzipitationen gegen Egd2p wurde humanes α NAC-Antiserum verwendet, welches mit Egd2p kreuzreagiert. Die optimale Verdünnung für Western Blots betrug 1:1000 (in PBS).

Die Antiseren gegen Egd1p, Btt1p und Egd2p wurden freundlicherweise von Dr. M. Wiedmann (MSKCC, New York) bereitgestellt.

Der anti-Egd1p- und anti-Btt1p-Antikörper wurden affinitätschromatographisch aus Kaninchen-Antiserum aufgereinigt und in einer Verdünnung von 1:5000 (in PBS) für Western Blot-Analysen eingesetzt. Die Affinitätsreinigung der Antikörper wurde von Angelika Wittstruck (MDC, Berlin) durchgeführt. Die Peptidsequenzen gegen die die Antikörper gerichtet wurden, sind nachfolgend aufgezeigt und befinden sich am C-terminalen Ende der Proteine.

Antikörper	Peptid
α Egd1p	ELVEGQTFDADVE
α Egd2p	RALKKNSNDIVNAIMELTM
α Btt1p	NEQTVLDQLGDRCSSET

3.2. Methoden

3.2.1. Allgemeines

Molekularbiologische Methoden wurden nach Sambrook et al., 1987 durchgeführt (Sambrook et al., 1987). Als Grundlage für hefegenetische Experimente dienten die Protokolle aus Guthrie und Fink, 1991 (Guthrie und Fink, 1991).

Die Sequenzierung von Konstrukten übernahm freundlicherweise E. Bürger (Charité Berlin).

3.2.2. Anzucht von Zellen

E. coli

LB-Medium	1 % Bacto-Trypton 0,5 % Hefeextrakt 0,5 % NaCl
-----------	--

E. coli-Zellen wurden im Allgemeinen in LB-Medium bei 37°C angezogen. Bei Amplifikation von Plasmiden wurden entsprechende Antibiotika (100 µg/ml Ampicillin, 50 µg/ml Kanamycin) dazugegeben. Für das Wachstum auf Festmedium wurde LB plus 2 % Agar verwendet. Stocks von *E. coli* Stämmen wurden in 15 % Glycerol angelegt und bei -80°C gelagert.

S. cerevisiae

YPD-Medium	2 % Bacto-Pepton 1 % Hefeextrakt 2 % Glucose
SD-Medium	0,67 % Yeast Nitrogen Base 2 % Glucose
Aminosäuremix/l Medium	0,5 g Adenin 2 g Histidin 10g Leucin 2 g Lysin 2 g Tryptophan 2 g Uracil

Feste Medien enthielten zusätzlich 2 % Agar. Plasmidhaltige Hefezellen wurde entsprechend der gewünschten Selektion auf SD-Medium plus jeweiligem Aminosäuremix angezogen. Abhängig von dem genutzten Auxotrophiemarker wurde ein Aminosäuremix verwendet, dem die entsprechende Aminosäure fehlte.

Auf den Verlust des Uracil-Markergens wurde mit Hilfe von 5-Fluororotsäure (5-FoA) in einer Konzentration von 0,1 % im Festmedium selektioniert (Boeke et al., 1987).

In der Regel wurden die Hefen bei 30° C angezogen. Temperatursensitive Stämme wuchsen bei 25° C. Stocks wurden in entsprechendem Medium und 15 % Glycerol angelegt und bei -80°C gelagert.

HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden bei 90 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO₂-Gehalt und 37° C adhären angezogen. Als Medium diente DMEM mit 1 g/l Glucosegehalt, 10 % FCS und Penicillin/Streptomycin. Zur Vermehrung wurden die Gewebezellen Trypsin/EDTA abgelöst, mit frischem Medium verdünnt und neu ausgesät.

3.2.3. Transformation von *E. coli*

E. coli Zellen wurden durch Elektroporation transformiert. Zur Herstellung elektrokompenter Zellen wurde eine 1 l Kultur in LB-Medium bis zu einer OD = 0,5 bei 37°C angezogen. Die Zellen wurden durch 10 minütige bei 3000 g Zentrifugation bei 4°C sedimentiert. Das Pellet wurde in 1 l kaltem destilliertem Wasser gewaschen. Nach nochmaliger Zentrifugation wurden die Zellen in 20 ml kaltem 10 %-igen Glycerol gewaschen, zentrifugiert und abschließend in 2 – 3 ml 10 %-igem Glycerol aufgenommen. 50 µl Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –80°C gelagert.

Die Elektroporation erfolgte bei 2,5 kV, 25 mF und 200 Ω. Ligationsansätze wurden vorab mittels Dialyse oder über Affinitätssäulen entsalzt. Nach 45 min leichtem Schütteln bei 37°C in LB/20 mM Glucose wurden die Zellen auf LB-Platten, welche entsprechende Antibiotika-Zusätze enthielten, ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37° C über Nacht.

3.2.4. Transformation von *S. cerevisiae*

2 ml einer YPD-Kultur wurden bei entsprechender Temperatur über Nacht angezogen. Eine 20 ml Kultur wurde mit einer OD₆₀₀ von 0,2 bis 0,4 angeimpft und ein bis zwei Verdopplungszeiten inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 3000 g für 2 min sedimentiert und einmal mit sterilem Wasser gewaschen. Anschließend wurden sie in 10 ml pro OD₆₀₀ frischem 0,1 M LiOAc/TE aufgenommen. 2 µl denaturierte Heringssperma-DNA (10 mg/ml) und ca. 2 µg Plasmid-DNA oder 20 µl PCR-Ansatz wurden dazugegeben. Zellen und DNA werden mit 500 µl 40 %-igem PEG 3000/0,1 M LiOAc/TE gemischt, bei permissiver Temperatur inkubiert und anschließend einem 15-minütigen Hitzeschock bei 42° C ausgesetzt. Die Zellen wurden dann sedimentiert und in 500 µl Medium aufgenommen. 100 bis 200 µl Suspension werden auf entsprechende Selektionsplatten ausplattiert und bei gewünschter Temperatur 2 bis 5 Tage inkubiert.

3.2.5. Herstellung von genomischen Deletionsmutanten in *S. cerevisiae*

Grundlage für die Herstellung der NAC-Deletionsmutanten war die Methode nach Schneider et al. (1996). Es wurde das Plasmid pMPY-3xHA verwendet. Dieses Konstrukt enthält die Sequenz des Auxotrophiemarkers *URA3*, 5' und 3' flankiert von HA-tags. *URA3* wurde durch PCR amplifiziert. Die verwendeten Primer enthielten downstream zur Plasmidsequenz 55 bp des 5' bzw. 3'-„Zielbereiches“ des Hefegenoms. Die Primer wurden so ausgewählt, daß die gesamte codierende Sequenz der Zielgene und ein großer Teil des Promotors eingeschlossen wurde. Die PCR-Produkte mit einer Größe von ca. 1000 bp wurden ohne Aufreinigung in haploide Hefezellen transformiert, die Uracil-auxotroph waren. Diese Ausgangsstämme waren ein Derivat des Wildtypstammes W303-1A (yJF13) bzw. der *BTT1*-Deletionsmutante (yJF14), die von H. Ronne zur Verfügung gestellt wurde.

Durch Rekombination der komplementären Bereiche wurde der Auxotrophiemarker *URA3* ins Genom integriert und die gewünschte Region deletiert. Die Deletionen wurden über PCR mit Primern, die im *URA3*-Gen und außerhalb des deletierten genomischen Bereiches lagen, verifiziert. Durch Wachstum auf 5-FoA (Boeke et al., 1987) war es möglich, den *URA3*-Marker wieder aus dem Genom zu rekombinieren und im Falle der NAC-Dreifachdeletionsmutante und der Doppelmutanten mit Hilfe dieser Methode mehrere Gene nacheinander zu deletieren.

3.2.6. Klonierung von GFP-Fusionsplasmiden

Ein Fragment, welches die codierende Region von *EGD1* bzw. *EGD2* sowie 500 bp upstream vom ATG (Promotorregion) enthielt, wurde durch PCR aus genomischer Hefe-DNA mit Primerpaarungen, die in am 5'-Ende die Restriktionsschnittstellen *SacII* (forward) und *EcoRI* (reverse) für die Ligation in pRS414-2GFP besaßen, amplifiziert. Die PCR-Fragmente wurden über *SacII/EcoRI* in pRS414-2GFP kloniert, so daß eine C-terminale Fusion von Doppel-GFP entstand. pRS414-2GFP wurde von

U. Lenk (Berlin) zur Verfügung gestellt. Der Vektor enthält zwei Kopien eines für Hefeexpression modifizierten GFP (Cormack et al., 1997).

Für die Herstellung der *EGD1*-Verkürzungen wurde zunächst die Promotorregion und die verkürzte codierende Region einzeln aus genomischer DNA amplifiziert und mit Hilfe der in die Primer eingefügten Restriktionsschnittstelle *Cl*I in pGEMT aneinanderligiert. Die Fragmente aus Promotor- und codierender Region wurden dann mittels *Sac*II und *Eco*RI herausgeschnitten und in pJF17 sowie pRS414-2GFP kloniert. pJF17 entstand, in dem *EGD2* und der endogene Promotor über *Bam*HI/*Sa*II in pRS415 gebracht wurden. Das neue Start-Codon wurde durch den verwendeten 5'-Primer eingeführt.

Die Verwendung von endogenen Promotoren und ARS-CEN-Plasmiden stellte sicher, daß die Proteine in physiologischer Konzentration exprimiert wurden. Die Expression aller Fusionsproteine wurde nach SDS/PAGE durch Western Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen GFP (Molecular Probes) und Egd1p verifiziert.

3.2.7. Überexpression von Proteinen in *S. cerevisiae*

BTT1 wurde über die Restriktionsschnittstellen *Bam*HI/*Sa*CI in den Überexpressionsvektor p2UG kloniert, um das Genprodukt Btt1p in Hefe überzuexprimieren. p2UG enthält mehrere GRE-Motive (Glucocorticoid Response Elements) (Picard et al., 1990). Die Expression von Btt1p wurde durch Zugabe des Glucocorticoidhormons Desoxycorticosteron bei Anwesenheit des Säuger-Glucocorticoidrezeptors ca. 50-fach erhöht. Der Glucocorticoidrezeptor wurde unter Kontrolle des ADH-Promotors exprimiert (Cotransformation mit pN797). Die Expression erfolgte 2 h und wurde durch Zugabe von Desoxycorticosteron in einer Endkonzentration von 10 µM induziert.

Für die Überexpression von Egd1p bzw. Egd2p wurden 2µ-Plasmide verwendet, die einen Kupfer-induzierbaren Promotor (CUP-Promotor) enthielten. *EGD1* und *EGD2* wurden jeweils über *Bam*HI/*Eco*RI in pRS426-CUP kloniert. Die Expression erfolgte 4 h und wurde durch Zugabe von CuSO₄ in einer Endkonzentration von 10 µM induziert.

3.2.8. Überexpression von His-Egd1p und His-Egd2p in *E. coli*

Die codierenden Regionen von *EGD1* und *EGD2* wurden durch PCR amplifiziert. Sie wurden über die Restriktionsstellen *Bam*HI und *Hind*III in den pQE30 Vektor (Qiagen) kloniert, so daß eine N-terminale Fusion von 6xHis zu Egd1p bzw. Egd2p entstand. Die Überexpressionskonstrukte wurden jeweils in M15(Rep4) transformiert.

1 l *E. coli*-Kultur wurde bis zu einer OD₆₀₀ = 0,5 bei 37° C auf LB plus Ampicillin angezogen.

Die Expression der His-getaggten Proteine wurde durch Zugabe von 1mM IPTG induziert und erfolgte für 4 h bei 25°C.

Die Aufreinigung von His-Egd2p fand unter nativen Bedingungen statt. Das Zellpellet wurde in 100 mM Natriumphosphatpuffer, pH 7,8, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF, PI resuspendiert und durch Einfrieren/Auftauen sowie Ultraschallbehandlung lysiert. Das Lysat wurde für 30 min bei 10 000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine äquilibrierte Ni-NTA-Agarose-Säule gegeben. Nach Waschen der Säule wurde das rekombinante Protein durch 50 mM HEPES pH 3,5 eluiert und sofort neutralisiert.

His-Egd1p wurde unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt, da es zu einem großen Teil unlöslich war. Das Zellpellet wurde in diesem Fall in 100 mM Natriumphosphat, pH 8,0, 8 M Harnstoff aufgenommen. Das an die Ni-NTA-Agarose-Säule gebundene Protein wurde an der Säule durch einen Gradienten von 8 M bis 0 M Harnstoff in Natriumphosphat, pH 8,0, renaturiert. Die Elution erfolgte wie oben beschrieben.

3.2.9. Wachstumskurven

Die Zellen wurden über Nacht bei 30°C angezogen und anschließend auf eine OD₆₀₀ von 0,03 verdünnt. Das weitere Wachstum fand bei 23° C, 30° C oder 37° C über einen Zeitraum von 20 h statt. Bei Erreichen einer OD von 2,0 wurden die Zellen mit frischem Medium auf eine OD von 0,3 verdünnt. Die Verdopplungszeiten wurden aus der Zunahme der OD₆₀₀ kalkuliert. Aus jeweils drei Wachstumskurven wurde der Durchschnittswert ermittelt.

3.2.10. Zellfraktionierung von *S. cerevisiae*

Zellen wurden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bis 0,7 angezogen und durch Zentrifugation von 10 min bei 3000 g geerntet. Das Zellpelett wurde mit ½/YP/1,1 M Sorbitol gewaschen. Es erfolgte dann eine Sphäroblastierung durch 1 mg Zymolyase pro g Feuchtgewicht. Die Sphäroblasten wurden in 50 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM DTT, 1 mM PMSF plus Proteaseinhibitor (PI) (Sigma) mittels eines Braun-Homogenisators aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossene Zellen, Zellwände und Kerne wurden durch einen 15-minütigen Zentrifugationsschritt mit 2000 g entfernt. Mitochondrien wurden sedimentiert, indem für 15 min bei 10 000 g zentrifugiert wurde. Rauhe Membranen wurden bei 40 000 g für 30 min sedimentiert. Die Membranen wurden entweder direkt in SDS/PAGE-Probenpuffer aufgenommen oder in oben genanntem Puffer resuspendiert und nachfolgend für die Immunpräzipitation verwendet. Durch 30-minütige Zentrifugation bei 100 000 g wurden freie Ribosomen gewonnen, die ebenfalls entweder direkt in Probenpuffer oder für die Immunpräzipitation verwendet wurden. Der verbleibende Überstand - das Cytosol - wurde ebenso behandelt. Für die SDS/PAGE-Analyse und für Immunpräzipitationen wurden gleiche Mengen an rauen Membranen, Ribosomen und Cytosol verwendet.

3.2.11. Gelfiltration

NAC wurde wie oben beschrieben durch Hochsalzbehandlung von den Ribosomen gelöst und von diesen durch Ultrazentrifugation (20 min, 100 000 g) getrennt. Im Falle von *Aegd1pΔbtt1* und *Aegd1* wurde das Cytosol direkt verwendet. 200 µl des dialysierten Überstandes bzw. Cytosols wurden auf eine Superdex 200-Säule geladen und bei 0,3 ml/min in 0,5 ml Fraktionen eluiert. Die Fraktionen wurden TCA gefällt und nach SDS/PAGE durch Western Blot analysiert.

3.2.12. Co-Immunpräzipitation

Zellen wurden bis zur mittleren logarithmischen Phase (OD₆₀₀ = 0,7) angezogen, sphäroblastiert und in 20 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM Mg(OAc)₂, 1 mM PMSF und PI (IP-Puffer) homogenisiert. Gegebenenfalls wurde eine Zellfraktionierung durchgeführt. Zur Immunpräzipitation von RNCs wurden diese in 20 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl aufgenommen. Anschließend wurden die Proben mit 3 µl des jeweiligen Antikörpers über Nacht bei 4° C inkubiert. Antigen-Antikörper-Komplexe wurden durch Bindung an 50 µl 50%-ige Protein A-Sepharose in IP-Puffer gefällt (1 h, 4° C). Die Präzipitate wurden mindestens dreimal mit IP-Puffer gewaschen und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Proteine wurden über SDS/PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot-Analyse mit spezifischen Antikörpern gegen Egd1p, Egd2p bzw. Btt1p nachgewiesen.

Bei der Co-Immunpräzipitation quervernetzter RNCs variierte der IP-Puffer. Aufschluß, Inkubation der Antikörper, Äquilibrierung der Protein A-Sepharose und Waschen der Präzipitate erfolgte in 20 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 0,1 % SDS, 1 mM PMSF und PI. Nach dem Zellaufschluß wurden die Ansätze für 15 min bei RT mit RNase A inkubiert. Danach erfolgte eine Zugabe von SDS zu einer Endkonzentration von 1 %. Die Proben wurden für 10 min gekocht und vor dem Zusatz des Antikörpers mit IP-Puffer ohne SDS auf eine SDS-Konzentration von 0,1 % verdünnt. Die Komplexe wurden über SDS/PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert.

3.2.13. Präparation von *in vitro*-Translationslysaten aus *S. cerevisiae*

Translationslysate wurden aus 4 l exponentiell wachsender Kultur gewonnen. Die Zellen wurden in YPD bei 30° C bis zu einer $OD_{600} = 0,5$ angezogen. Das Zellpellet wurde mit $\frac{1}{2}$ YP/1,1 M Sorbitol gewaschen und mit 1mg Zymolyase 100T (Calbiochem) pro g Feuchtgewicht ca. 20 min unter Zusatz von 2 mM DTT sphäroblastiert. Nach der Sphäroblastierung erfolgte ein Waschschriff mit $\frac{1}{2}$ YP/1,1 M Sorbitol und nachfolgend in gleichem Medium bei 30° C eine 20 minütige Inkubation unter leichtem Schütteln. Der Aufschluß der Sphäroblasten erfolgte in einem möglichst geringen Volumen von 50 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KOAc, 5 mM $Mg(OAc)_2$, 1 mM PMSF, Proteaseinhibitormix (Sigma) mittels eines Homogenisators (Brown). Zellwände und Kerne wurden bei 3000 g 15 min abzentrifugiert. Mitochondrien wurden durch 15-minütige Zentrifugation bei 10 000 g abgetrennt. Membranen des ER wurden bei 40 000 g für 30 min pelletiert. Der Überstand wurde mittels einer Sephadex G25-Säule (G25 medium, d = 2 cm, h = 30 cm) filtriert. Fraktionen mit der höchsten optischen Dichte bei 260 nm (OD_{260}) wurden vereinigt. Das Lysat wurde tropfenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren. Vor der *in vitro*-Translation wurde das Lysat mit S7-Nuklease behandelt.

3.2.14. Herstellung von RNCs

RNCs wurden durch die „truncated mRNA“-Methode hergestellt (Mueckler und Lodish, 1986; Perara et al., 1986). Die codierende Region von WT-Invertase, signalsequenzloser Invertase und CAT wurde in pGEMT kloniert, so daß sich der SP6-Promotor vor dem jeweiligen Start-Codon befand. Die Plasmide pGEM WT-Inv, pGEM Δ ss-Inv und pGEM CAT wurden durch Restriktion an der gewünschten Stelle (97 aa WT-Invertase und 77 aa Δ ss-Invertase: *HindIII*, 72 aa CAT *EcoRI*) geschnitten. Die DNA-Fragmente wurden durch SP6-RNA-Polymerase in mRNA transkribiert. Die verkürzte mRNA wurde Phenol/Chloroform extrahiert, Ethanol gefällt und in RNase-freiem Wasser gelöst.

Für die *in vitro* Translation wurden Translationslysate der entsprechenden Hefestämme für ca. 10 min mit S7-Nuclease behandelt, um exogene RNA zu entfernen. Die Inkubationszeit für die Nuclease wurde für jedes Translationslysate titriert. Die Translation erfolgte in 50 mM HEPES, pH 7,5, 140 mM KOAc, 5 mM $Mg(OAc)_2$ (RBB = Ribosome Binding Buffer) unter Zusatz von ^{35}S -Methionin, mRNA und gegebenenfalls TDBA-lysyl-tRNA. RNCs wurden je nach Experiment mit 100 000 g für 30 min durch ein Niedrig- oder Hochsalzkissen (500 mM Saccharose, 50 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM oder 500 M KOAc, 5 mM $Mg(OAc)_2$, 1 mM DTT und Proteaseinhibitor sedimentiert und in RBB aufgenommen.

3.2.15. Präparation von Mikrosomen

Die Herstellung rauher Membranen erfolgte wie in 3.2.10. beschrieben. Zur Gewinnung von EDTA/KOAc gewaschenen rauhen Membranen (EKRMs) wurden das Membranpellet in 50 mM HEPES, pH 7,5, 500 mM KOAc, 250 mM Saccharose und Proteaseinhibitormix resuspendiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die Membranen wurden für 30 min bei 40 000 g durch zwei Volumen eines Hochsalzkissens (50 mM HEPES, pH 7,5, 500 mM KOAc, Proteaseinhibitormix) zentrifugiert. Sie wurden dann in Niedrigsalzpuffer (50 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KOAc, Proteaseinhibitormix) plus 50 mM EDTA aufgenommen und nochmals 15 min auf Eis inkubiert. Die KOAc-Konzentration wurde dann auf 650 mM eingestellt und die Inkubation auf Eis um weitere 10 min fortgeführt. Es erfolgten noch zwei Sedimentationen durch ein Hochsalzkissen, und zweimalige Zentrifugation durch ein Niedrigsalzkissen. Die letzten Sedimente wurden in Niedrigsalzpuffer aufgenommen und auf gleiche OD_{280} eingestellt.

3.2.16. Flotationsassay

10 µl EKRM wurden mit unterschiedlichen Mengen RNCs versetzt. Der Ansatz wurde mit RBB auf 20 µl aufgefüllt und 5 min bei 28°C sowie 15 min auf Eis inkubiert. Diese Probe wurde gründlich mit 180 µl 2,3 M Saccharose in RBB gemischt, in Zentrifugationsröhrchen überführt (Beckman, Ultra-Clear 5 x 41 mm) und mit 360 µl 1,9 M Saccharose in RBB überschichtet. Die Röhrchen wurden mit Puffer aufgefüllt und für 3,75 h bei 40 000 rpm in Ti 50.1-Rotor (Beckman) zentrifugiert. Anschließend wurden die Zentrifugationsröhrchen in flüssigem Stickstoff eingefroren und in 300 µl untere (F =freie Ribosomen) und 300 µl obere (M= Membrangebundene Ribosomen) Fraktion geschnitten. Die Sedimente wurden mit 1 % SDS solubilisiert und der unteren Fraktion zugeführt. Die Fraktionen wurden mit Wasser auf 900 µl aufgefüllt, 50 µg tRNA zugesetzt und die Proteine mit 15 % TCA gefällt. Die Präzipitate wurden in SDS/PAGE-Probenpuffer aufgenommen und durch SDS/PAGE und Autoradiographie analysiert.

3.2.17. Photoquervernetzung

Die Quervernetzung von Proteinen zu naszierenden Polypeptiden erfolgte wie in der Literatur beschrieben. (Görlich et al., 1991). *In vitro*-Translation von verkürzter mRNA wurde in Gegenwart von TDBA-lysyl-tRNA in 100 µl Hefelysate durchgeführt. RNCs wurden durch Zentrifugation von 30 min bei 100 000 g sedimentiert. Die Proben wurden für 5 min auf Eis mit UV-Licht bestrahlt und anschließend in 50 mM HEPES pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM Mg(OAc)₂, 1 % SDS für 10 min gekocht. Danach erfolgte eine Verdünnung mit Puffer ohne SDS auf eine SDS-Konzentration von 0,1 % sowie die Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Egd1p oder Egd2p und die Analyse der Präzipitate durch SDS/PAGE.

3.2.18. *In vitro*-Kernimport in HeLa-Zellen

Der *in vitro*-assay wurde mit kleinen Änderungen wie beschrieben durchgeführt (Adam et al., 1990; Jäkel und Görlich, 1998; Köhler et al., 1999).

HeLa-Zellen wurden auf 3-Loch Objektträgern (Roth) in DMEM/10 %FCS bis ca. 40 % Konfluenz angezogen. Die Zellen wurden einmal mit eiskaltem PBS gewaschen und 8 min auf Eis in 20 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂, 5 mM EGTA, 250 mM Saccharose und 30 µg Digitonin pro ml Puffer permeabilisiert. Der Import-Reaktionsansatz wurde für 8 min bei RT mit den Zellen inkubiert. Die Importreaktion wurde durch Fixierung der Zellen in 3 % Paraformaldehyd/PBS gestoppt, die Objektträger mit PBS gewaschen und mit Hilfe von mounting medium (Vector) verschlossen.

Die Importreaktion enthielt ein Energie-regenerierendes System (0,5 mM ATP, 0,5 mM GTP, 10 mM Kreatinphosphat, 50 µg Kreatinkinase / ml), core-Puffer (2 µg Nucleoplasmin core / ml, 20 mM HEPES, pH 7,5, 150 mM KOAc, 5 mM Mg(OAc)₂, 250 mM Saccharose), 0,5 mM EGTA, 3 µM RanGDP, 0,2 µM Ran1p, 0,3 µM RanBP1 und 0,4 µM NTF2. Der Ansatz wurde auf 10 % Reticulozytenlysate, 1 µM Importin β und 2 µM Importin α eingestellt. Die Aufreinigung der einzelnen Komponenten erfolgte wie beschrieben (Görlich et al., 1995; Köhler et al., 1999; Kutay et al., 1997b). Klone dafür wurden von D. Görlich (Heidelberg) und M. Köhler (Berlin) zur Verfügung gestellt.

Rekombinantes Egd1p, Egd2p und Nucleoplasmin wurde mit Texas Red oder Fluorecein-5'-Maleimid markiert, indem Protein und Farbstoff 1 : 3 für 2 h auf Eis inkubiert wurden. Überschüssiger Farbstoff wurde mittels Gelfiltration über eine NAP5 Säule (Amersham Pharmacia) abgetrennt.

3.2.19. Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie der *in vitro*-Importexperimente mit HeLa-Zellen erfolgte mit dem konfocalen Mikroskop MRC 1024 (Biorad) unter Verwendung eines 63x Öl-Immersionsobjektives (Diaphot, Nikon).

Die Fluoreszenzmikroskopie lebender Hefezellen wurde mit einem ZEISS Axioplan 1 Mikroskop mit einem NEOFLUAR 100x/1.30 Öl-Immersionsobjektiv durchgeführt. GFP-Fluoreszenz wurde mit dem FITC-Filter detektiert, Kernfärbungen mittels des UV-Kanals sichtbar gemacht. Fotografien wurden mit einer CCD-Kamera aufgenommen.

Für die Mikroskopie von Hefezellen wurden exponentiell wachsende Kulturen verwendet. Die Zellen wurden bei permissiver Temperatur in SD-Medium mit entsprechenden Aminosäuren angezogen. Kerne wurden durch Hoechst 33258 (Sigma) gefärbt, das 5 min vor der Mikroskopie in einer Konzentration von 10 μ M zur Zellsuspension gegeben wurde.

4. Ergebnisse

4.1. *EGD1*, *EGD2* und *BTT1* sind nicht essentiell

Deletionsmutanten von *EGD1*, *EGD2* und *BTT1* wurden, wie in II.3.2.5. angegeben, hergestellt. In der Literatur sind die Inaktivierung der einzelnen Gene sowie die Doppeldelentionsmutante $\Delta egd1\Delta btt1$ bereits beschrieben worden. Diese Mutanten wurden durch Insertion eines Auxotrophiemarkers erzeugt (Hu und Ronne, 1994; Shi et al., 1995). Eine Restaktivität verkürzter Proteine ist bei Nutzung dieser Mutanten nicht auszuschließen. Zu Beginn dieser Arbeit wurden *EGD1* und *EGD2* Deletionsmutanten hergestellt, in denen die gesamte codierende Sequenz sowie ein großer Teil des Promotors entfernt wurden ($\Delta egd1$, $\Delta egd2$). Diese Deletionsmutanten waren lebensfähig.

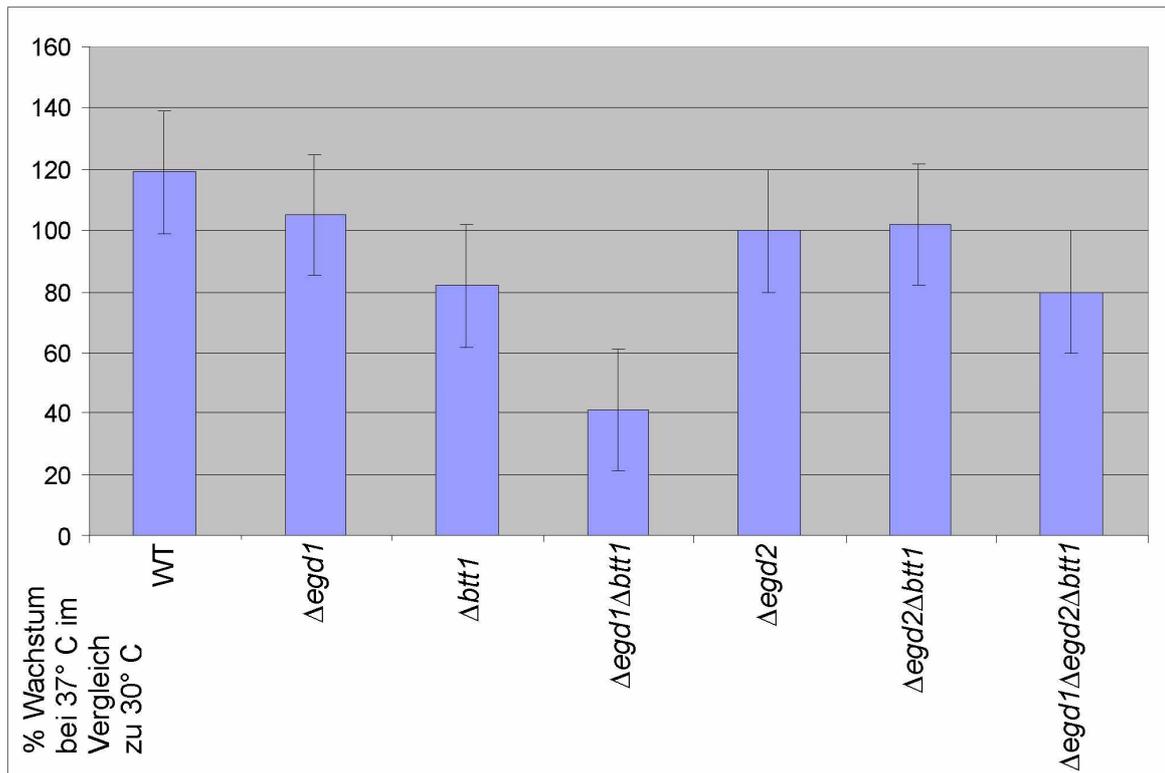
Weiterhin wurden Deletionsmutanten konstruiert, in denen *EGD1* und *EGD2* ($\Delta egd1\Delta egd2$), *EGD1* und *BTT1* ($\Delta egd1\Delta btt1$), *EGD2* und *BTT1* ($\Delta egd2\Delta btt1$) sowie *EGD1*, *EGD2* und *BTT1* ($\Delta egd1\Delta egd2\Delta btt1$) deletiert waren. Alle hergestellten Doppeldelentionsmutanten sowie die Dreifachdelentionsmutante waren bei 30° C vital. Es wurde das Wachstum auf verschiedenen Kohlenhydratquellen getestet. Bei Wachstum auf Glucose, Galactose, Raffinose, Lactat oder Glycerol konnte kein Unterschied festgestellt werden.

4.2. Die gleichzeitige Deletion von *EGD1* und *BTT1* verursacht Lethalität bei 37°C

Die Auswirkungen der Deletion der einzelnen Gene *EGD1*, *EGD2* und *BTT1* und der verschiedenen Kombinationen wurden näher untersucht. Dazu wurden Wachstumskurven bei 23° C, 30° C und 37° C aufgenommen. Die Verdopplungszeiten aller Mutanten unterschieden sich bei 23° C und 30° C nicht. Bei 37° C konnte beim $\Delta egd1\Delta btt1$ -Stamm eine drastische Erhöhung der Verdopplungszeit in SD-Medium von 2,5 (Wildtyp) auf 10 h festgestellt werden. Damit verringerte sich die Wachstumsrate der $\Delta egd1\Delta btt1$ -Mutante bei 37° C um 60 % im Vergleich zu der bei 30 °C (Abbildung 6A). Bei Analyse der Mutanten auf Festmedium war im Gegensatz zu Wildtypzellen und allen anderen Deletionsmutanten kein Wachstum von $\Delta egd1\Delta btt1$ bei 37°C erkennbar (Abbildung 6B). Der gleiche Wachstumsphänotyp wurde erzielt, wenn *Egd2p* im Wildtyp oder in der Dreifachdelentionsmutante überexprimiert wurde (nicht gezeigt). Die Überexpression von *Btt1p* im Wildtyp oder in der Dreifachdelentionsmutante erbrachte keine Änderung des Wachstumsverhaltens. Western Blot-Analysen von Zell-Lysaten aus Wildtyp und dem

Egd1p-Überexpressionsstamm zeigten keinen Unterschied im Expressionsniveau von Egd1p. Möglicherweise erfolgt eine Kontrolle des Egd1p in der Zelle, die keine höhere Egd1p-Konzentration als die physiologische zuläßt. Es wurde daraus geschlußfolgert, daß ein geringeres Wachstum auftritt, wenn Egd2p ungebunden vorliegt.

A



B

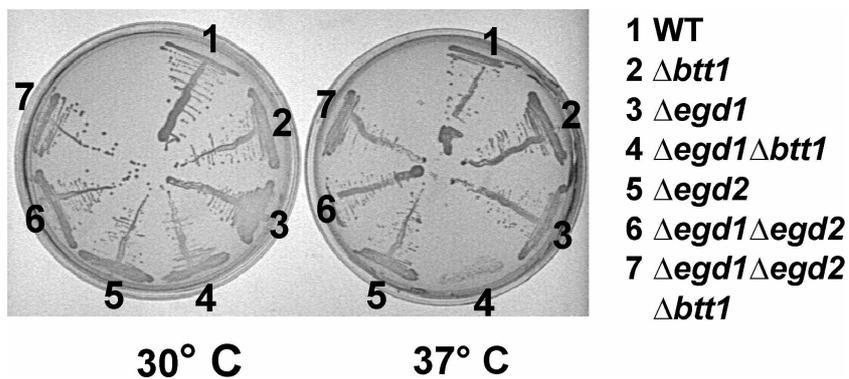


Abbildung 6: Wachstum von NAC-Deletionsmutanten. **A:** Wachstum der bezeichneten Stämme nach 20 h bei 37° C im Vergleich zu 30° C in SD-Flüssigmedium. Es wurden drei Wachstumskurven für jeden der Stämme aufgenommen und der Mittelwert aufgetragen. **B:** Wachstum der rechts bezeichneten Stämme auf SD-Agar bei 30 und 37° C. Die Stämme wurden über Nacht auf SD plus allen Supplementen bei 30° C angezogen und danach auf SD-Agar plus allen Supplementen vereinzelt. Die Inkubation bei 30 oder 37°C erfolgte für 2 Tage.

4.3. Egd1p, Egd2p und Btt1p bilden einen festen Komplex

Die Untereinheiten des Säuger-NAC bilden einen Komplex, der in der Steuerung des cotranslationalen Transports eine Rolle spielt. Im Gegensatz dazu sind einzelne Untereinheiten des Säuger-NAC und auch die Hefe-Homologen als Transkriptionsregulatoren beschrieben worden. Es wurde deshalb eine mögliche Komplexbildung der Hefe-NAC-Proteine untersucht. Dazu wurden Co-Immunpräzipitationen mit spezifischen Antikörpern gegen Egd1p, Egd2p und Btt1p und chromatographische Untersuchungen durchgeführt. Aus vorherigen Experimenten war ersichtlich, daß das Protein Btt1p in ca. hundertfach geringerer Konzentration als Egd1p und Egd2p vorliegt und daß Egd1p bei einer Größe von 18 kDa, Egd2p bei einer Größe von 30 kDa sowie Btt1p bei einer Größe von 14 kDa im SDS/Polyacrylamidgel migrieren (Ergebnisse B.Reimann). Btt1p wurde überexprimiert, um es im Western Blot nachweisen zu können und es trotz seiner geringen Konzentration in die Bindungsstudien einzubeziehen. Abbildung 7 zeigt, daß unter nativen Bedingungen der Antikörper gegen Egd2p Egd1p fällen kann (Bahn 2). Mit dem Antikörper gegen Egd1p war es möglich, Egd2p fast quantitativ zu fällen (Bahn 3, Ausgangslysat und Überstand nicht gezeigt). Bei beiden Co-Immunpräzipitationen konnte Btt1p nicht detektiert werden, obwohl dieses Protein überexprimiert wurde. Setzte man dagegen den Antikörper gegen Btt1p ein, konnte Egd2p aber nicht Egd1p präzipitiert werden (Bahn 4), da möglicherweise Egd1p und Btt1p um die gleiche Bindungsstelle des Egd2p konkurrieren.

Die Komplexbildung des Hefe-NAC konnte durch affinitäts- und gelchromatographische Methoden bestätigt werden, die J. Bradsher (Labor M. Wiedmann, New York) und B. Reimann (Labor B. Wiedmann, Berlin) durchführten. Isolierte Ribosomen wurden mit 500 mM KOAc behandelt und pelletiert. Der Überstand wurde für die chromatographische Analyse genutzt. Bei der partiellen Aufreinigung des Komplexes über eine Heparinsäule und eine MonoQ-Säule konnte gezeigt werden, daß sich Egd1p und Egd2p in den gleichen Fraktionen befanden. Egd1p und Egd2p konnten auch bei Anwendung einer Gelfiltration zusammen eluiert werden (keine Abbildung). Aufgrund der Vorbehandlung der Proteine bei der Ablösung vom Ribosom durch Hochsalz konnte von einem sehr stabilen Komplex ausgegangen werden. Die Größe des Komplexes betrug ca. 68 kDa. Sie wurde um ca. 50 kDa reduziert, wenn Cytosol der *EGD2*-Deletionsmutante aufgetrennt wurde. Dieser Molekulargewichtsverlust entspricht ca. zwei Molekülen Egd2p. Dieses Ergebnis könnte für die Existenz eines trimeren Komplexes, bestehend aus zwei Molekülen Egd2p und jeweils einem Molekül Egd1p oder Btt1p, sprechen. Das Molekulargewicht erhöhte sich

überraschenderweise auf bis zu 150 kDa, wenn beide β -Untereinheiten des Komplexes (Egd1p und Btt1p) fehlten. Möglicherweise aggregierte freies Egd2p. Es wurde kein immunreaktives Material gefunden, das einem Laufverhalten kleiner 30 kDa entspricht. Zusammenfassend kann man aussagen, daß Egd1p und Egd2p sowie Btt1p und Egd2p einen festen Komplex bilden. Das Vorhandensein eines heterologen Komplexes aus allen drei Komponenten kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

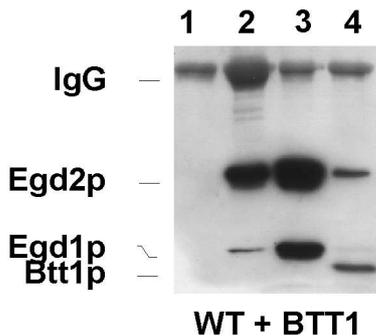


Abbildung 7: Co-Immunpräzipitation von Hefe-NAC-Untereinheiten. Ein Wildtypstamm, welcher ein Plasmid mit induzierbarem *BTT1*-Gen enthielt, wurde bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Die Überexpression von Btt1p wurde durch Desoxycorticosteron induziert. Die Zellen wurden nach 3 h geerntet, sphäroblastiert und lysiert. Das Lysat wurde unter nicht-reduzierenden Bedingungen mit Antikörpern gegen Egd2p (Bahn 2), Egd1p (Bahn 3), Btt1p (Bahn 4) und Präimmenserum des anti-Egd1p-Antikörpers (Bahn 1) inkubiert und diese mit Protein A-Sepharose gefällt. Der Western Blot wurde mit Verdünnungen von Antikörpern gegen alle drei Proteine getestet.

4.4. Hefe-NAC ist über Egd1p mit Ribosomen assoziiert

Zellfraktionierungsexperimente sollten eine cytosolische oder ribosomengebundene Lokalisierung des Komplexes nachweisen. Für diese Experimente wurden Hefelysate von Kernen und Mitochondrien befreit. Anschließend wurden die Lysate (L) in cytosolische (C) und ribosomale (R) Fraktionen aufgetrennt. In den Bahnen 1 bis 3 der Abbildung 8 ist die Verteilung der NAC-Proteine in Wildtypzellen gezeigt. Egd1p und Egd2p wurden zum größten Teil in der ribosomalen Fraktion detektiert. Wurde Btt1p im Wildtyp überexprimiert, befand sich das Protein zum größten Teil am Ribosom (Bahn 4 bis 6). Das vollständige Ablösen des Komplexes vom Ribosom erforderte eine zweimalige Behandlung der Ribosomenfraktion mit mindestens 500 mM KOAc (nicht gezeigt).

Bei Fehlen des Egd1p oder beider β -Untereinheiten verschob sich die Lokalisation des Bindungspartners Egd2p von der ribosomalen zur cytosolischen Fraktion (Bahn 7 bis 9 und 10 bis 12). Eine Überexpression des Btt1p konnte die Fehllokalisierung des Egd2p teilweise aufheben (Bahn 16 bis 18). Die Lokalisation von Egd1p wurde im *Δegd2*-Stamm nicht verändert (Bahn 13 bis 15). Diese Ergebnisse zeigen, daß Egd1p diejenige Untereinheit des NAC ist, welche die Ribosomenbindung vermittelt. Btt1p kann diese Funktion bei Überexpression übernehmen.

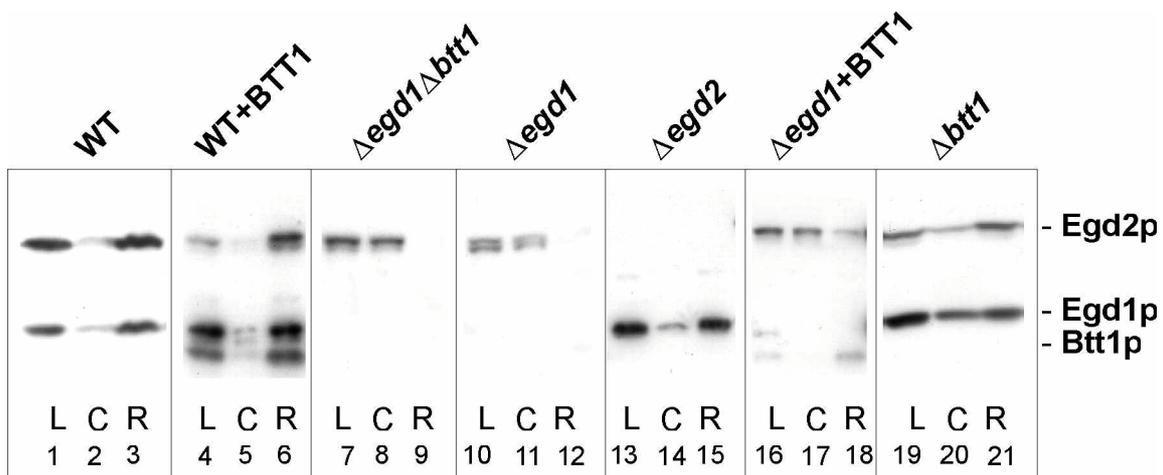


Abbildung 8: Zellfraktionierung der Wildtyp- und Deletionsstämmen von *EGD1*, *EGD2* und *BTT1*. Die oben angegebenen Stämme wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen, mit Zymolyase sphäroblastiert und in hypo-osmotischem Puffer lysiert. Cytosol und Ribosomen wurde durch eine 30-minütige 100 000 g-Zentrifugation getrennt, nachdem Zellwandreste, Kerne und Mitochondrien entfernt wurden. Lysat (L) und Cytosol (C) der angezeigten Stämme wurden TCA-gefällt und in gleichem Volumen SDS/PAGE-Probenpuffer aufgenommen wie die Ribosomen (R) und nach SDS/PAGE durch Western Blot mit Antikörpern gegen Egd1p, Egd2p und Btt1p getestet. Die aufgetragene Proteinmenge pro Bahn betrug ca. 100 µg. Aufgrund der geringen Konzentration des Btt1p in der Zelle und daraus folgender unzureichender Detektierbarkeit im Western Blot wurde dieses Protein überexprimiert.

4.5. Die ersten 11 Aminosäuren des Egd1p sind essentiell für die Ribosomenbindung des Hefe-NAC

Egd1p wurde schrittweise verkürzt, um eine mögliche Ribosomenbindungsdomäne zu identifizieren. Dazu wurde der N-Terminus des Egd1p um 11, 14, 27 bzw. 44 Aminosäuren verkürzt und eine Zellfraktionierung durchgeführt. Die Verkürzungen wurden so gewählt, daß eine konservierte, hydrophobe Struktur mit auffälligen KL-Wiederholungen am N-Terminus von Egd1p sequentiell zerstört wurde. Die Experimente wurden durchgeführt, indem man Zellen der dreifachen NAC-Deletionsmutante mit Plasmiden transformierte, die die codierende, entsprechend verkürzte Region des *EGD1* mit endogenem Promotor sowie *EGD2* mit endogenem Promotor enthielten (Klonierung siehe II.3.2.6.). Nach Abtrennung von Kernen, Mitochondrien und ER wurde das resultierende Lysat in Cytosol und Ribosomen fraktioniert. Abbildung 9A demonstriert, daß nur noch Spuren von Egd1p in der ribosomalen Fraktion zu finden sind, wenn die ersten 11 Aminosäuren entfernt wurden. Die Verkürzung um 14 aa zeigte kein Signal in der ribosomalen Fraktion. Alle weiteren Verkürzungen verhielten sich analog zur 14 aa-Deletion. Durch Co-Immunpräzipitationen wurde nachgewiesen, daß auch die verkürzten Formen des Egd1p einen Komplex mit Egd2p bildeten (Abbildung 9B).

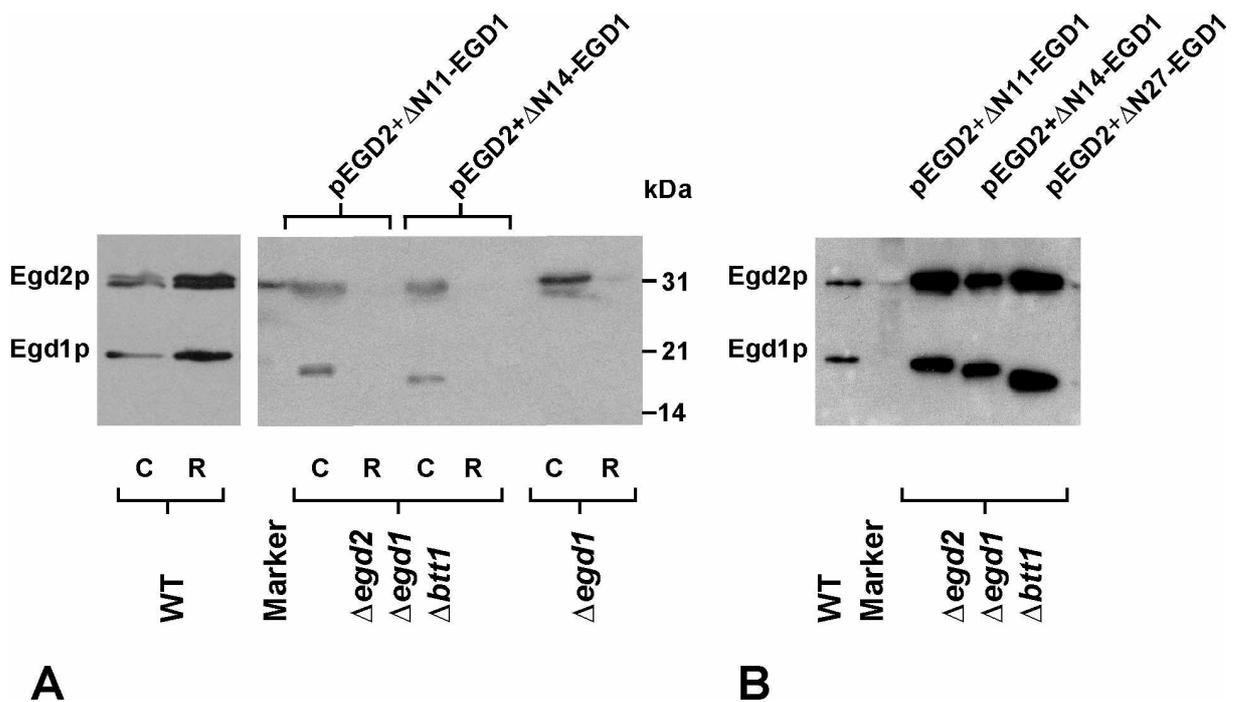


Abbildung 9: Zelluläre Lokalisation N-terminal verkürzter Egd1p-Proteine und Co-Immunpräzipitation mit Egd2p. **A:** Zellfraktionierung. Der NAC-Dreifachdeletionsstamm wurde mit Plasmiden transformiert, die für Egd2p und Egd1p ohne die ersten 11 Aminosäuren ($\Delta\text{N11-EGD1}$) oder 14 Aminosäuren ($\Delta\text{N14-EGD1}$) codierten. Aus dem Wildtyp (die ersten beiden Bahnen), der transformierten Dreifachdeletionsmutante und der *EGD1*-Deletionsmutante (die beiden rechten Bahnen) wurden Cytosol (C) und Ribosomen (R) präpariert. Die Fraktionen wurden nach SDS/PAGE mittels Western Blot mit Antikörpern gegen Egd1p und Egd2p analysiert. **B:** Co-Immunpräzipitation. Der NAC-Dreifachdeletionsstamm wurde mit Plasmiden transformiert, die für die N-terminalen Verkürzungen des Egd1p um 11, 14 und 27 Aminosäuren codierten. Aus den Transformanten und Wildtypzellen wurde Lysat präpariert. Mit dem Antikörper gegen Egd1p wurden bestehende Komplexe präzipitiert und über SDS/PAGE und Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen Egd1p und Egd2p sichtbar gemacht.

Man kann zusammenfassen, daß eine Deletion der ersten 11 Aminosäuren am N-Terminus des Egd1p ausreichte, um die Ribosomenbindung des Proteins zu verhindern.

4.6. Hefe-NAC bindet an die naszierende Kette

Cytosolische Proteine, die sich in räumlicher Nähe zur naszierenden Proteinkette befinden, können mit der naszierenden Kette photochemisch quervernetzt werden. Dazu wurden ribosomengebundene Translationsintermediate definierter Länge durch *in vitro*-Translation von mRNA des Modellsubstrates Chloramphenicolacetyltransferase (CAT) erzeugt, welcher das Stop-Codon fehlte (Mueckler und Lodish, 1986; Perara et al., 1986). Durch die Anwesenheit von ^{35}S -Methionin wurden die naszierenden Ketten radioaktiv markiert. Die *in vitro*-Translationen wurden in Lysaten aus Wildtyp und NAC-Deletionsmutanten durchgeführt. Durch Zugabe von TDBA-geladener lysyl-tRNA zum Translationsansatz wurden modifizierte Lysine in die neu entstandenen Ketten inkorporiert (Görlich et al., 1991;

Kurzchalia et al., 1986). TDBA ist ein photoreaktiver Quervernetzer. Bei UV-Bestrahlung interagiert dieser Crosslinker mit Molekülen, die sich in unmittelbarer Nähe befinden. Die Quervernetzungsprodukte wurden durch Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Egd1p und Egd2p gefällt und durch SDS/PAGE und Autoradiographie analysiert. Quervernetzungsprodukte können durch Zunahme des Molekulargewichts der radioaktiv markierten Peptidkette um die Größe des Bindungspartners in der Autoradiographie detektiert werden. Abbildung 10 stellt die Quervernetzung von Egd1p bzw. Egd2p zu einem 72 aa langen Fragment CAT dar. 72 aa CAT wurde in Wildtyp- und Δ egd2-Lysat translatiert und mit UV-Licht bestrahlt. Im Wildtyp konnte nach UV-Bestrahlung Egd1p und Egd2p mit der naszierenden Kette quervernetzt werden. Bei Translation im Δ egd2-Lysat wurde wie erwartet nur Egd1p quervernetzt. Im Δ egd1-Translationslysate konnte keine Quervernetzung von Egd2p zur naszierenden Kette gefunden werden, wodurch die Ergebnisse der Zellfraktionierung bestätigt werden (nicht gezeigt). Die jeweiligen Negativkontrollen, die analog zu den Quervernetzungsproben, jedoch ohne UV-Bestrahlung behandelt wurden, wiesen kein radioaktives Quervernetzungsprodukt auf. Quervernetzungsversuche mit anderen kurzen Ketten, wie z.B. 87 aa Präpro- α -Faktor (signalsequenzhaltig), sowie 72 aa Luciferase (wie CAT keine Signalsequenz) zeigten ähnliche Muster wie in Abbildung 10 dargestellt. Vollständig translatierte Ketten und verkürzte Ketten, die durch Puromycinbehandlung vom Ribosom abgelöst wurden, zeigten keine Quervernetzungsbanden mit den NAC-Untereinheiten (nicht gezeigt). Egd1p sowie Egd2p (unter Voraussetzung der Anwesenheit von Egd1p), befinden sich demnach in unmittelbarer Nähe der naszierenden Kette.

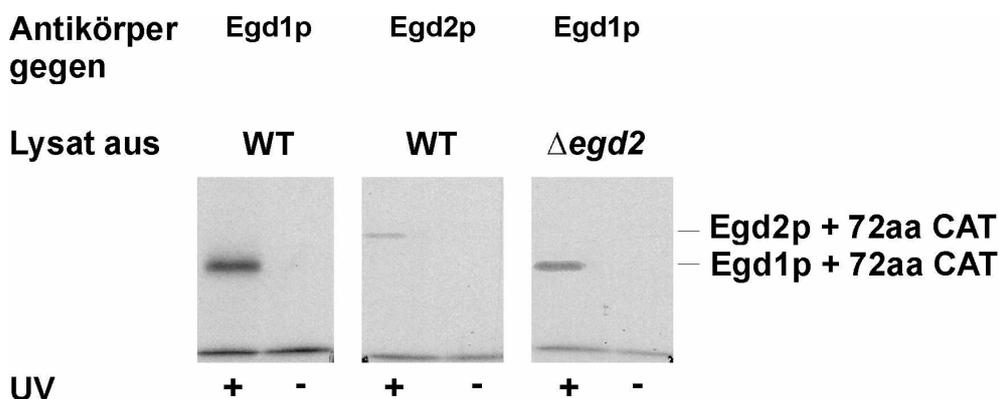


Abbildung 10: UV-abhängige Quervernetzung naszierender Ketten zu Egd1p und Egd2p. 72 aa CAT-mRNA wurde in Wildtyp- und Δ egd2-Lysat radioaktiv translatiert und durch 5-minütige UV-Bestrahlung (315 nm) zur Aktivierung des inkorporierten Photocrosslinkers quervernetzt. Die Komplexe aus Ribosomen und naszierender Kette wurden durch 30-minütige Zentrifugation bei 100 000 g durch ein Hochsalzkissen pelletiert. Nach RNase-Behandlung und 10 minütigem Kochen in Anwesenheit von 1 % SDS wurde eine Immunpräzipitation mit Antikörpern gegen Egd1p oder Egd2p durchgeführt. Die quervernetzten Komplexe wurden durch SDS/PAGE und Autoradiographie (Exposition über Nacht bei -80°C) detektiert.

4.7. Hefe-NAC verhindert *in vitro* das Targeting cytosolischer RNCs an ER-Membranen

Zur Klärung der Funktion des Hefe-NAC wurden Flotationsexperimente durchgeführt. Grundlage dieser Versuche ist, daß membrangebundene Ribosomen bei Zentrifugation mit 100 000 g in einem Saccharose-Gradienten schweben oder „flotieren“ (Fraktion M = Membrangebundene Ribosomen). Freie Ribosomen werden dagegen sedimentiert (Fraktion F = Freie Ribosomen).

RNCs von Proteinen mit und ohne Signalsequenz (als Modellsubstrat Invertase mit und ohne Signalsequenz) wurden hergestellt, indem mRNA ohne Stop-Codon *in vitro* translatiert wurde. Dabei erfolgte eine Markierung der Peptide mit ³⁵S-Methionin. Es entstanden RNCs mit 97 aa-WT-Invertase (Wildtyp) und 77 aa- Δ ss-Invertase (ohne Signalsequenz). Der Translationsansatz wurde mit mehrfach EDTA- und Hochsalz-gewaschenen und dadurch ribosomenfreien ER-Membranen (EKRM) inkubiert, unter einen Saccharose-Gradienten pipettiert und zentrifugiert. Die so behandelten Membranen flotierten fast vollständig, was durch den Nachweis des Membranproteins Sec61p in der M-Fraktion nachgewiesen wurde (nicht gezeigt).

In einem weiteren Kontrollexperiment wurde geprüft, ob die Membranen vollständig von Ribosomen befreit waren. Dies geschah durch Western Blot-Analyse der EKRM mit Antikörpern gegen Egd1p, Egd2p und das ribosomale Protein L3. Keines der Proteine war in signifikanten Mengen zu detektieren (nicht gezeigt).

Die Experimente in Abbildung 11 wurden mit drei, ansteigenden RNC-Membran-Verhältnissen durchgeführt. M- und F-Fractionen wurden mittels SDS/PAGE und Autoradiographie analysiert. Der obere Teil der Abbildung 11 zeigt ein typisches Flotationsexperiment mit RNCs der Wildtyp-Invertase, die cotranslational in das ER gelangt und dort glykosyliert wird. Wie erwartet flotierten diese RNCs mit den Membranen des ER, so daß die radioaktiven RNCs zu einem großen Teil membrangebunden vorlagen. Dieses Verhalten war unabhängig davon, ob die Translation in einem NAC-freien oder -haltigen Lysat erfolgte. Auffällig war, daß im Lysat der Dreifachdeletionsmutante sogar mehr RNCs an der Membran detektiert werden konnten. Wurde die signalsequenzlose Invertase translatiert, befanden sich die RNCs im Wildtyplysat ausschließlich in der F-Fraktion, d.h. waren nicht membrangebunden (Abbildung 11, unterer Teil, links). Nach Translation von Δ ss-Invertase im Δ egd2-Lysat änderte sich die Verteilung der RNCs nicht (unterer Teil, Mitte). Eine Umverteilung der RNCs trat bei der Translation von Δ ss-Invertase im Lysat der Dreifachdeletionsmutante auf (unterer Teil, rechts). Dieser Ansatz zeigte einen deutlich

stärkeren Anteil der Translationsintermediate in der M-Fraktion. Es ist zu beachten, daß schon bei einer geringen Konzentration radioaktiv markierter RNCs eine Bindung an die Membranen erfolgte und dieses Signal bei Erhöhung der RNC-Menge nur wenig zunahm. Die Membranbindungsstellen schienen schon bei einer geringen Konzentration an markierten RNCs abgesättigt zu sein.

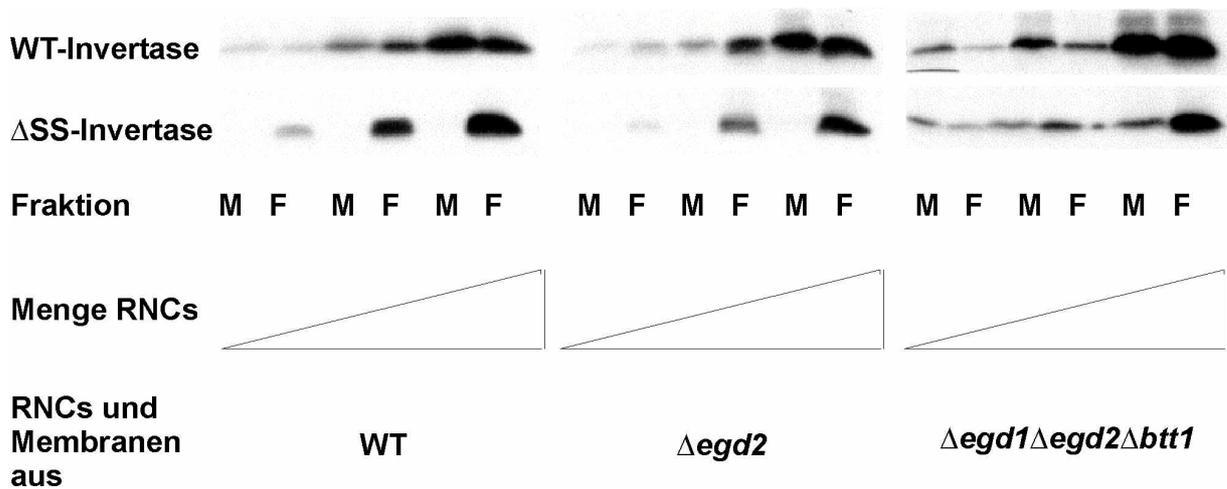


Abbildung 11: Flotation von RNCs mit ER-Membranen. In den unten angegebenen Lysaten wurden WT-Invertase und Δ ss-Invertase radioaktiv translatiert und die RNCs durch 3,75-stündige Zentrifugation bei 40 000 rpm in einem Beckman Ti 50.1-Rotor pelletiert. ER-Membranen wurden aus den angegebenen Stämmen präpariert und durch EDTA- und Hochsalzbehandlung von Ribosomen befreit (Herstellung EKRMs). Nach Inkubation von RNCs mit EKRMs erfolgte eine Zentrifugation unter einem 1,9 M Niedrigsalz-Saccharosekissen. Die Flotationsröhrchen wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und in obere (M = Membranen) und untere (F = freie Ribosomen)-Fraktion geteilt. Die Fraktionen wurden über SDS/PAGE und Autoradiographie analysiert (Exposition 2 Tage bei -80°C).

Diese Experimente demonstrieren, daß Ribosomen, die signalsequenzlose Invertase translatieren, bei Fehlen von Hefe-NAC *in vitro* in einem stärkeren Maße an Hefe-Mikrosomen gebunden werden.

4.8. GFP-Fusionsproteine von Egd1p und Egd2p sind cytosolisch lokalisiert

Eine Rolle des NAC bei der Regulation des Targetings translatierender Ribosomen an die ER-Membran schließt eine Funktion der einzelnen Untereinheiten in transkriptionellen Prozessen nicht aus. Eine damit verbundene Kernlokalisierung konnte mit den bisher angewandten Methoden nicht nachgewiesen werden. Es schien deshalb interessant, die Lokalisation der NAC-Untereinheiten *in vivo* zu untersuchen. Dazu wurden Fusionen von Egd1p bzw. Egd2p mit zwei Kopien GFP hergestellt. Zwei Kopien von GFP stellten sicher, daß die

Fusionsproteine in Folge ihrer Größe nicht in den Kern diffundieren konnten. *EGD1-2GFP* und *EGD2-2GFP* wurden beide mit ihrem endogenen Promotor in ARS-CEN-Plasmide kloniert, um eine Expression auf physiologischem Niveau zu gewährleisten. Die Expression der GFP-Fusionsproteine wurde mittels SDS/PAGE und Western Blots mit Antikörpern gegen die NAC-Proteine sowie gegen GFP überprüft. Die Fusionsproteine besaßen wie die nativen Proteine die Fähigkeit, an Ribosomen zu binden (keine Abbildung).

Transformierte man Wildtypzellen oder die entsprechenden Deletionsstämme, die nach der Transformation hinsichtlich der NAC-Gene dem Wildtyp entsprachen, mit diesen Plasmiden, wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie ein cytosolisches Signal beobachtet (Abbildung 12A und B, oberer Teil). Weder *Egd1p-2GFP* noch *Egd2p-2GFP* befanden sich in den Kernen, die mit Hoechst 2583 gegengefärbt wurden. Die Vakuolen waren jeweils frei von einem GFP-Signal.

4.9. *Egd1p-2GFP* und *Egd2p-GFP* sind im Kern lokalisiert, wenn ihre Ribosomenbindung aufgehoben wird

Es wurde nachfolgend untersucht, wie sich *Egd1p-2GFP* und *Egd2p-2GFP* verhalten, wenn die Bindung an Ribosomen verhindert wurde. Dies geschah im Falle von *Egd2p* durch Expression des GFP-Fusionsproteins im *Δegd1Δegd2Δbtt1*-Stamm. Aus den Ergebnissen der Zellfraktionierungen war bekannt, daß bei Fehlen von *Egd1p*, *Egd2p* nicht an Ribosomen binden kann. Unter diesen Bedingungen wurde neben dem cytosolischen Signal eine Kernfärbung detektiert (Abbildung 12A, unterer Teil). Auch die Überexpression von *Egd2p-2GFP* unter Kontrolle des starken, durch Kupfer induzierbaren CUP-Promotors in Wildtypzellen, führte zur Kernfärbung der Zellen (nicht gezeigt).

Diffusionseffekte konnten durch die Größe der Fusionsproteine (ca. 70 kDa) ausgeschlossen werden. Es wurde deshalb geschlußfolgert, daß *Egd2p-2GFP* durch aktiven Transport in den Kern gelangt war.

Die Ribosomenbindung von *Egd1p* konnte entsprechend den Resultaten der Zellfraktionierungen durch Deletion der ersten 11 N-terminalen Aminosäuren aufgehoben werden. Im Gegensatz zum vollständigen *Egd1p-2GFP*, das im Wildtyp sowie in der NAC-Dreifachdeletionsmutante ausschließlich im Cytosol lokalisiert war, akkumulierte $\Delta N11$ -*Egd2p-2GFP* deutlich im Kern, im Cytosol wurde nur ein schwaches Fluoreszenzsignal detektiert. (Abbildung 12C). Die Vakuolen aller Stämme dieses Versuches waren signalfrei, was neben den Kontrollen durch Western Blots dafür spricht, daß die GFP-Fusionsproteine in

der Zelle stabil waren. Eine Überexpression von Egd1p-2GFP mit Hilfe des CUP- oder GAL-Promotors zum Zwecke der Herstellung eines erhöhten Verhältnisses von Egd1p zu Egd2p war nicht möglich. Western Blot-Analysen mit Antikörpern gegen Egd1p oder GFP ergaben keine Proteinmengen über dem Wildtypniveau, selbst bei Induktion der Proteinexpression über Nacht (nicht gezeigt). Möglicherweise erfolgte eine Regulation der ribosomenbindenden Untereinheit des NAC in Abhängigkeit von der Anzahl der Ribosomen (siehe Diskussion).

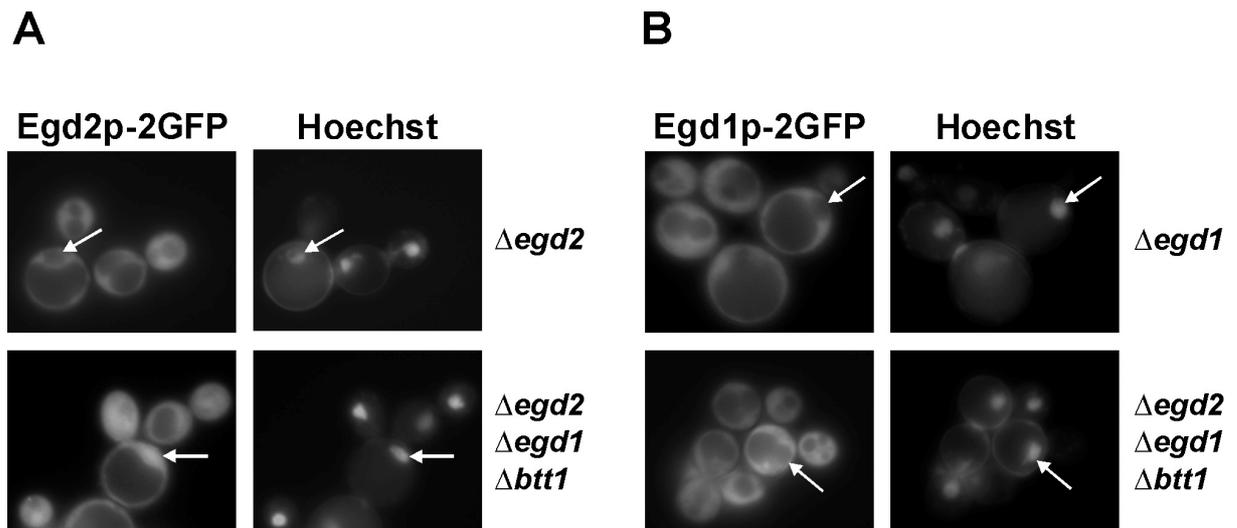
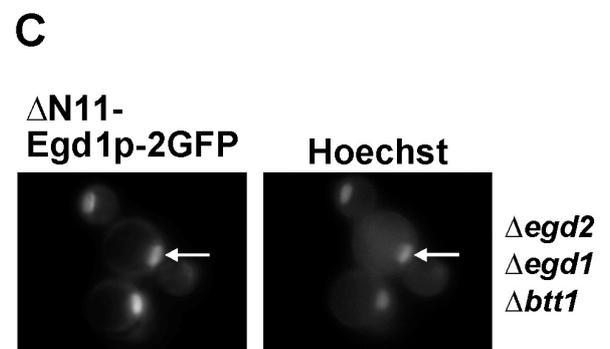


Abbildung 12: Lokalisation von Egd2p-2GFP (A), Egd1p-2GFP (B) und ΔN11 -Egd1p-2GFP (C) mittels Fluoreszenzmikroskopie in angezeigten Stämmen. Die Zellen wurden bei 30°C bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Zur Anfärbung von DNA wurde die Zellen kurz vor dem Mikroskopieren mit Hoechst 33258 inkubiert. Die Positionen einiger Kerne sind durch Pfeile gekennzeichnet.



Zusammenfassend kann man feststellen, daß die Untereinheiten des *S. cerevisiae*-NAC im Kern lokalisiert sind, wenn ihre Ribosomenbindung durch Fehlen des Vermittlers der Bindung (Egd1p im Falle von Egd2p) oder der Bindungsdomäne (N11 im Falle von Egd1p) gestört ist.

4.10. Der *in vitro*-Kernimport von Egd1p und Egd2p ist energieabhängig und wird durch verschiedene Importin α -Proteine vermittelt

Der Kernimport der NAC-Proteine wurde näher untersucht. Es sollte zunächst geklärt werden, ob Egd1p und Egd2p über den klassischen Importweg in den Kern transportiert werden. Das wurde mit Hilfe eines *in vitro*-Importassays in HeLa Zellen getestet (Adam et al., 1990; Jäkel und Görlich, 1998; Köhler et al., 1999). In diesem etablierten Testsystem wurden HeLa-Zellen durch Digitonin permeabilisiert und das Cytosol ausgewaschen. Fluoreszenz-markierte Substrate, alle notwendigen Importfaktoren sowie Energie wurden zu den adhärenen Gewebezellen gegeben. Das Fluoreszenzsignal konnte nach Fixierung der Zellen über konfocale Mikroskopie ausgewertet werden.

Für diese Experimente wurden Egd1p und Egd2p rekombinant in *E.coli* exprimiert, aufgereinigt und mit Fluorescein-5'-Maleimid markiert. Die Wirkung einzelner rekombinanter humaner Importin α -Isoformen bzw. die des einzigen existierenden Importin α aus *S. cerevisiae* (Srp1p) auf die Lokalisierung der Substrate wurde beobachtet. Markiertes Protein, das nicht in den Kern gelangte, wurde nach der Transportreaktion herausgewaschen. Die humanen Importine $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 7$ oder das Hefe-Importin α Srp1p konnten Egd1p und Egd2p in den Kern transportieren, es wurde ein Fluoreszenzsignal im Kern detektiert (Abbildung 13: a, b, d, e, m, n, p, q). Importin β allein konnte keinen Import der Substrate verursachen (s, t). Die humanen Importine $\alpha 4$ und $\alpha 5$ waren ebenfalls nicht fähig, Egd1p und Egd2p in den Kern zu importieren (g, h, j, k), obwohl sie das Kontrollsubstrat Nucleoplasmin in den Kern transportierten (i, l).

Die Spezifität des Transports wurde dadurch bestätigt, daß das klassische Imports substrat Nucleoplasmin mit Egd2p in diesem *in vitro*-assay um einen der ermittelten Transportfaktoren konkurriert. Zu einer konstanten Menge von Fluorescein-markiertem Egd2p wurde eine äquimolare Menge, ein dreifacher bzw. ein zehnfacher Überschuß an Texas Red-markiertem Nucleoplasmin gegeben und diese Substratmischung im Importassay mit Importin $\alpha 1$ beobachtet. Während bei einem äquimolarem Verhältnis von Egd2p und Nucleoplasmin beide Substrate deutlich im Kern lokalisiert waren, konnte bei einem dreifachen Überschuß an Nucleoplasmin nur noch ein schwaches Fluoreszenzsignal von Egd2p detektiert werden. Wurde ein zehnfacher Überschuß von Nucleoplasmin eingesetzt, verdrängte Nucleoplasmin das Substrat Egd2p vollständig (Abbildung 14).

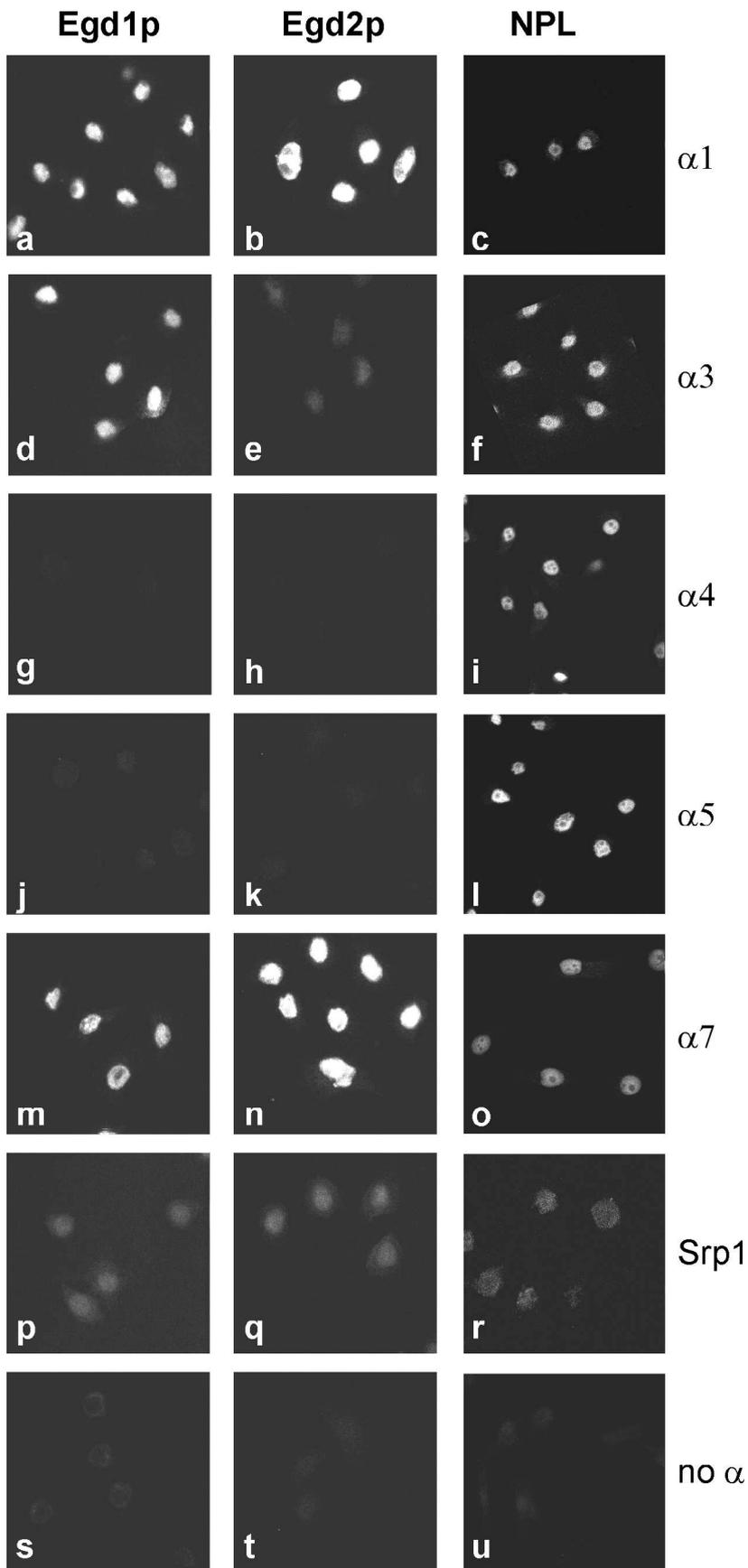


Abbildung 13: *In vitro*-Kernimport von rekombinatem Egd1p und Egd2p. Rekombinantes Egd1p, Egd2p sowie Nucleoplasmin als Kontrollsubstrat wurden mit Fluorescein-5'-Maleimid markiert und mit Hilfe rekombinanter Importfaktoren sowie Energie in Digitonin-permeabilisierte HeLa-Zellen transportiert. Nach Fixierung der Zellen wurde das Fluoreszenzsignal mittels konfokaler Mikroskopie analysiert. Die Abhängigkeit des *in vitro*-Kernimports von Egd1p von verschiedenen Importin α -Proteinen ist in der linken Säule dargestellt. Die mittlere Säule zeigt den *in vitro*-Import von Egd2p und die rechte Säule den des Kontrollsubstrates Nucleoplasmin (NPL). Die Abbildungen s, t und u repräsentieren die zugehörigen Negativkontrollen (Importansatz ohne Zusatz von Importin α).

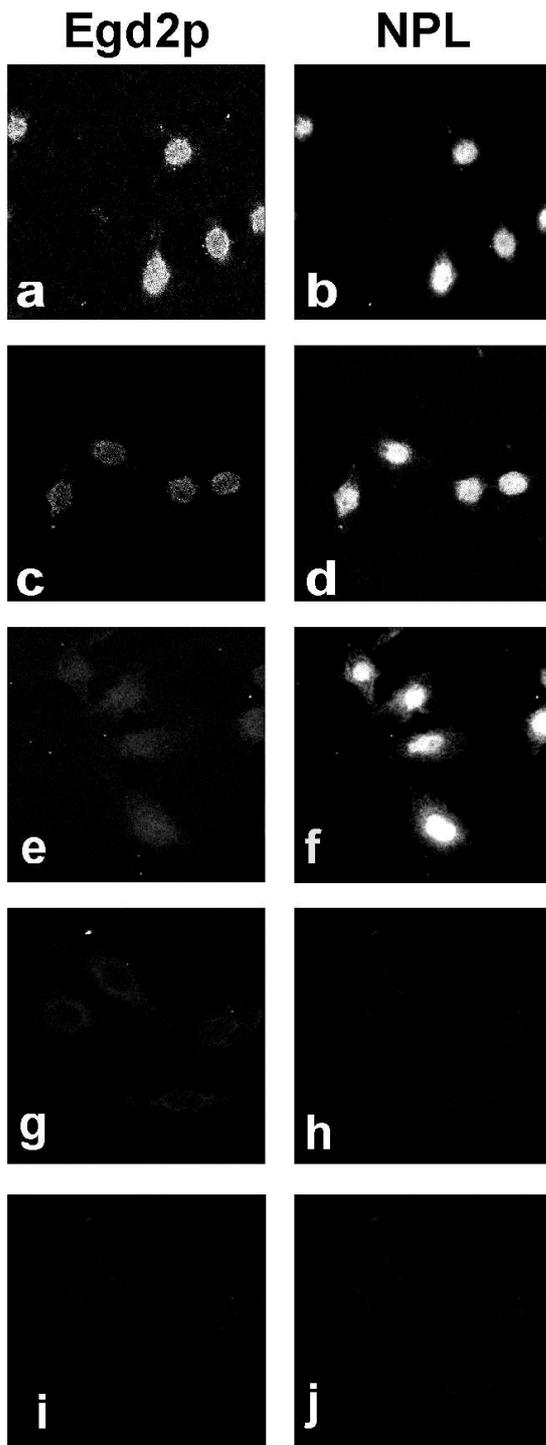


Abbildung 14: *In vitro*-Kernimport von rekombinantem Egd2p unter gleichzeitiger Zugabe unterschiedlicher Mengen Nucleoplasmin. Rekombinantes Egd2p wurde durch Fluorescein-5'-Maleimid, Nucleoplasmin durch Texas Red markiert. Zu konstanten Mengen Egd2p wurde das Kontrollsubstrat Nucleoplasmin in äquimolaren Mengen (a, b), 3-fachem (c, d) bzw. 10-fachem Überschuß (e, f) gegeben und der *in vitro*-Kernimport beider Substrate in Abhängigkeit von Importin α 1/Rch1 beobachtet (a – f). In den Teilabbildungen g und h werden Importansätze ohne Importin α 1 dargestellt. i und j zeigen Importansätze, die in Abwesenheit von Energie stattfanden. Der Kernimport wurde wie in Abbildung 13 bzw. Material und Methoden 3.2.18. beschrieben, durchgeführt. Das Fluoreszenzsignal wurde durch konfocale Mikroskopie ausgewertet.

Die *in vitro*-Versuche demonstrierten, daß einzelne Untereinheiten des *S. cerevisiae*-NAC über den Importin α/β -vermittelten Weg in den Kern importiert werden können.

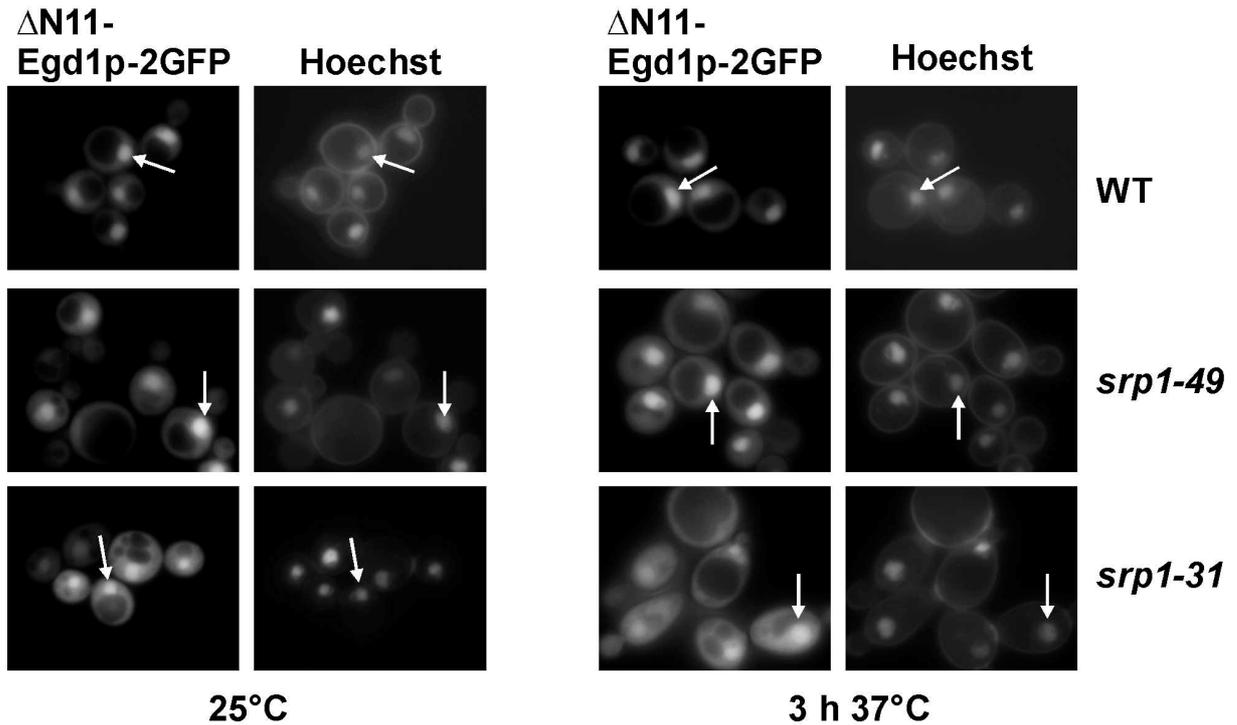
4.11. Der *in vivo*-Import von Egd1p in den Kern ist in verschiedenen Kernimportmutanten gehemmt

Ziel weiterer Versuche war es, einen möglichen Kerntransport von NAC-Untereinheiten *in vivo* nachzuweisen. In *S. cerevisiae* existierten Mutanten für verschiedene Faktoren des Kernimports. Srp1p, das Hefe-Importin α , ist essentiell. Es waren zwei temperatursensitive Mutanten verfügbar, *srp1-31* und *srp1-49*, deren Einfluß auf den Proteinimport in den Kern bekannt war (Loeb et al., 1995; Shulga et al., 1996; Tabb et al., 2000).

Wie unter II.4.9. beschrieben, wurde eine Kernlokalisierung der NAC-Untereinheiten nur beobachtet, wenn die Bindung an das Ribosom nicht möglich war. Unter Wildtypbedingungen, d.h. im steady state sind Egd1p und Egd2p cytosolisch lokalisiert. Der stärkste Effekt der Kernlokalisierung trat bei einem um 11 N-terminale Aminosäuren verkürztem Egd1p-2GFP auf. Es wurde deshalb dieses Protein ausgewählt, um die *in vivo*-Situation zu verfolgen. Δ N11-EGDI-2GFP wurde unter dem eigenen Promotor in *srp1-31* und *srp1-49* transformiert. Die Transformanten wurden bei 25° C angezogen und nachfolgend 3 h bei nicht-permissiver Temperatur geschüttelt. In *srp1-49* Zellen wurde kein Unterschied in der Intensität der Kernfärbung gegenüber dem Wildtyp festgestellt (Abbildung 15A, 2. Reihe). Bei der *srp1-31*-Mutante konnte eine geringe Abnahme des Kernsignals und eine geringe Zunahme des cytosolischen Signals beobachtet werden (Abbildung 15A, 3. Reihe). Dieser relativ kleine Effekt kann einerseits auf die sehr starke, bei permissiver Temperatur bestehende Akkumulation im Kern zurückgeführt werden. Andererseits ist es möglich, daß weitere Faktoren für den Kernimport für Egd1p verantwortlich sind. Einige Eigenschaften der NAC-Proteine wie Größe und Lokalisation ähneln denen von ribosomalen Proteinen. Letztere können durch zwei Importin β -ähnliche Faktoren, Kap123p und Pse1p, in den Kern transportiert werden (Rout et al., 1997; Schlenstedt et al., 1997; Seedorf und Silver, 1997; Stage-Zimmermann et al., 2000). Diese beiden Faktoren können ohne die Hilfe von Adaptormolekülen an Transportsubstrate binden und diese in den Kern transportieren. Für den „nicht-klassischen“ Transport sind bisher keine konservierten NLS beschrieben worden. Der Test der Mutanten Δ kap123 und *pse1-1* ergab, daß das Kernsignal von Δ N11-Egd1p-2GFP in den beiden Stämme reduziert wurde (Abbildung 15B). Das cytosolische Signal dagegen nahm zu.

NAC-Proteine sind demnach fähig über mehrere Routen in den Kern zu gelangen.

A



B

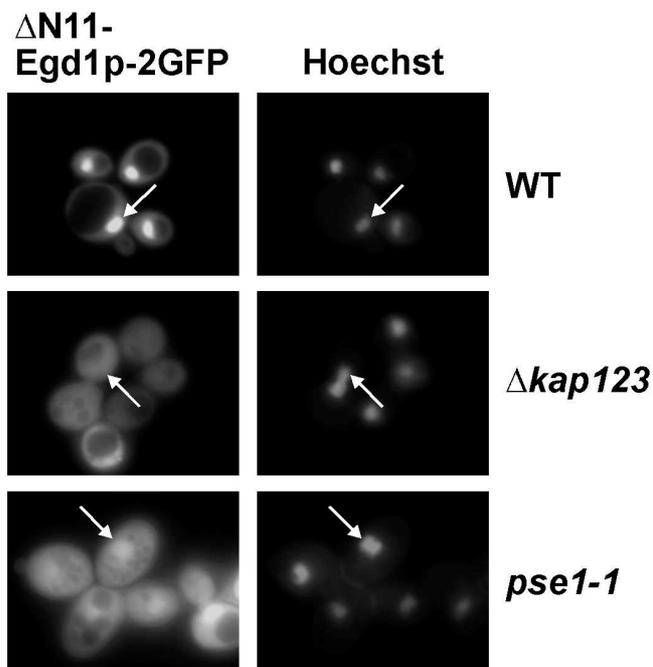


Abbildung 15: Lokalisierung von Δ N11-Egd1p-2GFP in Kernimportmutanten durch Fluoreszenzmikroskopie. **A:** Einfluß von Mutationen in *SRP1* auf den *in vivo*-Kernimport von Δ N11-Egd1p-2GFP. Wildtyp-, *srp1-49*- und *srp1-31*-Zellen wurden jeweils mit einem Δ N11-*EGD1*-haltigem Plasmid transformiert, bei 25° C angezogen (linke Teilabbildung) und nachfolgend für 3 h bei 37° C inkubiert (rechte Teilabbildung). **B:** Einfluß von Mutationen in *KAP123* und *PSE1* auf den Kernimport von Δ N11-Egd1p-2GFP. Wildtyp-, Δ *kap123*- und *pse1-1*-Zellen wurden mit einem Δ N11-*EGD1*-haltigen Plasmid transformiert und bei 25° C angezogen. Vor der Mikroskopie wurde die Zellsuspension für 5 min mit dem Kern-DNA-Farbstoff Hoechst 33258 inkubiert. Die Positionen einiger Kerne sind durch Pfeile markiert.

4.12. Die Deletion der ersten 14 Aminosäuren von Egd1p-2GFP verhindert den Kap123p/Pse1p-abhängigen Kernimport

Es wurden GFP-Fusionen von den Verkürzungen $\Delta N14$ -Egd1p, $\Delta N27$ -Egd1p und $\Delta N44$ Egd1p hergestellt, um eine mögliche Kernimportdomäne zu identifizieren. Mittels Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen konnte festgestellt werden, daß die Kernakkumulation von $\Delta N14$ -Egd1p-2GFP im Vergleich zu der um 11 Aminosäuren verkürzten Version von Egd1p-2GFP stark reduziert war. Die cytosolische Fluoreszenz dagegen nahm zu (Abbildung 16A, 2. Reihe). Bei Verkürzung von Egd1p um weitere 13 Aminosäuren ($\Delta N27$ -Egd1p-2GFP) wurde dieser Effekt geringfügig verstärkt (Abbildung 16, 3. Reihe). $\Delta N44$ -Egd1p-2GFP zeigte das gleiche Verhalten wie $\Delta N27$ -Egd1p-2GFP (nicht gezeigt). Es wurde geschlußfolgert, daß sich die für den Kernimport benötigte Domäne zwischen den Aminosäuren 11 und 27 befindet. Die Kerne der untersuchten Stämme waren jedoch nie ganz frei, was wiederum auf die Existenz multipler Transportwege hindeutete. Das verbleibende Kernsignal könnte durch den Srp1p-abhängigen Importmechanismus verursacht worden sein.

Zur Beantwortung der Frage, wie sich die importunfähige Deletionsmutante des Egd1p in den untersuchten Kernimportmutanten verhält, wurde $\Delta N14$ -EGD1-2GFP in $\Delta kap123$ und $pse1-1$ transformiert. Die Lokalisierung des Fluoreszenzsignals änderte sich im Vergleich zum Wildtyp nicht (selbst bei nicht-permissiver Temperatur im Falle von $pse1-1$) (Abbildung 16B). Die Kerne wiesen trotz der Deletion der vermutlichen Kernlokalisierungsdomäne immer noch eine leichte Färbung auf. Aufgrund der begrenzten Lebensfähigkeit der *SRP1*-Mutanten bei nicht-permissiver Temperatur war keine Aussage über die Srp1p-Abhängigkeit des im Kern verbliebenen Anteils an GFP-Fusionsprotein möglich.

Es konnte somit die Region zwischen den Aminosäuren 11 und 27 eingekreist werden, die für den Kap123p/Pse1p abhängigen Kernimport von Egd1p essentiell ist.

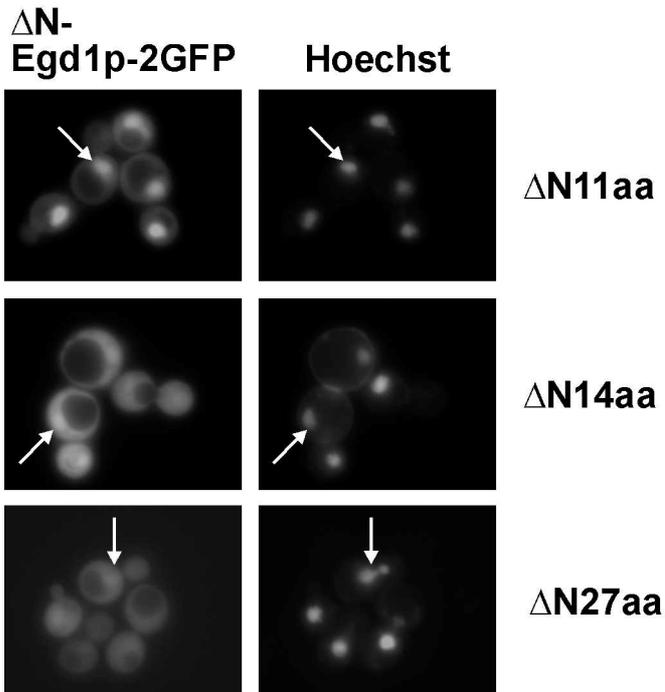
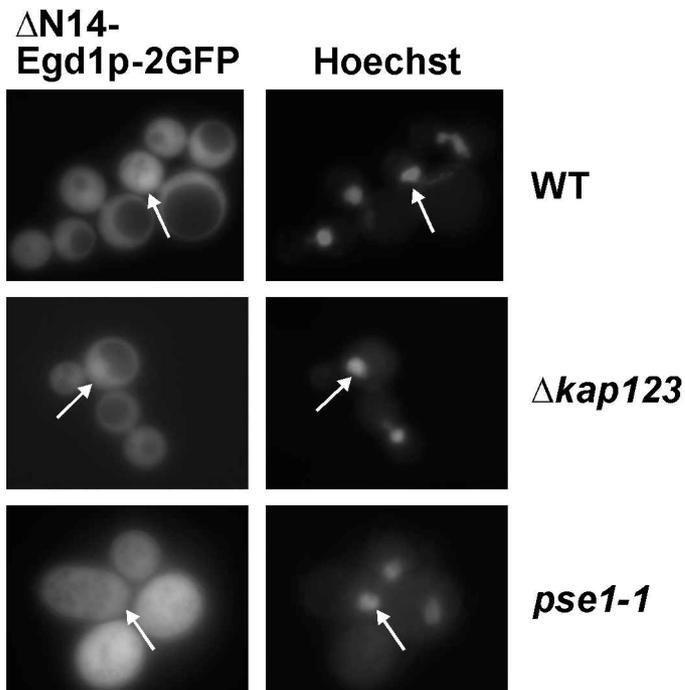
A

Abbildung 16: Identifizierung der Domäne, die für den Kernimport von Egd1p essentiell ist. **A:** Lokalisierung der rechts angezeigten N-terminalen Verkürzungen von Egd1p-2GFP in der NAC-Dreifachdeletionsmutante mit Hilfe von Fluoreszenzmikroskopie. Mit den jeweiligen Plasmiden transformierte Zellen wurden bis zur logarithmischen Phase bei 30°C angezogen. **B:** Einfluß von Mutationen in *KAP123* und *PSE1* auf den Kernimport von Δ N14-Egd1p-2GFP. Wildtyp-, Δ kap123- und *pse1-1*-Zellen wurden mit dem Plasmid transformiert, das für Δ N14-Egd1p-2GFP codiert. Der Stamm wurde bei 25° C angezogen. *pse1-1*-Zellen wurden für 3h bei 37°C inkubiert. Zur Anfärbung von Kern-DNA wurden die Zellen kurz mit Hoechst 33258 inkubiert. Die Positionen einiger Zellkerne sind durch Pfeile markiert.

B

5. Diskussion

5.1. NAC aus *S. cerevisiae* spielt eine Rolle in der Regulation des cotranslationalen Proteintransportes in das ER

NAC ist evolutionär konserviert. Homologe des von Wiedmann et al. (1994) identifizierten Säuger-Komplexes oder einzelner Untereinheiten wurden in Insekten, Pflanzen, Ascomyceten, Protozoen und Archaeobakterien gefunden. Aufgrund ihrer einfachen genetischen Manipulierbarkeit und weiten Verbreitung als zellbiologischer, eukaryontischer Modellorganismus wurde für eine weitere Untersuchung des Komplexes die Hefe *S. cerevisiae* ausgewählt.

Der Säuger-Komplex wurde in Assoziation mit dem Ribosom gefunden. Dort schützt er die naszierende Kette chaperonartig vor vorzeitigen Interaktionen mit cytosolischen Faktoren und verhindert die ER-Membranbindung von Ribosomen, die nicht-sekretorische Proteine translatieren (Lauring et al., 1995a; Lauring et al., 1995b; Möller et al., 1998b; Wang et al., 1995; Wiedmann et al., 1994). Sobald die Signalsequenz eines sekretorischen Substrates vollständig translatiert ist, kann SRP an die naszierende Kette binden und NAC verdrängen (Wang et al., 1995). NAC wird nicht mehr an Proteinketten gefunden, die das Ribosom verlassen haben.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit können den *S. cerevisiae*-Homologen des NAC, ähnlich wie dem Säuger-Komplex, eine Funktion in der Regulation des cotranslationalen Transportes von Proteinen in das ER zugeschrieben werden. Andere Arbeitsgruppen konnten eine Funktion des Hefe-NAC am Ribosom bestätigen. Sie fanden heraus, daß NAC auch eine Rolle im Proteintransport in die Mitochondrien spielt (Fünfschilling und Rospert, 1999; Gautschi et al., 2001).

Ein erster wichtiger Hinweis für die Funktion des Hefe-NAC am Ribosom ist das Ergebnis, daß die Untereinheiten im Komplex vorliegen und sich 95 % des Komplexes am Ribosom befinden. Die drei beteiligten Proteine Egd2p (homolog zum Säuger- α NAC), Egd1p und Btt1p (Homologe des β NAC) assoziieren sehr stark miteinander. Co-Immunpräzipitationen und Gelfiltrationen sprechen für Dimere aus Egd2p und Egd1p bzw. Btt1p oder Trimere aus zwei Molekülen Egd2p und jeweils einem Molekül der β -Homologen. Die Komplexe sind selbst nach Behandlung mit 500 mM KOAc noch intakt. Auch die Ribosomenassoziation ist relativ fest. NAC kann erst durch zweimaliges Hochsalzwaschen vollständig vom Ribosom gelöst werden. Durch biochemische Fraktionierung unterschiedlicher Deletionsmutanten

wurde festgestellt, daß Egd1p die Untereinheit des Komplexes ist, die die Ribosomenbindung vermittelt. Die zweite β -Untereinheit Btt1p kann diese Aufgabe nur bedingt übernehmen, da sie in ca. 100-fach geringerer Konzentration in der Zelle vorliegt (Ergebnis B.Reimann). Aus diesem Grund lag der Schwerpunkt dieser Arbeit auf den beiden Hauptkomponenten des NAC, Egd1p und Egd2p.

Quervernetzungsexperimente zeigen in dieser Arbeit, daß Egd1p und Egd2p in Wildtypcytosol an kurze naszierende Ketten, die das Ribosom noch nicht verlassen haben, binden können. Fehlt Egd1p im Translationslysate kann keine Quervernetzung der naszierenden Kette zum freien Egd2p detektiert werden. Mittlerweile konnte auch im Säuger nachgewiesen werden, daß die β -Untereinheit den ribosomenbindenden Faktor darstellt (Beatrix et al., 2000).

Neueste Ergebnisse (B. Wiedmann), die nicht in den Ergebnisteil dieser Arbeit eingegangen sind, zeigen, daß Egd1p an ribosomale RNA bindet. In Northwestern Blots kann auch eine Bindung an DNA nachgewiesen werden. Immunpräzipitierte Komplexe sind jedoch eindeutig mit ribosomaler RNA assoziiert. Die Assoziation mit ribosomaler RNA kann nur für Egd1p, nicht für Egd2p oder verkürztem Egd1p, das nicht an Ribosomen bindet, nachgewiesen werden.

In Egd1p werden mit hoher Wahrscheinlichkeit helicale Strukturen vorausgesagt (PredictProtein Server, Columbia Universität). Besonders hervorzuheben ist der N-terminale Bereich zwischen den Aminosäuren 4 und 17. Diese Region enthält ein evolutionär konserviertes KLXKL-Motiv. Diese α -Helix mit exponierten, positiven Resten könnte eine Interaktion mit RNA bzw. *in vitro* mit Nucleinsäuren jeder Art vermitteln. Dieses Motiv wird durch N-terminale Verkürzung des Egd1p um 11 Aminosäuren zerstört. Es kann in dieser Arbeit gezeigt werden, daß die Ribosomenbindung des Egd1p dabei fast vollständig verhindert wird. Die Korrelation zwischen der Ribosomenbindung und der Fähigkeit des Proteins ribosomale RNA zu binden, impliziert, daß NAC über den N-terminalen Bereich von Egd1p durch Bindung ribosomaler RNA am Ribosom assoziiert wird. Diese Aussage gewinnt an Gewicht, wenn man beachtet, daß das Ribosom direkt (Beckmann et al., 1997), vermutlich über 28S rRNA (Prinz et al., 2000b) an Sec61p, die Hauptkomponente des ER-Translokationskanals bindet. Die Theorie der M-site am Ribosom (Membrane attachment site) (Lauring et al., 1995a; Möller et al., 1998a; Möller et al., 1998b) könnte damit wie folgt erweitert werden: die Autoren schlagen vor, daß NAC die M-site solange bedeckt bis eine Signalsequenz das Ribosom verlassen hat. Dann bindet SRP an das Signal und verdrängt

NAC von der M-site. SRP verursacht einen Arrest der Translationselongation, welcher die Faltung des Substrates verhindert bevor es in den Translokationskanal gelangt.

Nähert sich das Ribosom der Membran, geht der SRP-Rezeptor mit SRP eine Bindung ein und entfernt SRP von der M-site. Das Ribosom kann mit Sec61p assoziieren, die Translation mit ungebremsster Geschwindigkeit fortgesetzt werden. Damit würde der SRP-Rezeptor eine wichtige Rolle in der Regulation der Zugänglichkeit der M-site spielen.

Die Funktion des NAC als der Faktor, der die Bindung von Komplexen aus naszierender Kette und Ribosom an die Membran des ER verhindert, ist umstritten. Es wurden verschiedene Systeme angewandt, die einen unterschiedlichen Einfluß von NAC auf die Regulation der Membranbindung zeigten. Zum einen wurden in Reticulocyten- oder Weizenkeimlysat Substrate translatiert und *in vitro* in Mikrosomen aus Hundepankreas transloziert. Die Membranen wurden bei Experimenten, in denen in Abhängigkeit von NAC die Bindung von RNCs an das ER untersucht wurde, durch unterschiedliche Methoden (EDTA oder Puromycin-Behandlung) von endogenen Ribosomen befreit. NAC mußte außerdem durch Hochsalzbehandlung vollständig von Ribosomen abgewaschen werden, da eine genetische Deletion des NAC in Säugerzellen ungleich aufwendiger ist als in Hefe. Möller et al. (1998) zeigten, daß für einen *in vitro*-Nachweis der Funktion des NAC physiologische Konzentrationen des Komplexes notwendig sind.

Experimente, die in Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurden, können den Einfluß des NAC auf die Membranbindung von RNCs in einem komplett homologen Hefe-System zeigen. Dazu wurden in Hefelysate des Wildtyps oder der Dreifachdeletionsmutante kurze Hefesubstrate translatiert und die Bindung der Translationsintermediate an Hefemembranen über ihr Flotationsverhalten getestet. Ein Signalsequenz-enthaltendes Substrat wie Wildtyp-Invertase oder Präpro- α -Faktor wird unabhängig von der Anwesenheit von NAC korrekt an die Membranen gebunden und flotiert mit ihnen in einem hochmolaren Saccharose-Kissen. Dagegen werden RNCs signalsequenzloser Substrate erwartungsgemäß sedimentiert, wenn NAC im Lysat vorhanden ist. Fehlt NAC, können die Translationsintermediate an die mikrosomalen Membranen binden und mit ihnen flotieren. Werden die Substrate in einem Lysat translatiert, das nur Egd1p enthält, wird diese Fehlleitung nicht beobachtet. Egd1p allein kann demnach die Bindung von translatierenden Ribosomen an Membranen verhindern.

NAC ist nicht essentiell in *S. cerevisiae*. Der einzige beobachtete Wachstumsphänotyp tritt nur dann auf, wenn Egd2p bei 37° C ohne Bindungspartner vorliegt und wird wahrscheinlich durch die veränderte intrazelluläre Lokalisation (siehe II.5.2.) verursacht. Unklar ist, welche

Rolle Btt1p spielt, da das Vorhandensein des Proteins diesen Effekt aufheben kann, obwohl es in hundertfach geringerer Konzentration als Egd1p nachgewiesen wurde.

In vivo-Experimente (B. Wiedmann, nicht gezeigt) konnten eine Fehlsekretion signalsequenzloser Invertase bei Fehlen von NAC nicht bestätigen. Möglich ist, daß andere Faktoren bestimmte Funktionen des NAC in der Zelle übernehmen können. Ein synthetischer letaler Screen, der jedoch nur mit *EGD2* durchgeführt wurde, erbrachte keine Ergebnisse (eigene Ergebnisse, nicht gezeigt).

5.2. NAC wird in *S. cerevisiae* aktiv in den Kern transportiert

Einzelne Untereinheiten des NAC werden in Verbindung mit der Regulation von Transkriptionsvorgängen gebracht. So wurde die α -Untereinheit des Säuger-NAC als Coaktivator der c-jun vermittelten Transkription in Knochengewebe gefunden (Moreau et al., 1998). Eine längere Spleißform der α -Untereinheit wird in Muskelzellen exprimiert und soll dort als spezifischer Transkriptionsfaktor wirken (Munz et al., 1999; Yotov und St-Arnaud, 1996). Der β -Untereinheit im Säuger wird eine Rolle als allgemeiner Transkriptionsfaktor zugeschrieben (St-Arnaud und Quelo, 1998; Yotov et al., 1998; Zheng et al., 1987). Auch die Homologen des NAC in *S. cerevisiae* Egd1p (Egd = Enhancer of GAL4 DNA binding), Egd2p und Btt1p wurden als Regulatoren der Transkription identifiziert (Hu und Ronne, 1994; Parthun et al., 1992; Shi et al., 1995). Es wurde hier eine negative Regulation der Transkription von GAL-Genen diskutiert. Neueste Ergebnisse zeigen, daß in *S. pombe* ein dimerer Komplex aus einer α - und β -Untereinheit an X-junction-DNA-Strukturen bindet (Whitby und Dixon, 2001). Alle Erkenntnisse hinsichtlich einer Funktion in der Transkription beruhen jedoch auf *in vitro*-Bindungsstudien an DNA oder relativ unspezifischen Affinitätschromatographien, die die hohe Menge des NAC in Lysaten, die hohe Hydrophobizität der Untereinheiten sowie seine mögliche Chaperontätigkeit nicht berücksichtigen.

Die Funktion als Transkriptionsfaktor impliziert eine nucleoplasmatische Lokalisation. Aus diesem Grund sollte folgende Frage geklärt werden: sind freie Untereinheiten des NAC oder freie Komplexe neben der bekannten cytosolischen Verteilung auch im Kern lokalisiert?

Die intrazelluläre Lokalisation der Untereinheiten des Hefe-NAC konnte *in vivo* durch die Expression von GFP-Fusionsproteinen und Fluoreszenzmikroskopie von lebenden Zellen gezeigt werden. In Wildtypzellen ist eine Kernlokalisation nicht nachweisbar. Auch in Stresssituationen wie Hitze, Kälte oder oxidativem Streß liegt eine ausschließlich cytosolische

Lokalisation vor. Bisher konnte nur durch Yotov et al. (1998) die α -Untereinheit des Säuger-Komplexes im Kern detektiert werden. Die Kernlokalisierung wurde für Osteoblasten beschrieben, deren Medium Serum entzogen wurde. Diese Experimente konnten durch andere Arbeiten nicht bestätigt werden (Beatrix et al., 2000).

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal demonstriert, daß zwei Untereinheiten des Hefe-NAC transient im Kern lokalisiert sind, wenn sie nicht am Ribosom gebunden vorliegen. Das kann im Fall von Egd2p durch Entfernen der ribosomenbindenden Untereinheiten des NAC (Egd1p und Btt1p) oder Überexpression des Egd2p im Wildtyp geschehen. Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß ein Wachstumsphänotyp bei 37° C in dieser Konstellation beobachtet wird, der möglicherweise auf die Kernlokalisierung von Egd2p zurückzuführen ist. Egd1p wird nach Deletion der ersten 11 Aminosäuren (Δ N11-Egd1p-2GFP) nicht mehr am Ribosom gefunden und akkumuliert in diesem Zustand sehr stark im Kern. Im Cytosol wird nur ein sehr geringer Teil des Proteins detektiert. Egd2p-2GFP dagegen weist eine Gleichverteilung des Signals zwischen Kern und Cytoplasma auf. Eine Grund dafür könnte eine Falschfaltung von Egd2p sein, die durch die C-terminale Fusion mit GFP entsteht und keinen oder ineffizienten Transport zur Folge hat.

Proteine bis ca. 45 kDa können durch freie Diffusion in den Kern gelangen (Shulga et al., 2000). Durch die Gegenwart eines Kernlokalisierungssignals (NLS), welches die Bindung an einen löslichen Transportrezeptor und damit den aktiven Transport in den Zellkern ermöglicht, ist der Transport jedoch um ein Vielfaches effizienter. Auch die Untereinheiten des NAC sind mit 18 (Egd1p) bzw. 30 kDa (Egd2p) klein genug, um in den Kern zu diffundieren. Die in dieser Arbeit verwendeten Fusionen mit Doppel-GFP hingegen können aufgrund ihrer Größe nur aktiv in den Kern importiert worden sein. Die Frage des spezifischen, signalvermittelten Transports der Proteine in Originalgröße wurde durch ein *in vitro*-Kernimport-Experiment in permeabilisierten HeLa-Zellen geklärt, in dem die Proteine chemisch markiert als Substrat eingesetzt wurden. Es konnte erstmals gezeigt werden, daß der Import von NAC-Proteinen in den Kern energieabhängig ist und über den "klassischen" Importin α/β -vermittelten Importweg abläuft. Egd1p sowie Egd2p können in diesem Ansatz durch die Säuger-Importin α -Isoformen $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 7$ und etwas schwächer durch das Hefe-Importin α (Srp1p) in den Kern importiert werden. Die Säugerproteine Importin $\alpha 4$ und $\alpha 5$ können die Hefe-NAC-Untereinheiten nicht transportieren, obwohl sie fähig sind, das Standardimports substrat Nucleoplasmin in den Kern zu bringen. Der relativ ineffiziente Transport durch Hefe-Srp1p wurde auch bei anderen Substraten beobachtet (Köhler et al.,

1999). Die Spezifität des Imports von Egd2p wird dadurch bestätigt, daß ein Überschuß von Nucleoplasmin rekombinantes Egd2p von den Importrezeptoren verdrängen kann. Das Fehlen einer "klassischen" NLS in den NAC-Proteinen (Cokol et al., 2000) schließt eine Interaktion mit Importin α nicht aus. Auch andere Substrate ohne eine "klassische" NLS können Importin α -abhängig in den Zellkern gelangen. In der Primärstruktur von RanBP3 z.B., das präferentiell über Importin $\alpha 3$ transportiert wird, ist ebenfalls keine Sequenz zu finden, die Ähnlichkeit zu einer "klassischen" NLS zeigt (Welch et al., 1999).

Spiegelt dieser *in vitro*-Ansatz jedoch auch die *in vivo*-Situation wieder? In Co-Immunpräzipitationen aus HeLa-Cytosol kann humanes α NAC mit Antikörpern gegen $\alpha 1$ /Rch1 nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Es erscheint deshalb wahrscheinlich, daß auch Hefe-NAC-Untereinheiten *in vivo* über diesen Weg in den Zellkern gelangen. Zur detaillierten Beantwortung dieser Frage wurde das Verhalten des um 11 Aminosäuren verkürzten, im Kern lokalisierten Egd1p-GFP-Fusionsproteins (Δ N11-Egd1p-2GFP) in den temperatursensitiven Mutanten des Hefe-Importin α (Srp1p) untersucht. Es ist bekannt, daß in der temperatursensitiven Mutante *srp1-31* der Kernimport von Proteinen mit "klassischer" NLS und der des ribosomalen Proteins L11b gestört ist (Loeb et al., 1995; Shulga et al., 1996; Stage-Zimmermann et al., 2000). In Wildtypzellen akkumuliert Δ N11-Egd1p-2GFP bei permissiver Temperatur im Kern, bei nicht-permissiver Temperatur kann eine Verstärkung des cytosolischen Signals beobachtet werden. Die Mutation *srp1-49* hat keinen Effekt auf den Transport des verkürzten Egd1p-2GFP. Diese Mutante wird jedoch eher in Zusammenhang mit Proteindegradationsdefekten gebracht (Tabb et al., 2000). Für NLS-haltige Substrate wird nur eine schwache Hemmung des Kernimports beschrieben. Für die relativ schwachen Auswirkungen der Mutationen in *SRP1* sind zwei Ursachen möglich. Es ist generell vorstellbar, daß der Export von Egd1p aus dem Kern durch Fehlen der ersten 11 Aminosäuren behindert ist und zwar aufgrund der fehlenden Fähigkeit an einen möglichen Bindungspartner im Kern zu assoziieren. So wäre es möglich, daß die Moleküle, die bei permissiver Temperatur importiert werden, auch bei nicht-permissiver Temperatur im Kern verbleiben. Nur die Menge an neu synthetisiertem Δ N11-Egd1p-2GFP kann von der Blockierung des Kernimportweges beeinflusst werden. Ein verstärktes cytosolisches Signal ist nicht zu erwarten, da die Zelle bei nicht-permissiver Temperatur aufgrund der Essentialität von Srp1p nur eine kurze Lebenszeit besitzt. Eine zweite Erklärungsmöglichkeit besteht darin, daß Egd1p durch einen alternativen Weg in den Kern transportiert wird.

Egd1p und Egd2p besitzen in mancher Hinsicht Ähnlichkeit mit ribosomalen Proteinen: sie sind klein, bilden einen festen Komplex untereinander und assoziieren mit ribosomaler RNA. Sie enthalten wie ribosomale Proteine keine "klassische" NLS und werden doch aktiv in den Zellkern transportiert. Es wurde deshalb das Verhalten von $\Delta N11$ -Egd1p-2GFP in Mutanten getestet, die einen Defekt im Transport ribosomaler Proteine besitzen. In der Literatur ist eine solche Störung in Mutanten von *KAP123* und *PSE1* beschrieben worden. Die Genprodukte Kap123p und Pse1p gehören zur Familie der Importin β -ähnlichen Transportfaktoren. Der Einfluß der beiden Faktoren auf den Kernimport der ribosomalen Proteine L25 und L11b ist bekannt (Rout et al., 1997; Schlenstedt et al., 1997; Seedorf und Silver, 1997; Stage-Zimmermann et al., 2000). Kap123p ist nicht essentiell für die Zelle, so daß die Lokalisation von $\Delta N11$ -Egd1p-2GFP in einer Mutante untersucht werden konnte, deren *KAP123*-Gen im Genom deletiert wurde. Die starke Kernakkumulation des verkürzten Egd1p-GFP-Fusionsproteins ist in dieser Mutante deutlich abgeschwächt und das cytosolische Signal stark erhöht. Bei der temperatursensitiven Mutante *pse1-1* kann ein ähnlicher Effekt schon bei permissiver Temperatur festgestellt werden. Deshalb kann geschlußfolgert werden, daß der Kernimport von Egd1p auch von den beiden Importfaktoren für ribosomale Proteine, Kap123p und Pse1p, abhängig ist. Ein völliges Fehlen des Kernsignals ist jedoch selbst in der Doppelmutante nicht sichtbar (nicht gezeigt). Dies dürfte auf die gleichzeitige Nutzung des Importin α/β -abhängigen Transportweges zurückzuführen sein. Die Existenz paralleler Importwege für ein bestimmtes Substrat wird in der Literatur mehrfach beschrieben. Einige Substrate, wie z.B. Histon H1, benötigen ein Dimer unterschiedlicher Importine für einen effizienten Kerntransport (Jäkel et al., 1999). Andere Proteine können unterschiedliche Importmechanismen nutzen. Dazu gehört u.a. das humane ribosomale Protein L23a, das von vier verschiedenen Rezeptoren – Importin 5, Importin 7, Importin β und Transportin importiert werden kann (Jäkel und Görlich, 1998).

Aufgrund des schwachen Effekts der *SRP1*-Mutanten konnte die für den klassischen Transportweg verantwortliche Domäne von Egd1p nicht ermittelt werden. Dies gelang aber für den Kap123p/Pse1p-vermittelten Transport.

Während eine Verkürzung von Egd1p um die ersten 11 Aminosäuren zu einer Akkumulation des Proteins im Kern führt, wird dieses Kernsignal bei einer weiteren N-terminalen Deletion von nur drei Aminosäuren ($\Delta N14$ -Egd1p-2GFP) drastisch reduziert. Eine Verkürzung des Proteins um weitere 13 Aminosäuren ($\Delta N27$ -Egd1p-2GFP) erbringt eine zusätzliche, aber relativ schwache Reduktion des Kernsignals im Wildtyp, weitere Verkürzungen haben keinen

neuen Effekt (nicht gezeigt). Die Kerne sind jedoch nicht frei von Fluoreszenz. Dieser Anteil an Egd1p könnte von einem Faktor transportiert werden, der ein anderes Importsignal des Egd1p erkennt, z.B. von Srp1p. Die Entfernung von 14 Aminosäuren deletiert das oben erwähnte N-terminal lokalisierte KLXKL-Motiv vollständig. In der Region um Aminosäure 27 des Egd1p befindet sich ein Bereich basischer Aminosäuren, der ebenfalls in allen Homologen des Egd1p zu finden ist.

Der Test der transportineffizienteren Verkürzung $\Delta N14$ -Egd1p-2GFP in den Mutanten von *KAP123* und *PSE1* ergibt keine Änderung der Verteilung im Vergleich zu Wildtypzellen. Ein Teil des Fusionsproteins kann noch immer im Kern detektiert werden. Es kann deshalb davon ausgegangen werden, daß tatsächlich die Region zerstört wurde, die den Import über Kap123p und Pse1p vermittelt. Der N-Terminus von Egd1p zeigt keine Ähnlichkeit zu Kernlokalisierungssequenzen bekannter Importsubstrate von Kap123p/Pse1p. Die Identifizierung der Region von Egd1p, die für den aktiven Transport via Kap123p/Pse1p essentiell ist, impliziert eine direkte Nachbarschaft oder sogar eine Überlappung von Ribosomen- bzw. rRNA-bindender Domäne und der Kernlokalisierungsdomäne. Interessanterweise wird oft eine Parallelität zwischen Kernlokalisierungssignalen und Nucleinsäurebindungsdomänen gefunden (LaCasse und Lefebvre, 1995). Diese Beobachtung steht im Einklang mit der zuvor erwähnten Eigenschaft von Egd1p, über die ersten 11 Aminosäuren an Ribosomen bzw. ribosomale RNA zu binden.

Warum werden NAC-Proteine in den Kern transportiert?

Die anfangs erwähnte transkriptionelle Funktion von NAC-Untereinheiten und/oder ein „Shutteln“ der einzelnen Proteine zwischen Cytoplasma und Kern, z.B. wenn im Cytosol kein Bindungspartner vorliegt, kann nicht ausgeschlossen werden. Es könnten aber auch Prozesse eine zeitweilige Lokalisierung des NAC im Kern erfordern, die mit seiner Funktion am Ribosom in Zusammenhang stehen. Ribosomale Proteine werden im Kern zu ribosomalen Untereinheiten verbunden (Shulman et al., 1973; Warner et al., 1973). Komponenten wie 5S RNPs und SRP, die ebenfalls an der Translation von Proteinen beteiligt sind, werden im Kern zusammengesetzt und von dort wieder ins Cytoplasma transportiert (Ciufo und Brown, 2000; Pederson und Politz, 2000; Politz et al., 2000). In neueren Arbeiten wird die Hypothese vertreten, daß ein Zusammenfügen von Faktoren des Translationsapparates im Kern einen essentiellen Kontrollpunkt darstellt. Es gibt weiterhin Proteine, wie die der SSB-Familie und Zuotin, die ebenfalls im steady state cytosolisch lokalisiert sind, eng mit dem Ribosom assoziieren und transient im Kern nachgewiesen wurden (Gautschi et al., 2001; Pfund et al., 1998; Shulga et al., 1999; Yan et al., 1998).

Es ist vorstellbar, daß NAC einen festen Bestandteil des Ribosoms darstellt und eng mit der Ribosomensynthese verbunden ist. Dafür spricht auch die Beobachtung, daß Egd1p nicht überexprimiert werden kann (eigene Ergebnisse) und daß die Expression von Egd1p bei Fehlen von SRP in ähnlichem Maße reduziert ist wie die ribosomaler Proteine (Mutka und Walter, 2001). Unter Berücksichtigung der hier vorgestellten Ergebnisse kann man die Hypothese aufstellen, daß NAC-Untereinheiten in den Kern transportiert werden, um dort an neu gebildete ribosomale Untereinheiten zu binden. Spekuliert werden könnte, ob eine Bindung von Kernimportfaktoren an ein neu-synthetisiertes NAC-Protein sogar cotranslational oder in unmittelbarer Folge nach der Ablösung vom NAC-translatierenden Ribosom erfolgt.

Die Bindung des NAC an die ribosomalen Untereinheiten im Kern könnte die korrekte Stöchiometrie der Bindungspartner gewährleisten. Vorstellbar wäre in diesem Zusammenhang, daß NAC-Untereinheiten transkriptionsregulatorische Funktionen übernehmen, wenn sie wegen unzureichender Bindestellen im Kern nicht an ribosomale Untereinheiten binden können. Eine Assoziation an ribosomale Untereinheiten im Kern könnte die Konzentration von freiem NAC kontrollieren oder sogar das Vorhandensein freier Komplexe oder Untereinheiten verhindern.

Im Gegensatz zu Ssb1p, welches eine Kernexportsequenz (NES) besitzt, die es ermöglicht über das Exportin Xpo1p den Kern zu verlassen (Shulga et al., 1999; Stade et al., 1997), findet man in NAC-Untereinheiten keine klassische NES. Die Untersuchung verschiedener Exportmutanten wäre sinnvoll, um Mutanten zu finden, in denen ungekürztes Egd1p-2GFP im Kern akkumuliert. Die Lokalisation von NAC-GFP-Fusionsproteinen in einer *xpo1-1*-Mutante ist unverändert (nicht gezeigt). Offen bleibt damit die Frage, wie NAC den Kern verläßt. Ein Export freier Komplexe ist vorstellbar. Das Modell des Transports aus dem Kern in Assoziation mit ribosomalen Untereinheiten wird von uns favorisiert.

6. Zusammenfassung

NAC (Nascent Polypeptide-associated Complex) ist ein Proteinkomplex mit kontrovers diskutierten Funktionen. Säuger-NAC wurde als ein Regulator des cotranslationalen Transports von Proteinen in das Endoplasmatische Retikulum (ER) identifiziert. Daneben existieren Arbeiten, in denen den Untereinheiten des NAC in Säuger und Hefe Funktionen in der Transkriptionskontrolle zugeschrieben werden.

Durch eine Kombination von genetischen und biochemischen Methoden konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß NAC in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* quantitativ mit Ribosomen assoziiert. NAC verhindert in einem homologen *in vitro*-System die ER-Membranbindung von Ribosomen, die nicht-sekretorische Proteine translatieren. Die Abwesenheit von NAC führt *in vitro* zu einer Fehlleitung dieser Substrate an die ER-Membran.

Es wird demonstriert, daß NAC in *S. cerevisiae* aus einem festen, heterodimeren oder trimeren Komplex aus den Proteinen Egd2p und Egd1p sowie Egd2p und Btt1p besteht. Egd1p vermittelt die Ribosomenbindung des gesamten Komplexes. Die Untereinheiten Egd1p und Egd2p können mit kurzen naszierenden Peptidketten quervernetzt werden und befinden sich somit in ihrer unmittelbaren Nähe.

In Wildtypzellen ist NAC ausschließlich cytosolisch lokalisiert. *In vitro*-Import-Versuche ergaben jedoch, daß die zwei untersuchten Untereinheiten Egd1p und Egd2p fähig sind, abhängig von Energie und den klassischen Importrezeptoren Importin α und β in den Zellkern zu gelangen. GFP-Fusionsproteine von Egd1p und Egd2p akkumulieren *in vivo* im Kern, wenn ihre Ribosomenbindung verhindert wird. Der Kernimport eines verkürzten, im Kern lokalisierten Egd1p ist in *KAP123* und *PSE1*-Mutanten, die Defekte im Kerntransport ribosomaler Proteine zeigen, gestört. Es wurde eine Domäne identifiziert, die für den Kap123p/Pse1p-vermittelten Kerntransport essentiell ist. Die Hypothese wurde aufgestellt, daß neu synthetisierte NAC-Proteine in den Kern transportiert werden, um dort an ribosomale Untereinheiten zu binden und den Kern mit ihnen zu verlassen.

7. Literaturverzeichnis

- Alberts, B.** (1994). *Molecular biology of the cell*. New York: Garland Pub.
- Adam, S. A., Marr, R. S. und Gerace, L.** (1990). Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J Cell Biol* **111**, 807-16.
- Allen, T. D., Cronshaw, J. M., Bagley, S., Kiseleva, E. und Goldberg, M. W.** (2000). The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm. *J Cell Sci* **113**, 1651-9.
- Antonin, W., Meyer, H. A. und Hartmann, E.** (2000). Interactions between Spc2p and other components of the endoplasmic reticulum translocation sites of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**, 34068-72.
- Bayliss, R., Ribbeck, K., Akin, D., Kent, H. M., Feldherr, C. M., Görlich, D. und Stewart, M.** (1999). Interaction between NTF2 and xFxFG-containing nucleoporins is required to mediate nuclear import of RanGDP. *J Mol Biol* **293**, 579-93.
- Beatrix, B., Sakai, H. und Wiedmann, M.** (2000). The alpha and beta subunit of the nascent polypeptide-associated complex have distinct functions. *J Biol Chem* **275**, 37838-45.
- Beckmann, R., Bubeck, D., Grassucci, R., Penczek, P., Verschoor, A., Blobel, G. und Frank, J.** (1997). Alignment of conduits for the nascent polypeptide chain in the ribosome-Sec61 complex. *Science* **278**, 2123-6.
- Belhumeur, P., Lee, A., Tam, R., DiPaolo, T., Fortin, N. und Clark, M. W.** (1993). GSP1 and GSP2, genetic suppressors of the prp20-1 mutant in *Saccharomyces cerevisiae*: GTP-binding proteins involved in the maintenance of nuclear organization. *Mol Cell Biol* **13**, 2152-61.
- Ben-Efraim, I. und Gerace, L.** (2001). Gradient of Increasing Affinity of Importin beta for Nucleoporins along the Pathway of Nuclear Import. *J Cell Biol* **152**, 411-8.
- Bernstein, H. D., Poritz, M. A., Strub, K., Hoben, P. J., Brenner, S. und Walter, P.** (1989). Model for signal sequence recognition from amino-acid sequence of 54K subunit of signal recognition particle. *Nature* **340**, 482-6.
- Bischoff, F. R. und Ponstingl, H.** (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* **354**, 80-2.
- Blobel, G. und Dobberstein, B.** (1975). Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. *J Cell Biol* **67**, 835-51.

- Blobel, G., Walter, P., Chang, C. N., Goldman, B. M., Erickson, A. H. und Lingappa, V. R.** (1979). Translocation of proteins across membranes: the signal hypothesis and beyond. *Symp Soc Exp Biol* **33**, 9-36.
- Boeke, J. D., Trueheart, J., Natsoulis, G. und Fink, G. R.** (1987). 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods Enzymol* **154**, 164-75.
- Bohni, P. C., Deshaies, R. J. und Schekman, R. W.** (1988). SEC11 is required for signal peptide processing and yeast cell growth. *J Cell Biol* **106**, 1035-42.
- Borgese, N., Mok, W., Kreibich, G. und Sabatini, D. D.** (1974). Ribosomal-membrane interaction: in vitro binding of ribosomes to microsomal membranes. *J Mol Biol* **88**, 559-80.
- Brodsky, J. L., Goeckeler, J. und Schekman, R.** (1995). BiP and Sec63p are required for both co- and posttranslational protein translocation into the yeast endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9643-6.
- Brodsky, J. L. und Schekman, R.** (1993). A Sec63p-BiP complex from yeast is required for protein translocation in a reconstituted proteoliposome. *J Cell Biol* **123**, 1355-63.
- Brown, J. D., Hann, B. C., Medzihradzsky, K. F., Niwa, M., Burlingame, A. L. und Walter, P.** (1994). Subunits of the *Saccharomyces cerevisiae* signal recognition particle required for its functional expression. *Embo J* **13**, 4390-400.
- Bukau, B., Deuerling, E., Pfund, C. und Craig, E. A.** (2000). Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell* **101**, 119-22.
- Chi, N. C., Adam, E. J. und Adam, S. A.** (1997). Different binding domains for Ran-GTP and Ran-GDP/RanBP1 on nuclear import factor p97. *J Biol Chem* **272**, 6818-22.
- Chirico, W. J., Waters, M. G. und Blobel, G.** (1988). 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* **332**, 805-10.
- Chook, Y. M. und Blobel, G.** (1999). Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp. *Nature* **399**, 230-7.
- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K. und Muller, C. W.** (1999). Structure of importin-beta bound to the IBB domain of importin-alpha. *Nature* **399**, 221-9.
- Ciufo, L. F. und Brown, J. D.** (2000). Nuclear export of yeast signal recognition particle lacking Srp54p by the Xpo1p/Crm1p NES-dependent pathway. *Curr Biol* **10**, 1256-64.
- Cokol, M., Nair, R. und Rost, B.** (2000). Finding nuclear localization signals. *EMBO Rep* **1**, 411-5.
- Connolly, T., Rapiejko, P. J. und Gilmore, R.** (1991). Requirement of GTP hydrolysis for dissociation of the signal recognition particle from its receptor. *Science* **252**, 1171-3.

- Conti, E. und Kuriyan, J.** (2000). Crystallographic analysis of the specific yet versatile recognition of distinct nuclear localization signals by karyopherin alpha. *Structure Fold Des* **8**, 329-38.
- Corbett, A. H., Koepp, D. M., Schlenstedt, G., Lee, M. S., Hopper, A. K. und Silver, P. A.** (1995). Rna1p, a Ran/TC4 GTPase activating protein, is required for nuclear import. *J Cell Biol* **130**, 1017-26.
- Cormack, B. P., Bertram, G., Egerton, M., Gow, N. A., Falkow, S. und Brown, A. J.** (1997). Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP) a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* **143**, 303-11.
- Cuomo, C. A., Kirch, S. A., Gyuris, J., Brent, R. und Oettinger, M. A.** (1994). Rch1, a protein that specifically interacts with the RAG-1 recombination-activating protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6156-60.
- Dalbey, R. E., Lively, M. O., Bron, S. und van Dijl, J. M.** (1997). The chemistry and enzymology of the type I signal peptidases. *Protein Sci* **6**, 1129-38.
- Deng, J. M. und Behringer, R. R.** (1995). An insertional mutation in the BTF3 transcription factor gene leads to an early postimplantation lethality in mice. *Transgenic Res* **4**, 264-9.
- Deshaies, R. J., Sanders, S. L., Feldheim, D. A. und Schekman, R.** (1991). Assembly of yeast Sec proteins involved in translocation into the endoplasmic reticulum into a membrane-bound multisubunit complex. *Nature* **349**, 806-8.
- Deshaies, R. J. und Schekman, R.** (1987). A yeast mutant defective at an early stage in import of secretory protein precursors into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **105**, 633-45.
- Dingwall, C. und Laskey, R. A.** (1991). Nuclear targeting sequences--a consensus? *Trends Biochem Sci* **16**, 478-81.
- Dünnwald, M., Varshavsky, A. und Johnsson, N.** (1999). Detection of transient in vivo interactions between substrate and transporter during protein translocation into the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell* **10**, 329-44.
- Elston, T. C.** (2000). Models of post-translational protein translocation. *Biophys J* **79**, 2235-51.
- Englmeier, L., Olivo, J. C. und Mattaj, I. W.** (1999). Receptor-mediated substrate translocation through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis. *Curr Biol* **9**, 30-41.

- Finke, K., Plath, K., Panzner, S., Prehn, S., Rapoport, T. A., Hartmann, E. und Sommer, T.** (1996). A second trimeric complex containing homologs of the Sec61p complex functions in protein transport across the ER membrane of *S. cerevisiae*. *Embo J* **15**, 1482-94.
- Floer, M., Blobel, G. und Rexach, M.** (1997). Disassembly of RanGTP-karyopherin beta complex, an intermediate in nuclear protein import. *J Biol Chem* **272**, 19538-46.
- Fontoura, B. M., Blobel, G. und Matunis, M. J.** (1999). A conserved biogenesis pathway for nucleoporins: proteolytic processing of a 186-kilodalton precursor generates Nup98 and the novel nucleoporin, Nup96. *J Cell Biol* **144**, 1097-112.
- Fulga, T. A., Sinning, I., Dobberstein, B. und Pool, M. R.** (2001). SRbeta coordinates signal sequence release from SRP with ribosome binding to the translocon. *Embo J* **20**, 2338-2347.
- Fünfschilling, U. und Rospert, S.** (1999). Nascent polypeptide-associated complex stimulates protein import into yeast mitochondria. *Mol Biol Cell* **10**, 3289-99.
- Gautschi, M., Lilie, H., Fünfschilling, U., Mun, A., Ross, S., Lithgow, T., Rucknagel, P. und Rospert, S.** (2001). RAC, a stable ribosome-associated complex in yeast formed by the DnaK- DnaJ homologs Ssz1p and zuotin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 3762-7.
- Glick, B. S.** (1995). Can Hsp70 proteins act as force-generating motors? *Cell* **80**, 11-4.
- Görlich, D.** (1998). Transport into and out of the cell nucleus. *Embo J* **17**, 2721-7.
- Görlich, D., Hartmann, E., Prehn, S. und Rapoport, T. A.** (1992). A protein of the endoplasmic reticulum involved early in polypeptide translocation. *Nature* **357**, 47-52.
- Görlich, D., Henklein, P., Laskey, R. A. und Hartmann, E.** (1996a). A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin- beta and hence transit into the nucleus. *Embo J* **15**, 1810-7.
- Görlich, D., Kurzchalia, T. V., Wiedmann, M. und Rapoport, T. A.** (1991). Probing the molecular environment of translocating polypeptide chains by cross-linking. *Methods Cell Biol* **34**, 241-62.
- Görlich, D. und Kutay, U.** (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 607-60.
- Görlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aebi, U. und Bischoff, F. R.** (1996b). Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *Embo J* **15**, 5584-94.
- Görlich, D., Prehn, S., Laskey, R. A. und Hartmann, E.** (1994). Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import. *Cell* **79**, 767-78.
- Görlich, D., Vogel, F., Mills, A. D., Hartmann, E. und Laskey, R. A.** (1995). Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import. *Nature* **377**, 246-8.

- Gupta, R. S. und Golding, G. B.** (1996). The origin of the eukaryotic cell. *Trends Biochem Sci* **21**, 166-71.
- Guthrie, C. und Fink, G. R.** (1991). Guide to yeast genetics and molecular biology. San Diego: Academic Press.
- Hamman, B. D., Hendershot, L. M. und Johnson, A. E.** (1998). BiP maintains the permeability barrier of the ER membrane by sealing the luminal end of the translocon pore before and early in translocation. *Cell* **92**, 747-58.
- Hanein, D., Matlack, K. E., Jungnickel, B., Plath, K., Kalies, K. U., Miller, K. R., Rapoport, T. A. und Akey, C. W.** (1996). Oligomeric rings of the Sec61p complex induced by ligands required for protein translocation. *Cell* **87**, 721-32.
- Hann, B. C. und Walter, P.** (1991). The signal recognition particle in *S. cerevisiae*. *Cell* **67**, 131-44.
- Hansen, W., Garcia, P. D. und Walter, P.** (1986). In vitro protein translocation across the yeast endoplasmic reticulum: ATP-dependent posttranslational translocation of the prepro-alpha-factor. *Cell* **45**, 397-406.
- Hansen, W. und Walter, P.** (1988). Prepro-carboxypeptidase Y and a truncated form of pre-invertase, but not full-length pre-invertase, can be posttranslationally translocated across microsomal vesicle membranes from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **106**, 1075-81.
- Hartmann, E., Sommer, T., Prehn, S., Görlich, D., Jentsch, S. und Rapoport, T. A.** (1994). Evolutionary conservation of components of the protein translocation complex. *Nature* **367**, 654-7.
- Herold, A., Truant, R., Wiegand, H. und Cullen, B. R.** (1998). Determination of the functional domain organization of the importin alpha nuclear import factor. *J Cell Biol* **143**, 309-18.
- Hetzer, M. und Mattaj, I. W.** (2000). An ATP-dependent, Ran-independent mechanism for nuclear import of the U1A and U2B" spliceosome proteins. *J Cell Biol* **148**, 293-303.
- High, S., Andersen, S. S., Görlich, D., Hartmann, E., Prehn, S., Rapoport, T. A. und Dobberstein, B.** (1993). Sec61p is adjacent to nascent type I and type II signal-anchor proteins during their membrane insertion. *J Cell Biol* **121**, 743-50.
- High, S. und Dobberstein, B.** (1991). The signal sequence interacts with the methionine-rich domain of the 54- kD protein of signal recognition particle. *J Cell Biol* **113**, 229-33.
- High, S. und Dobberstein, B.** (1992). Mechanisms that determine the transmembrane disposition of proteins. *Curr Opin Cell Biol* **4**, 581-6.

- High, S., Lecomte, F. J., Russell, S. J., Abell, B. M. und Oliver, J. D.** (2000). Glycoprotein folding in the endoplasmic reticulum: a tale of three chaperones? *FEBS Lett* **476**, 38-41.
- Hogan, B. L. und Korner, A.** (1968). The role of ribosomal subunits and 80-S monomers in polysome formation in an ascites tumour cell. *Biochim Biophys Acta* **169**, 139-49.
- Hood, J. K. und Silver, P. A.** (1998). Cse1p is required for export of Srp1p/importin-alpha from the nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**, 35142-6.
- Hu, G. Z. und Ronne, H.** (1994). Yeast BTF3 protein is encoded by duplicated genes and inhibits the expression of some genes in vivo. *Nucleic Acids Res* **22**, 2740-3.
- Iovine, M. K. und Wentz, S. R.** (1997). A nuclear export signal in Kap95p is required for both recycling the import factor and interaction with the nucleoporin GLFG repeat regions of Nup116p and Nup100p. *J Cell Biol* **137**, 797-811.
- Izaurralde, E., Jarmolowski, A., Beisel, C., Mattaj, I. W., Dreyfuss, G. und Fischer, U.** (1997). A role for the M9 transport signal of hnRNP A1 in mRNA nuclear export. *J Cell Biol* **137**, 27-35.
- Jäkel, S., Albig, W., Kutay, U., Bischoff, F. R., Schwamborn, K., Doenecke, D. und Görlich, D.** (1999). The importin beta/importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *Embo J* **18**, 2411-23.
- Jäkel, S. und Görlich, D.** (1998). Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *Embo J* **17**, 4491-502.
- Jungnickel, B. und Rapoport, T. A.** (1995). A posttargeting signal sequence recognition event in the endoplasmic reticulum membrane. *Cell* **82**, 261-70.
- Kalies, K. U. und Hartmann, E.** (1998). Protein translocation into the endoplasmic reticulum (ER)--two similar routes with different modes. *Eur J Biochem* **254**, 1-5.
- Kalies, K. U., Rapoport, T. A. und Hartmann, E.** (1998). The beta subunit of the Sec61 complex facilitates cotranslational protein transport and interacts with the signal peptidase during translocation. *J Cell Biol* **141**, 887-94.
- Knauer, R. und Lehle, L.** (1999). The oligosaccharyltransferase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. Isolation of the OST6 gene, its synthetic interaction with OST3, and analysis of the native complex. *J Biol Chem* **274**, 17249-56.
- Kobe, B.** (1999). Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat Struct Biol* **6**, 388-97.
- Köhler, M., Ansieau, S., Prehn, S., Leutz, A., Haller, H. und Hartmann, E.** (1997). Cloning of two novel human importin-alpha subunits and analysis of the expression pattern of the importin-alpha protein family. *FEBS Lett* **417**, 104-8.

- Köhler, M., Speck, C., Christiansen, M., Bischoff, F. R., Prehn, S., Haller, H., Görlich, D. und Hartmann, E.** (1999). Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import. *Mol Cell Biol* **19**, 7782-91.
- Kose, S., Imamoto, N., Tachibana, T., Shimamoto, T. und Yoneda, Y.** (1997). Ran-unassisted nuclear migration of a 97-kD component of nuclear pore-targeting complex. *J Cell Biol* **139**, 841-9.
- Kose, S., Imamoto, N., Tachibana, T., Yoshida, M. und Yoneda, Y.** (1999). beta-subunit of nuclear pore-targeting complex (importin-beta) can be exported from the nucleus in a Ran-independent manner. *J Biol Chem* **274**, 3946-52.
- Kunzler, M. und Hurt, E. C.** (1998). Cse1p functions as the nuclear export receptor for importin alpha in yeast. *FEBS Lett* **433**, 185-90.
- Kurzchalia, T. V., Wiedmann, M., Girshovich, A. S., Bochkareva, E. S., Bielka, H. und Rapoport, T. A.** (1986). The signal sequence of nascent preprolactin interacts with the 54K polypeptide of the signal recognition particle. *Nature* **320**, 634-6.
- Kutay, U., Bischoff, F. R., Kostka, S., Kraft, R. und Görlich, D.** (1997a). Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* **90**, 1061-71.
- Kutay, U., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Mattaj, I. W. und Görlich, D.** (1997b). Dominant-negative mutants of importin-beta block multiple pathways of import and export through the nuclear pore complex. *Embo J* **16**, 1153-63.
- LaCasse, E. C. und Lefebvre, Y. A.** (1995). Nuclear localization signals overlap DNA- or RNA-binding domains in nucleic acid-binding proteins. *Nucleic Acids Res* **23**, 1647-56.
- Lauring, B., Kreibich, G. und Weidmann, M.** (1995a). The intrinsic ability of ribosomes to bind to endoplasmic reticulum membranes is regulated by signal recognition particle and nascent-polypeptide-associated complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 9435-9.
- Lauring, B., Sakai, H., Kreibich, G. und Wiedmann, M.** (1995b). Nascent polypeptide-associated complex protein prevents mistargeting of nascent chains to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 5411-5.
- Lee, A., Tam, R., Belhumeur, P., DiPaolo, T. und Clark, M. W.** (1993). Prp20, the *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the regulator of chromosome condensation, RCC1, interacts with double-stranded DNA through a multi-component complex containing GTP-binding proteins. *J Cell Sci* **106**, 287-98.
- Liebermeister, W., Rapoport, T. A. und Heinrich, R.** (2001). Ratcheting in post-translational protein translocation: a mathematical model. *J Mol Biol* **305**, 643-56.

- Loeb, J. D., Schlenstedt, G., Pellman, D., Kornitzer, D., Silver, P. A. und Fink, G. R.** (1995). The yeast nuclear import receptor is required for mitosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7647-51.
- Lyman, S. K. und Schekman, R.** (1995). Interaction between BiP and Sec63p is required for the completion of protein translocation into the ER of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol* **131**, 1163-71.
- Lyman, S. K. und Schekman, R.** (1996). Polypeptide translocation machinery of the yeast endoplasmic reticulum. *Experientia* **52**, 1042-9.
- Makkerh, J. P., Dingwall, C. und Laskey, R. A.** (1996). Comparative mutagenesis of nuclear localization signals reveals the importance of neutral and acidic amino acids. *Curr Biol* **6**, 1025-7.
- Markesich, D. C., Gajewski, K. M., Nazimiec, M. E. und Beckingham, K.** (2000). bicaudal encodes the *Drosophila* beta NAC homolog, a component of the ribosomal translational machinery*. *Development* **127**, 559-72.
- Martin, W. und Müller, M.** (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* **392**, 37-41.
- Mason, N., Ciuffo, L. F. und Brown, J. D.** (2000). Elongation arrest is a physiologically important function of signal recognition particle. *Embo J* **19**, 4164-74.
- Matlack, K. E., Misselwitz, B., Plath, K. und Rapoport, T. A.** (1999). BiP acts as a molecular ratchet during posttranslational transport of prepro-alpha factor across the ER membrane. *Cell* **97**, 553-64.
- Matlack, K. E., Plath, K., Misselwitz, B. und Rapoport, T. A.** (1997). Protein transport by purified yeast Sec complex and Kar2p without membranes. *Science* **277**, 938-41.
- Melchior, F., Sweet, D. J. und Gerace, L.** (1995). Analysis of Ran/TC4 function in nuclear protein import. *Methods Enzymol* **257**, 279-91.
- Meyer, H. A. und Hartmann, E.** (1997). The yeast SPC22/23 homolog Spc3p is essential for signal peptidase activity. *J Biol Chem* **272**, 13159-64.
- Michael, W. M., Eder, P. S. und Dreyfuss, G.** (1997). The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *Embo J* **16**, 3587-98.
- Miller, J. D., Tajima, S., Lauffer, L. und Walter, P.** (1995). The beta subunit of the signal recognition particle receptor is a transmembrane GTPase that anchors the alpha subunit, a peripheral membrane GTPase, to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **128**, 273-82.

- Miller, J. D., Wilhelm, H., Gierasch, L., Gilmore, R. und Walter, P.** (1993). GTP binding and hydrolysis by the signal recognition particle during initiation of protein translocation. *Nature* **366**, 351-4.
- Möller, I., Beatrix, B., Kreibich, G., Sakai, H., Lauring, B. und Wiedmann, M.** (1998a). Unregulated exposure of the ribosomal M-site caused by NAC depletion results in delivery of non-secretory polypeptides to the Sec61 complex. *FEBS Lett* **441**, 1-5.
- Möller, I., Jung, M., Beatrix, B., Levy, R., Kreibich, G., Zimmermann, R., Wiedmann, M. und Lauring, B.** (1998b). A general mechanism for regulation of access to the translocon: competition for a membrane attachment site on ribosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 13425-30.
- Moore, M. S.** (1998). Ran and nuclear transport. *J Biol Chem* **273**, 22857-60.
- Moore, M. S. und Blobel, G.** (1993). The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* **365**, 661-3.
- Moreau, A., Yotov, W. V., Glorieux, F. H. und St-Arnaud, R.** (1998). nascent polypeptide-associated complex, a coactivator potentiates bone-specific expression of the alpha chain of the c-Jun-mediated transcription. *Mol Cell Biol* **18**, 1312-21.
- Moy, T. I. und Silver, P. A.** (1999). Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. *Genes Dev* **13**, 2118-33.
- Mueckler, M. und Lodish, H. F.** (1986). The human glucose transporter can insert posttranslationally into microsomes. *Cell* **44**, 629-37.
- Müller, G. und Zimmermann, R.** (1987). Import of honeybee prepro-melittin into the endoplasmic reticulum: structural basis for independence of SRP and docking protein. *Embo J* **6**, 2099-107.
- Mullins, C., Meyer, H. A., Hartmann, E., Green, N. und Fang, H.** (1996). Structurally related Spc1p and Spc2p of yeast signal peptidase complex are functionally distinct. *J Biol Chem* **271**, 29094-9.
- Munz, B., Wiedmann, M., Lochmüller, H. und Werner, S.** (1999). Cloning of novel injury-regulated genes. Implications for an important role of the muscle-specific protein skNAC in muscle repair. *J Biol Chem* **274**, 13305-10.
- Mutka, S. C. und Walter, P.** (2001). Multifaceted physiological response allows yeast to adapt to the loss of the signal recognition particle-dependent protein-targeting pathway. *Mol Biol Cell* **12**, 577-88.

- Neuhof, A., Rolls, M. M., Jungnickel, B., Kalies, K. U. und Rapoport, T. A.** (1998). Binding of signal recognition particle gives ribosome/nascent chain complexes a competitive advantage in endoplasmic reticulum membrane interaction. *Mol Biol Cell* **9**, 103-15.
- Newmeyer, D. D., Finlay, D. R. und Forbes, D. J.** (1986). In vitro transport of a fluorescent nuclear protein and exclusion of non-nuclear proteins. *J Cell Biol* **103**, 2091-102.
- Ng, D. T., Brown, J. D. und Walter, P.** (1996). Signal sequences specify the targeting route to the endoplasmic reticulum membrane. *J Cell Biol* **134**, 269-78.
- Nguyen, T. H., Law, D. T. und Williams, D. B.** (1991). Binding protein BiP is required for translocation of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 1565-9.
- Nicchitta, C. V., Migliaccio, G. und Blobel, G.** (1991). Biochemical fractionation and assembly of the membrane components that mediate nascent chain targeting and translocation. *Cell* **65**, 587-98.
- Nilsson, I., Whitley, P. und von Heijne, G.** (1994). The COOH-terminal ends of internal signal and signal-anchor sequences are positioned differently in the ER translocase. *J Cell Biol* **126**, 1127-32.
- Ogg, S. C., Poritz, M. A. und Walter, P.** (1992). Signal recognition particle receptor is important for cell growth and protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **3**, 895-911.
- Paine, P. L., Moore, L. C. und Horowitz, S. B.** (1975). Nuclear envelope permeability. *Nature* **254**, 109-14.
- Palacios, I., Hetzer, M., Adam, S. A. und Mattaj, I. W.** (1997). Nuclear import of U snRNPs requires importin beta. *Embo J* **16**, 6783-92.
- Palade, G.** (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* **189**, 347-58.
- Panzner, S., Dreier, L., Hartmann, E., Kostka, S. und Rapoport, T. A.** (1995). Posttranslational protein transport in yeast reconstituted with a purified complex of Sec proteins and Kar2p. *Cell* **81**, 561-70.
- Parodi, A. J.** (2000). Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation. *Biochem J* **348 Pt 1**, 1-13.
- Parthun, M. R., Mangus, D. A. und Jaehning, J. A.** (1992). The EGD1 product, a yeast homolog of human BTF3, may be involved in GAL4 DNA binding. *Mol Cell Biol* **12**, 5683-9.
- Pederson, T. und Politz, J. C.** (2000). The nucleolus and the four ribonucleoproteins of translation. *J Cell Biol* **148**, 1091-5.

- Perara, E., Rothman, R. E. und Lingappa, V. R.** (1986). Uncoupling translocation from translation: implications for transport of proteins across membranes. *Science* **232**, 348-52.
- Percipalle, P., Butler, P. J., Finch, J. T., Jans, D. A. und Rhodes, D.** (1999). Nuclear localization signal recognition causes release of importin- alpha from aggregates in the cytosol. *J Mol Biol* **292**, 263-73.
- Pfund, C., Lopez-Hoyo, N., Ziegelhoffer, T., Schilke, B. A., Lopez-Buesa, P., Walter, W. A., Wiedmann, M. und Craig, E. A.** (1998). The molecular chaperone Ssb from *Saccharomyces cerevisiae* is a component of the ribosome-nascent chain complex. *Embo J* **17**, 3981-9.
- Picard, D., Schena, M. und Yamamoto, K. R.** (1990). An inducible expression vector for both fission and budding yeast. *Gene* **86**, 257-61.
- Plath, K., Mothes, W., Wilkinson, B. M., Stirling, C. J. und Rapoport, T. A.** (1998). Signal sequence recognition in posttranslational protein transport across the yeast ER membrane. *Cell* **94**, 795-807.
- Plath, K. und Rapoport, T. A.** (2000). Spontaneous release of cytosolic proteins from posttranslational substrates before their transport into the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* **151**, 167-78.
- Politz, J. C., Yarovoi, S., Kilroy, S. M., Gowda, K., Zwieb, C. und Pederson, T.** (2000). Signal recognition particle components in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 55-60.
- Potter, M. D., Seiser, R. M. und Nicchitta, C. V.** (2001). Ribosome exchange revisited: a mechanism for translation-coupled ribosome detachment from the ER membrane. *Trends Cell Biol* **11**, 112-5.
- Prinz, A., Behrens, C., Rapoport, T. A., Hartmann, E. und Kalies, K. U.** (2000a). Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA. *Embo J* **19**, 1900-6.
- Prinz, A., Hartmann, E. und Kalies, K. U.** (2000b). Sec61p is the main ribosome receptor in the endoplasmic reticulum of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biol Chem* **381**, 1025-9.
- Raden, D. und Gilmore, R.** (1998). Signal recognition particle-dependent targeting of ribosomes to the rough endoplasmic reticulum in the absence and presence of the nascent polypeptide-associated complex. *Mol Biol Cell* **9**, 117-30.
- Rapiejko, P. J. und Gilmore, R.** (1992). Protein translocation across the ER requires a functional GTP binding site in the alpha subunit of the signal recognition particle receptor. *J Cell Biol* **117**, 493-503.

- Rapiejko, P. J. und Gilmore, R.** (1997). Empty site forms of the SRP54 and SR alpha GTPases mediate targeting of ribosome-nascent chain complexes to the endoplasmic reticulum. *Cell* **89**, 703-13.
- Rapoport, T. A., Matlack, K. E., Plath, K., Misselwitz, B. und Staeck, O.** (1999). Posttranslational protein translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. *Biol Chem* **380**, 1143-50.
- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E. L., Jr., Jarnik, M., Engel, A. und Aebi, U.** (1990). Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components. *J Cell Biol* **110**, 883-94.
- Ribbeck, K. und Görlich, D.** (2001). Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *Embo J* **20**, 1320-30.
- Ribbeck, K., Kutay, U., Paraskeva, E. und Görlich, D.** (1999). The translocation of transportin-cargo complexes through nuclear pores is independent of both Ran and energy. *Curr Biol* **9**, 47-50.
- Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H. M., Stewart, M. und Görlich, D.** (1998). NTF2 mediates nuclear import of Ran. *Embo J* **17**, 6587-98.
- Rolleston, F. S.** (1972). The binding of ribosomal subunits to endoplasmic reticulum membranes. *Biochem J* **129**, 721-31.
- Römisch, K.** (1999). Surfing the Sec61 channel: bidirectional protein translocation across the ER membrane. *J Cell Sci* **112**, 4185-91.
- Rothblatt, J. A., Deshaies, R. J., Sanders, S. L., Daum, G. und Schekman, R.** (1989). Multiple genes are required for proper insertion of secretory proteins into the endoplasmic reticulum in yeast. *J Cell Biol* **109**, 2641-52.
- Rothblatt, J. A., Webb, J. R., Ammerer, G. und Meyer, D. I.** (1987). Secretion in yeast: structural features influencing the post- translational translocation of prepro-alpha-factor in vitro. *Embo J* **6**, 3455-63.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprapto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. und Chait, B. T.** (2000). The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism. *J Cell Biol* **148**, 635-51.
- Rout, M. P., Blobel, G. und Aitchison, J. D.** (1997). A distinct nuclear import pathway used by ribosomal proteins. *Cell* **89**, 715-25.
- Ryan, K. J. und Wenthe, S. R.** (2000). The nuclear pore complex: a protein machine bridging the nucleus and cytoplasm. *Curr Opin Cell Biol* **12**, 361-71.

- Sachdev, S., Bagchi, S., Zhang, D. D., Mings, A. C. und Hannink, M.** (2000). Nuclear import of IkappaBalpha is accomplished by a ran-independent transport pathway. *Mol Cell Biol* **20**, 1571-82.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.** (1987). Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schaap, P. J., van't Riet, J., Woldringh, C. L. und Raue, H. A.** (1991). Identification and functional analysis of the nuclear localization signals of ribosomal protein L25 from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol* **221**, 225-37.
- Schlenstedt, G., Smirnova, E., Deane, R., Solsbacher, J., Kutay, U., Görlich, D., Ponstingl, H. und Bischoff, F. R.** (1997). Yrb4p, a yeast ran-GTP-binding protein involved in import of ribosomal protein L25 into the nucleus. *Embo J* **16**, 6237-49.
- Schlenstedt, G., Wong, D. H., Koepp, D. M. und Silver, P. A.** (1995). Mutants in a yeast Ran binding protein are defective in nuclear transport. *Embo J* **14**, 5367-78.
- Schneider, B. L., Steiner, B., Seufert, W. und Futcher, A. B.** (1996). pMPY-ZAP: a reusable polymerase chain reaction-directed gene disruption cassette for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**, 129-34.
- Seedorf, M., Damelin, M., Kahana, J., Taura, T. und Silver, P. A.** (1999). Interactions between a nuclear transporter and a subset of nuclear pore complex proteins depend on Ran GTPase. *Mol Cell Biol* **19**, 1547-57.
- Seedorf, M. und Silver, P. A.** (1997). Importin/karyopherin protein family members required for mRNA export from the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 8590-5.
- Seki, T., Tada, S., Katada, T. und Enomoto, T.** (1997). Cloning of a cDNA encoding a novel importin-alpha homologue, Qip1: discrimination of Qip1 and Rch1 from hSrp1 by their ability to interact with DNA helicase Q1/RecQL. *Biochem Biophys Res Commun* **234**, 48-53.
- Shi, X., Parthun, M. R. und Jaehning, J. A.** (1995). The yeast EGD2 gene encodes a homologue of the alpha NAC subunit of the human nascent-polypeptide-associated complex. *Gene* **165**, 199-202.
- Shulga, N., James, P., Craig, E. A. und Goldfarb, D. S.** (1999). A nuclear export signal prevents *Saccharomyces cerevisiae* Hsp70 Ssb1p from stimulating nuclear localization signal-directed nuclear transport. *J Biol Chem* **274**, 16501-7.
- Shulga, N., Mosammaparast, N., Wozniak, R. und Goldfarb, D. S.** (2000). Yeast nucleoporins involved in passive nuclear envelope permeability. *J Cell Biol* **149**, 1027-38.

- Shulga, N., Roberts, P., Gu, Z., Spitz, L., Tabb, M. M., Nomura, M. und Goldfarb, D. S.** (1996). In vivo nuclear transport kinetics in *Saccharomyces cerevisiae*: a role for heat shock protein 70 during targeting and translocation. *J Cell Biol* **135**, 329-39.
- Shulman, R. W., Hartwell, L. H. und Warner, J. R.** (1973). Synthesis of ribosomal proteins during the yeast cell cycle. *J Mol Biol* **73**, 513-25.
- Simon, S. M., Peskin, C. S. und Oster, G. F.** (1992). What drives the translocation of proteins? *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 3770-4.
- Smith, H. M., Hicks, G. R. und Raikhel, N. V.** (1997). Importin alpha from *Arabidopsis thaliana* is a nuclear import receptor that recognizes three classes of import signals. *Plant Physiol* **114**, 411-7.
- Solsbacher, J., Maurer, P., Bischoff, F. R. und Schlenstedt, G.** (1998). Cse1p is involved in export of yeast importin alpha from the nucleus. *Mol Cell Biol* **18**, 6805-15.
- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C. und Weis, K.** (1997). Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* **90**, 1041-50.
- Stage-Zimmermann, T., Schmidt, U. und Silver, P. A.** (2000). Factors affecting nuclear export of the 60S ribosomal subunit in vivo. *Mol Biol Cell* **11**, 3777-89.
- St-Arnaud, R. und Quelo, I.** (1998). Transcriptional coactivators potentiating AP-1 function in bone. *Front Biosci* **3**, D838-48.
- Tabb, M. M., Tongaonkar, P., Vu, L. und Nomura, M.** (2000). Evidence for separable functions of Srp1p, the yeast homolog of importin alpha (Karyopherin alpha): role for Srp1p and Sts1p in protein degradation. *Mol Cell Biol* **20**, 6062-73.
- Takizawa, C. G., Weis, K. und Morgan, D. O.** (1999). Ran-independent nuclear import of cyclin B1-Cdc2 by importin beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 7938-43.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G. und Gibson, T. J.** (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**, 4673-80.
- Timmers, A. C., Stuger, R., Schaap, P. J., van 't Riet, J. und Raue, H. A.** (1999). Nuclear and nucleolar localization of *Saccharomyces cerevisiae* ribosomal proteins S22 and S25. *FEBS Lett* **452**, 335-40.
- Titov, A. A. und Blobel, G.** (1999). The karyopherin Kap122p/Pdr6p imports both subunits of the transcription factor IIA into the nucleus. *J Cell Biol* **147**, 235-46.
- Torok, I., Strand, D., Schmitt, R., Tick, G., Torok, T., Kiss, I. und Mechler, B. M.** (1995). The overgrown hematopoietic organs-31 tumor suppressor gene of *Drosophila*

encodes an Importin-like protein accumulating in the nucleus at the onset of mitosis. *J Cell Biol* **129**, 1473-89.

Trombetta, E. S. und Helenius, A. (1998). Lectins as chaperones in glycoprotein folding. *Curr Opin Struct Biol* **8**, 587-92.

Truant, R., Fridell, R. A., Benson, R. E., Bogerd, H. und Cullen, B. R. (1998). Identification and functional characterization of a novel nuclear localization signal present in the yeast Nab2 poly(A)⁺ RNA binding protein. *Mol Cell Biol* **18**, 1449-58.

Tsuji, L., Takumi, T., Imamoto, N. und Yoneda, Y. (1997). Identification of novel homologues of mouse importin alpha, the alpha subunit of the nuclear pore-targeting complex, and their tissue-specific expression. *FEBS Lett* **416**, 30-4.

von Heijne, G. (1985). Signal sequences. The limits of variation. *J Mol Biol* **184**, 99-105.

Wang, S., Sakai, H. und Wiedmann, M. (1995). NAC covers ribosome-associated nascent chains thereby forming a protective environment for regions of nascent chains just emerging from the peptidyl transferase center. *J Cell Biol* **130**, 519-28.

Warner, J. R., Kumar, A., Udem, S. A. und Wu, R. S. (1973). Ribosomal proteins and the assembly of ribosomes in eukaryotes. *Biochem Soc Symp* **37**, 3-22.

Welch, K., Franke, J., Köhler, M. und Macara, I. G. (1999). RanBP3 contains an unusual nuclear localization signal that is imported preferentially by importin-alpha3. *Mol Cell Biol* **19**, 8400-11.

Whitby, M. C. und Dixon, J. (2001). Fission yeast nascent polypeptide-associated complex binds to four-way DNA junctions. *J Mol Biol* **306**, 703-16.

Wiedmann, B., Sakai, H., Davis, T. A. und Wiedmann, M. (1994). A protein complex required for signal-sequence-specific sorting and translocation. *Nature* **370**, 434-40.

Wiedmann, M., Kurzchalia, T. V., Bielka, H. und Rapoport, T. A. (1987a). Direct probing of the interaction between the signal sequence of nascent preprolactin and the signal recognition particle by specific cross-linking. *J Cell Biol* **104**, 201-8.

Wiedmann, M., Kurzchalia, T. V., Hartmann, E. und Rapoport, T. A. (1987b). A signal sequence receptor in the endoplasmic reticulum membrane. *Nature* **328**, 830-3.

Wittke, S., Dunnwald, M. und Johnsson, N. (2000). Sec62p, a component of the endoplasmic reticulum protein translocation machinery, contains multiple binding sites for the Sec-complex. *Mol Biol Cell* **11**, 3859-71.

Wozniak, R. W., Rout, M. P. und Aitchison, J. D. (1998). Karyopherins and kissing cousins. *Trends Cell Biol* **8**, 184-8.

- Yan, Q. und Lennarz, W. J.** (1999). Oligosaccharyltransferase: a complex multisubunit enzyme of the endoplasmic reticulum. *Biochem Biophys Res Commun* **266**, 684-9.
- Yan, W., Schilke, B., Pfund, C., Walter, W., Kim, S. und Craig, E. A.** (1998). Zuotin, a ribosome-associated DnaJ molecular chaperone. *Embo J* **17**, 4809-17.
- Yano, R., Oakes, M. L., Tabb, M. M. und Nomura, M.** (1994). Yeast Srp1p has homology to armadillo/plakoglobin/beta-catenin and participates in apparently multiple nuclear functions including the maintenance of the nucleolar structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 6880-4.
- Yoshida, K. und Blobel, G.** (2001). The karyopherin Kap142p/Msn5p mediates nuclear import and nuclear export of different cargo proteins. *J Cell Biol* **152**, 729-40.
- Yotov, W. V., Moreau, A. und St-Arnaud, R.** (1998). The alpha chain of the nascent polypeptide-associated complex functions as a transcriptional coactivator. *Mol Cell Biol* **18**, 1303-11.
- Yotov, W. V. und St-Arnaud, R.** (1996). Differential splicing-in of a proline-rich exon converts alphaNAC into a muscle-specific transcription factor. *Genes Dev* **10**, 1763-72.
- Zapun, A., Darby, N. J., Tessier, D. C., Michalak, M., Bergeron, J. J. und Thomas, D. Y.** (1998). Enhanced catalysis of ribonuclease B folding by the interaction of calnexin or calreticulin with ERp57. *J Biol Chem* **273**, 6009-12.
- Zheng, X. M., Black, D., Chambon, P. und Egly, J. M.** (1990). Sequencing and expression of complementary DNA for the general transcription factor BTF3. *Nature* **344**, 556-9.
- Zheng, X. M., Moncollin, V., Egly, J. M. und Chambon, P.** (1987). A general transcription factor forms a stable complex with RNA polymerase B (II). *Cell* **50**, 361-8.

8. Anhang

8.1. Eigene Veröffentlichungen

Reimann, B., Bradsher, J., Franke, J., Hartmann, E., Wiedmann, M., Prehn, S. und Wiedmann, B. (1999). Initial characterization of the nascent polypeptide-associated complex in yeast. *Yeast* **15**, 397-407.

Welch, K., Franke, J., Köhler, M. und Macara, I. G. (1999). RanBP3 contains an unusual nuclear localization signal that is imported preferentially by importin-alpha3. *Mol Cell Biol* **19**, 8400-11.

Franke, J., Reimann, B., Hartmann, E., Köhler, M. und Wiedmann, B. (2001). Evidence for a Nuclear Passage of Nascent Polypeptide-Associated Complex Subunits in Yeast. *J Cell Sci* **114**, 2641-2648.

Köhler, M., Görlich, D., Luft, F. C., Hartmann, E. und Franke, J. (2001) Nuclear import of adenoviral E1A protein is preferentially mediated by importin α 3 in vitro. *Virology* **289**, 186-191.

8.2. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Biochemie der Charité Berlin und am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin angefertigt.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Prof. Enno Hartmann für die Begleitung meiner Doktorarbeit und seine wissenschaftliche Neugier, die NAC mit einschloß, bedanken.

Prof. Ulf Stahl danke ich sehr für sein Interesse und die Vertretung meiner Arbeit vor der Fakultät III der TU Berlin.

Ganz besonderer Dank an Brigitte Wiedmann für Betreuung, Diskussion und Korrektur der Dissertation sowie die Durchführung der Flotationsexperimente.

Matthias Köhler danke ich für seine Offenheit für das Thema, seine Hilfsbereitschaft beim Lesen und für das Anlernen der *in vitro*-Kernimport-Versuche.

Martin Wiedmann danke ich für seine Unterstützung während des Aufenthalts in seinem Labor in New York.

Brigitte Nentwig und Angelika Wittstruck möchte ich für die aufopferungsvolle Hilfe beim Aufsammeln der vielen Erbsen und Linsen danken. Die Arbeit mit ihnen war eine große Freude!

Bei Elke Bürger, Ingrid Krenz und Siegfried Prehn (Institut für Biochemie, Charité) bedanke ich mich für ihre Unterstützung und die Sequenzierungen der Konstrukte. Vielen Dank auch an Ilona Reimann für das Aufreinigen von rekombinanten Proteinen.

Hellmuth Meyer danke ich für Korrekturvorschläge und Anja Pannek für die Hilfe bei der Literaturrecherche.

Thomas Sommer stellte den Laborplatz am MDC zur Verfügung. Ihm, Katrin Stade sowie der gesamten Arbeitsgruppe Sommer danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Für die Bereitstellung von Plasmiden, Hefe-Stämmen und Antikörpern danke ich Dirk Görlich, Ernst Jarosch, Matthias Köhler, Uwe Lenk, Masayasu Nomura, Hans Ronne, Pam Silver und Martin Wiedmann.

8.3. Lebenslauf

Name: Jacqueline Franke

Geburtsdatum: 2.12.1969

Geburtsort: Berlin

1976 – 1986 Polytechnische Oberschule Berlin

1986 – 1988 Erweiterte Oberschule “Friedrich List” Berlin, Abitur

1988 – 1989 Ausbildung zum Facharbeiter für Lebensmitteltechnik in Berlin und Delitzsch

1989 – 1991 Studium der Biotechnologie an der Humboldt-Universität zu Berlin

1991 – 1995 Studium der Biotechnologie an der Technischen Universität Berlin

1995 Diplomarbeit “Untersuchung von Homologen des humanen Cap-bindenden Proteinkomplexes in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*” am MDC Berlin unter Anleitung von Prof. E. Hartmann

1996 wissenschaftliche Mitarbeit zum Thema “ER assoziierter Proteinabbau” an der University of Pittsburgh unter Anleitung von Prof. J. Brodsky

1997 – 1999 Arbeit an der Dissertation am Institut für Biochemie Charité Berlin unter Anleitung von Dr. B. Wiedmann

1998 zweimonatiges Boehringer-Ingelheim Forschungsstipendium für den Aufenthalt am Memorial Sloan Kettering Cancer Research Center, New York in der Arbeitsgruppe von Prof. M Wiedmann

1999 – 2001 weitere Arbeit an der Dissertation am MDC in der Arbeitsgruppe Prof. T. Sommer in Zusammenarbeit mit Dr. B. Wiedmann und Prof. E. Hartmann Arbeit am Thema “Regulation des nucleären Transports” unter Anleitung von Dr. M. Köhler