

Thermodynamische und strukturelle Charakterisierung Importin β -abhängiger Kernimportprozesse

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von
Daniel Wohlwend
aus München

Göttingen, Dezember 2007

D7

Referent: Herr Prof. Dr. Ralf Ficner
Abteilung für molekulare Strukturbiologie
Institut für Mikrobiologie & Genetik, GZMB
Georg-August-Universität Göttingen

Korreferent: Herr Prof. Dr. Oliver Einsle
Abteilung für molekulare Strukturbiologie
Institut für Mikrobiologie & Genetik, GZMB
Georg-August-Universität Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: 22.01.2008

Teile dieser Arbeit wurden in den folgenden Publikationen veröffentlicht:

Wohlgend, D., Strasser, A., Dickmanns, A., Doenecke, D. & Ficner, R. (2007): Thermodynamic analysis of H1 nuclear import: receptor tuning of importin β /importin γ . *J. Biol. Chem.* **14**, 10707-10719.

Wohlgend, D., Strasser, A., Dickmanns, A. & Ficner, R. (2007): Structural basis for RanGTP independent entry of spliceosomal U snRNPs into the nucleus. *J. Mol. Biol.* **374**: 1129-1138.

Arnold, M., Nath, A., Wohlgend, D. & Kehlenbach, R. H. (2006): Transportin is a major nuclear import receptor for c-Fos: a novel mode of cargo-interaction. *J. Biol. Chem.* **281** (9): 5492-5499.

Für Martha Friebohn †

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Nucleocytoplasmatischer Transport	1
1.1.1 Der Ran-Zyklus.....	4
1.1.2 Der Kernporenkomplex	6
1.1.3 Kernimport.....	8
1.2 Kernimport von H1 Linker Histonen durch Impβ/Imp7	9
1.3 Kernimport spleißosomaler Untereinheiten durch Impβ/SPN1	11
1.4 Der Kernimportrezeptor Importinβ	14
1.5 Der Kernimportrezeptor Importin7	15
1.6 Der Kernimportadapter Snurportin1	16
1.7 Zielsetzung	18
2. Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.1.1 Großgeräte	19
2.1.2 Chromatographiesäulen	20
2.1.3 Feinchemikalien	20
2.1.4 Kitsysteme.....	21
2.1.5 Enzyme und Inhibitoren	21
2.1.6 Zellstämme	21
2.1.7 DNA-Oligonucleotide	22
2.1.8 Vektoren.....	23
2.1.9 Kristallisationsscreens	25
2.1.10 Computersoftware.....	25
2.2 Methoden	26
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	26
2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	26
2.2.1.2 Reinigung von PCR-Produkten	27
2.2.1.3 DNA-Restriktionsverdau.....	27
2.2.1.4 Agarosegelelektrophorese.....	27
2.2.1.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen	27
2.2.1.6 DNA-Ligation	27
2.2.1.7 Plasmidpräparation	28
2.2.2 Mikrobiologische Methoden.....	28
2.2.2.1 Medien für die Aufzucht von E. coli.....	28

2.2.2.2	Herstellung chemisch kompetenter E. coli-Stämme	29
2.2.2.3	Transformation chemisch kompetenter E. coli-Zellen	29
2.2.2.4	IPTG-induzierte Proteinexpression in E. coli	29
2.2.2.5	Zellaufschluß.....	30
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	31
2.2.3.1	Ammoniumsulfatfällung.....	31
2.2.3.2	Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Sepharose.....	31
2.2.3.3	Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose.....	32
2.2.3.4	Proteolytische Spaltung mit PreScission Protease.....	32
2.2.3.5	Anionenaustauschchromatographie über DEAE-Sepharose.....	32
2.2.3.6	Kationenaustauschchromatographie über SP-Sepharose	33
2.2.3.7	Größenausschlußchromatographie.....	33
2.2.3.8	Nucleotidaustausch mit alkalischer Phosphatase (CIAP)	34
2.2.3.9	Perchlorsäurefällung von Proteinen	34
2.2.3.10	HPLC-Umkehrphasenchromatographie	35
2.2.3.11	Interaktionsstudien über pull down assays.....	35
2.2.3.12	Interaktionsstudien über Gelfiltration	36
2.2.3.13	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.2.4	Reinigungsprotokolle der verwendeten Proteine.....	37
2.2.4.1	Importin β (Homo sapiens) in pQE-60.....	37
2.2.4.2	Importin7 (X. laevis) in pQE-9.....	37
2.2.4.3	Importin7 (X. laevis) und Importin7_1-1001 in pQE-80.....	37
2.2.4.4	Importin β _1-641, Importin β _1-726, Importin β _32-876, Importin β _127-876 und Importin β _210-876 in pGEX-6P-1	37
2.2.4.5	Importin β _127-641 und Importin7_598-1038 in pGEX-6P-1	38
2.2.4.6	Importin β _1-396 und Importin β _304-876 in pTYB-2b.....	38
2.2.4.7	Importin7_665-1038, Importin7_824-1038, Importin7_917-1038, Imp7_876-1001, Imp7_917-1001 und Importin7_876-916 in pGEX-6P-1	38
2.2.4.8	Importin7_1002-1038 und Importin α _1-65 in pGEX-6P-1.....	38
2.2.4.9	Ran/TC4 (Homo sapiens) in pET-11b	39
2.2.4.10	H1.11L (Gallus gallus) in pET-13a.....	39
2.2.4.11	H1.11L_36-225 und H1.11L_39-225 in pQE-80	40
2.2.4.12	Snurportin_1-65 (Homo sapiens) in pET-28b	40
2.2.5	Spektroskopische Methoden	40
2.2.5.1	Bestimmung nativer molarer Extinktionskoeffizienten	40
2.2.5.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Nucleinsäuren	41
2.2.6	<i>in-vitro</i> -Kernimportassay	41

2.2.7 Isotherme Titrationskalorimetrie	42
2.2.8 Röntgenkristallographische Methoden.....	44
2.2.8.1 Proteinkristallisation	44
2.2.8.2 Seeding-Experimente	44
2.2.8.3 Kryo-Kristallographie.....	44
2.2.8.4 Datensammlung	45
2.2.8.5 Phasenbestimmung (MR) und Berechnung der Elektronendichteverteilung	45
2.2.8.6 Modellbau und Strukturverfeinerung	46
3. Ergebnisse.....	48
3.1 Funktionelle Analyse des H1-Kernimports durch Impβ/Imp7.....	48
3.1.1 Generierung von Deletionsmutanten von Imp β und Imp7	48
3.1.1.1 Deletionsmutanten von Imp β	48
3.1.1.2 Deletionsmutanten von Imp7.....	50
3.1.2 Nachweis der Funktionalität der verwendeten Deletionskonstrukte	51
3.1.2.1 Funktionalität der Imp β -Fragmente in Bezug auf die Imp7-Bindung	51
3.1.2.2 Funktionalität der Imp7-Fragmente in Bezug auf die Imp β -Bindung	53
3.1.3 Kartierung der gegenseitigen Bindungsstellen im ternären H1-Importkomplex	54
3.1.3.1 Identifizierung der H1-Bindungsstelle von Imp β	54
3.1.3.2 Lokalisation der H1-Bindungsstelle von Imp7	56
3.1.3.3 Unterschiedliche Organisation der Bindungsstellen von Imp β und Imp7	58
3.1.4 <i>in-vitro</i> -Kernimport von H1 durch Imp β /Imp7.....	59
3.1.5 Thermodynamische Analyse der H1-Importkomplexbildung	62
3.1.5.1 Thermodynamische Charakterisierung der Bindung von Imp β an IBB ₇	62
3.1.5.2 Thermodynamische Analyse der Bindung von Imp β /Imp7 an H1.11L	63
3.1.5.3 Allosterische Aktivierung von Imp7 über seine IBB-Domäne durch Imp β	65
3.1.6 Thermodynamische Implikationen auf die Dissoziation des H1-Importkomplexes durch RanGTP	67
3.1.7 Die Funktion von RanGTP im <i>in-vitro</i> -Kernimport von H1	69
3.2 Co-Kristallisationsexperimente mit Importinβ, Importin7 und H1.....	73
3.3 Strukturbestimmung und –analyse von Importinβ im Komplex mit der Importinβ-Bindungsdomäne von Snurportin1	75
3.3.1 Präparation und Kristallisation von Komplexen aus Imp β und IBB _{SPN1}	75
3.3.2 Datensammlung und -prozessierung.....	76
3.3.3 Phasenbestimmung über molekularen Ersatz.....	77
3.3.4 Modellbau und Strukturverfeinerung	78
3.3.5 Beschreibung der Kristallstruktur von Imp β ₁₂₇₋₈₇₆ /IBB _{SPN1}	79
3.3.6 Struktureller Vergleich zwischen Imp β /IBB _{SPN1} und Imp β /IBB α	84

3.3.7 Thermodynamische Analyse der Faltungsvariabilität von Imp β	87
3.3.8 Vergleich der Kristallstruktur von Imp β /IBB _{SPN1} mit anderen Imp β -Kristallstrukturen	89
3.3.9 Strukturvergleich von Imp β _127-876/IBB _{SPN1} mit Kap95p/RanGDPNP	90
4. Diskussion	92
4.1 Thermodynamik des H1-Kernimports	93
4.1.1 Kartierung der Bindungsstellen im H1-Importkomplex	93
4.1.2 Thermodynamik der H1-Importkomplexbildung.....	94
4.1.3 Die Dissoziation des H1-Importkomplexes durch RanGTP	97
4.1.4 Schlußfolgerungen	100
4.2 Strukturelle Basis für die RanGTP-unabhängige Freisetzung von U snRNP- Importkomplexen von der Kernpore	102
4.2.1 Kristallisation und Strukturbestimmung von Imp β im Komplex mit IBB _{SPN1}	102
4.2.2 Vergleichende Analyse der Struktur von Imp β _127-876/IBB _{SPN1} mit anderen Imp β - Strukturen.....	103
4.2.3 Schlußfolgerungen	106
4.3 Implikationen auf Modulationsprozesse beim Impβ-abhängigen Kernimport.....	107
5. Zusammenfassung.....	108
6. Summary	109
7. Abkürzungsverzeichnis	110
8. Literaturverzeichnis	113
9. Anhang.....	121
9.1 Abbildungen	121
9.2 Tabellen.....	123
9.3 Skripte für die Datenprozessierung.....	124
10. Danksagung	128
Lebenslauf	129

1. Einleitung

Das zentrale Merkmal eukaryotischen Lebens ist die Ausbildung eines Zellkerns (Nucleus). Dieser ist von einer doppelten Lipidmembran, der Kernhülle, umgeben und erhöht als Kompartiment des Genoms die Stabilität der eukaryotischen DNA durch ihre Abgrenzung von cytoplasmatischen Stoffwechselprozessen. Darüber hinaus ermöglicht die Kompartimentierung der DNA eine selektive Kontrolle der Transkription. Diese kann als Antwort auf eine Stoffwechselsituation in der Zelle, aber auch über Signaltransduktionswege als Antwort auf extrazelluläre Zustandsänderungen erfolgen. Um die Exklusivität des Eintritts von Signalmolekülen, Transkriptionsfaktoren und anderen zu gewährleisten, muß der ungerichtete Eintritt vieler Moleküle in den Nucleus verhindert werden. Als Barriere gegen einen solchen passiven Molekülstrom dient die Kernhülle.

Um dennoch Zugänge in den Nucleus bereitzustellen und einen gerichteten Austausch von Stoffen zwischen Nucleus und Cytoplasma zu gewährleisten, sind in die Kernhülle große Proteinkomplexe als molekulare Pforten eingelassen. Diese sogenannten Kernporenkomplexe (*nuclear pore complexes*, NPCs) sind in Vertebraten aus über 30 verschiedenen Proteinen zusammengesetzt. Viele von ihnen liegen in vielfachen Kopien vor, und reflektieren so die achtfache Symmetrie des NPC (Cronshaw et al., 2002; Rout et al., 2000). In ihrer Mitte bilden die Kernporenproteine, auch Nucleoporine genannt, einen zentralen Kanal, welcher den Eingang in den Nucleus darstellt. Durch diesen Kanal können kleinere Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von etwa 20-30 kDa passiv diffundieren. Größere Moleküle hingegen oder auch solche, deren Passage durch den NPC streng reguliert werden muß, sind von der Diffusion durch die Kernpore ausgeschlossen (Cook et al., 2007; Peters, 2006; Paine et al., 1975).

1.1 Nucleocytoplasmatischer Transport

Um den Transport solcher Moleküle zu ermöglichen, haben sich im Laufe der Evolution viele verschiedene Transportwege entwickelt, die für jedes Transportsubstrat einen spezifischen Rezeptor bereitstellen (Cook et al., 2007; Madrid & Weis, 2006; Suel et al., 2006; Pemberton & Paschal, 2005). Allerdings haben alle bisher identifizierten Transportsubstrate eines gemeinsam: Jedes einzelne weist ein Signal für den aktiven nucleocytoplasmatischen Transport auf, welches vom entsprechenden Transportrezeptor erkannt wird. Die Natur dieses Signals ist bei vielen Substraten sehr ähnlich. Die erste identifizierte Kernlokalisationssequenz beispielsweise, das klassische Kernlokalisationssignal (*classical Nuclear Localisation Signal*, **cNLS**, Lanford et al., 1986; Kalderon et al., 1984; Lanford & Butel, 1984), ist weit verbreitet und findet sich in einer Vielzahl verschiedener karyophiler Proteine. Es besteht in der Regel aus einer kurzen Sequenz aus 7-8 Aminosäuren, von denen mindestens vier Aminosäuren Lysine sein müssen, z. B. PKKKRKKV. Ein anderes, weit verbreitetes Transportsignal ist das Kernexportsignal (*Nuclear Export Signal*, **NES**, Fornerod et al., 1997; Fukuda et al., 1997; Ossareh-Nazari et al., 1997; Stade et al., 1997). Neben dem cNLS und dem NES sind weitere Signale mit großer Verbreitung bekannt, wie zum Beispiel das bpNLS (*bipartite NLS*, Robbins et al., 1991) oder das M9-Transportsignal (Pollard et al., 1996), welches nicht nur als Kernimportsignal fungiert, sondern gleichzeitig auch als Exportsignal, so daß es ein Pendeln des Transportsubstrates zwischen Cytoplasma und Nucleus erlaubt.

1. Einleitung

Eine immer größer werdende Zahl von biologisch charakterisierten Transportsubstraten trägt jedoch hiervon stark abweichende Transportsignale. Häufig sind sie mehrteilig, und die einzelnen Abschnitte sind in der Aminosäuresequenz getrennt, so daß erst nach der Faltung, wie im Falle von Histonen (Baake et al., 2001b; Jäkel et al., 1999), oder nach der Assemblierung verschiedener Untereinheiten ein funktionelles Transportsignal entsteht, wie es zum Beispiel für die spleißosomalen Untereinheiten gilt (Fischer et al., 1993; Hamm et al., 1990), den sogenannten U snRNPs (von engl. *Uridine-rich small nuclear ribonucleo-protein particles*).

Bei dieser Vielfalt unterschiedlichster Transportsignale ist es umso erstaunlicher, daß bis auf wenige Ausnahmen die meisten zugehörigen Transportrezeptoren einer einzigen Proteinfamilie zugeordnet werden können, der Importin β -Superfamilie (Cook et al., 2007; Madrid & Weis, 2006; Mattaj & Englmeier, 1998). Proteine dieser Familie, die auch Importine und Exportine genannt werden, sind aus repetitiven Einheiten aufgebaut, den sogenannten *HEAT-repeats*. Diese Motive bestehen aus zwei antiparallel verlaufenden α -Helices, welche durch eine kurze Schleife getrennt sind. Die erste Helix wird A-Helix genannt, die zweite B-Helix. Die bis über 20 *HEAT-repeats* eines solchen Proteins packen nahezu parallel Seite an Seite, sind allerdings um wenige Grad gegeneinander gekippt, so daß ein superhelicales Molekül entsteht mit recht beträchtlichen räumlichen Ausmaßen (Cook et al., 2007; Lee et al., 2005; Matsuura & Stewart, 2004; Chook & Blobel, 1999; Vetter et al., 1999; Cingolani et al., 1999). Zur Veranschaulichung ist als Beispiel eine Kristallstruktur des namensgebenden Vertreters dieser Proteinfamilie angeführt, Importin β (Imp β , Abb.1).

Kristallstruktur von Importin β

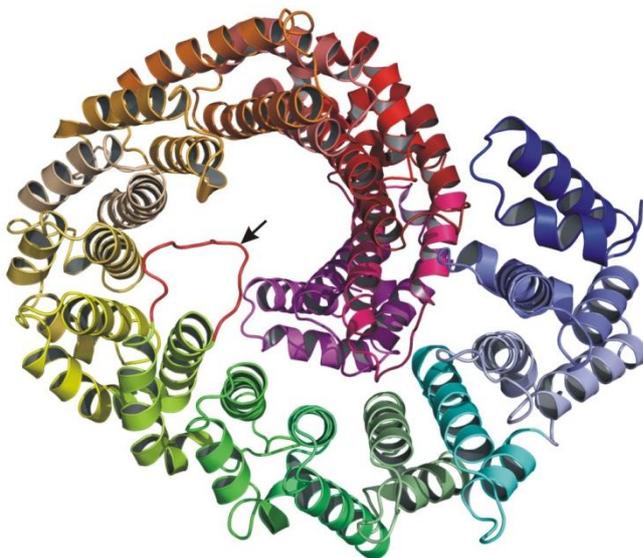


Abb. 1: Kristallstruktur von Importin β .

Dargestellt ist die Kristallstruktur von Importin β im Komplex mit der Importin β -Bindedomäne von Importin α (IBB α , Cingolani et al., 1999). IBB α ist nicht gezeigt. Imp β besteht aus 19 *HEAT-repeats*, welche hier unterschiedlich eingefärbt sind. Die *HEAT-repeats* sind untereinander durch kurze Schleifen verbunden. Die leichte Neigung gegeneinander erzeugt eine superhelicale Struktur des gesamten Proteins. Diese Superhelix verjüngt sich vom N- zum C-Terminus hin. Zwischen Helix A und Helix B des *HEAT-repeats* Nr. 8 (hellgrün) befindet sich eine saure Schleife, welche rot eingefärbt und zusätzlich mit einem Pfeil markiert ist. Diese Schleife ist in mehreren bekannten Interaktionen von Imp β mit anderen Proteinen involviert (Madrid & Weis, 2006; Cingolani et al., 1999; Vetter et al., 1999).

Die Möglichkeit, die repetitiven *HEAT-repeats* in unterschiedlicher Zahl zu kombinieren und die Aminosäurezusammensetzung punktuell modifizieren zu können, erinnert an das Baukasten-Prinzip und gewährleistet eine große Diversität der Substratspezifitäten der Proteine der Importin β -Superfamilie. Einige dieser Transportproteine mit ihren Substraten sind in Tab. 1 aufgeführt. Ihnen ist ein relativ hohes Molekulargewicht von 90 - 150 kDa und ein niedriger isoelektrischer Punkt bei pH 4,5 - 5,0 gemein (Chook & Blobel, 2001).

Tab. 1: Ausgewählte Transportrezeptoren höherer Eukaryoten und ihre Substrate

Transportrezeptoren	Transportsubstrate
<i>Importine</i>	
Importin β (Karyopherin- β 1, p97)	cNLS-Substrate, Importin α als Adapter essentiell (Chi et al., 1995); m ₃ G-Cap tragende U snRNPs gemeinsam mit SPN1 (Huber et al., 1998); XRIP α (Jullien et al., 1999); HIV1-Tat und -Rev (Truant & Cullen, 1999); Cyclin B1 (Moore et al., 1999; Takizawa et al., 1999); ribosomale Proteine (Jäkel & Görlich, 1998); Smad-Proteine (Xiao et al., 2000); Tyrosinphosphatase (T-Zellen, Tiganis et al., 1997)
Transportin1 (Karyopherin- β 2, Importin β 2)	hnRNP Proteine (A1, F) (Pollard et al., 1996; Siomi et al., 1997); ribosomale Proteine (Jäkel & Görlich, 1998); c-Fos aus HIV-1 (Arnold et al., 2006b)
TransportinSR (Transportin2)	Proteine mit SR-Domäne (Kataoka et al., 1999; Lai et al., 2000)
Importin5 (RanBP5, Karyopherin β 3)	Ribosomale Proteine (Jäkel & Görlich, 1998)
Importin7 (RanBP7)	H1 Linker Histone gemeinsam mit Importin β (Jäkel et al. 1999, Bäuerle et al., 2002); Core Histone (Mühlhäusser et al., 2001); ribosomale Proteine (Jäkel & Görlich, 1998); HIV1-Integrase (Fassati et al., 2003); HIV1-Rev (Arnold et al., 2006a) p35 in Neuronen (Fu et al., 2006); Glucocorticoidrezeptor (Freedman & Yamamoto, 2004)
Importin9	Core Histone (Mühlhäusser et al., 2001)
Importin11	UbcM2 (Plafker & Macara, 2000)
Importin13	Ubc9 und RBM8, eIF1A (Mingot et al., 2001); NF-YB/NF-YC (Kahle et al., 2005)
<i>Exportine</i>	
Exportin1 (Crm1, Xpo1)	NES-Substrate (Fornerod et al., 1997; Fukuda et al., 1997; Ossareh-Nazari et al., 1997; Stade et al., 1997); m ⁷ G-Cap tragende U snRNAs (Ohno et al., 2000); Snurportin1 (Paraskeva et al., 1999)
CAS	Importin α (Kutay et al., 1997)
Exportin-t	tRNAs (Arts et al., 1998; Kutay et al., 1998)
Exportin4	eIF5A (Lipowski et al., 2000)

Tab. 1 stellt lediglich einen kleinen Auszug der mittlerweile charakterisierten Transportrezeptoren und ihrer Substrate dar, die Diversität der nucleocytoplasmatischen Transportwege ist deutlich größer. Da aber nun alle bekannten Transportrezeptoren nur in eine Richtung ein Substrat durch die Kernpore translozieren sollen, drängt sich die berechnete Frage auf, wie bei einer solchen Vielzahl an Transportwegen die Unidirektionalität des Kerntransports gesichert und damit leerlaufende Substratzyklen, sogenannte *futile cycles*, verhindert werden können. Dies soll im nächsten Abschnitt erläutert werden.

1.1.1 Der Ran-Zyklus

Die Unidirektionalität des nucleocytoplasmatischen Transports wird durch ein allgemeines Antriebssystem sichergestellt, dessen Zentrum ein kleiner molekularer Schalter ist, die GTPase Ran (von engl. *Rat sarcoma related nuclear antigen*). Ran kommt in der Zelle in zwei nucleotidgebundenen Zuständen vor, und zwar entweder im Komplex mit GTP oder mit GDP (Joseph, 2006; Guiochon-Mantel et al., 1994; Melchior et al., 1993; Moore und Blobel, 1993). Die intrinsische Hydrolyserate von Ran ist dabei sehr niedrig, so daß RanGTP lange stabil bleibt. Die Ursache ist eine Fehlpositionierung des katalytischen Zentrums. Durch die Bindung des Aktivatorproteins RanGAP1 (von engl. *Ran GTPase Activating Protein 1*) kann das katalytische Zentrum reorientiert werden (Seewald et al., 2002). Dadurch wird die Hydrolyserate von Ran dramatisch erhöht. Durch die zusätzliche Aktivität der Ran-Bindeproteine RanBP1 und RanBP2 (von engl. *Ran Binding Protein*) wird schließlich eine Steigerung der Hydrolyseaktivität von Ran um den Faktor 1000 erreicht. Als Antagonist zu RanGAP1, RanBP1 und RanBP2 wirkt der Guanosinnucleotidaustauschfaktor RanGEF/RCC1 (von engl. *Ran Guanosine-nucleotide Exchange Factor/Regulator of Chromosome Condensation 1*). Dieser katalysiert den Austausch von gebundenem GDP gegen GTP (Bischoff und Ponstingl, 1991, 1995; Klebe et al., 1995, Geyer et al., 1999). Interessanterweise sind, wie in Abb. 2 gezeigt, die Aktivatorproteine und die Nucleotidaustauschfaktoren streng kompartimentiert, wobei die Aktivatorproteine ausschließlich im Cytoplasma und die Austauschfaktoren ausschließlich im Nucleus zu finden sind (Izaurrealde et al., 1997). Dies hat zur Folge, daß auch die Ereignisse GTP-Hydrolyse (RanGTP-Abbau) und Nucleotidaustausch (RanGTP-Aufbau) auf die jeweiligen Kompartimente beschränkt sind. Als Konsequenz daraus ergibt sich, daß RanGTP nahezu exklusiv im Nucleus vorkommt, während es im Cytoplasma fehlt und stattdessen RanGDP dort die vorherrschende Form ist. Der resultierende Gradient von RanGTP über die Kernmembran ist schließlich das Schwungrad für den unidirektionalen Kerntransport (Görlich et al., 1996). Dies wird ersichtlich, wenn man zunächst betrachtet, daß erstens nur RanGTP an Transportrezeptoren binden kann und zweitens ein signifikanter Affinitätsunterschied zwischen Transportrezeptoren und ihren Substraten besteht, je nachdem ob RanGTP am Rezeptor gebunden ist oder nicht (Görlich et al., 1996; Görlich et al., 1997).

Der Ran-Zyklus

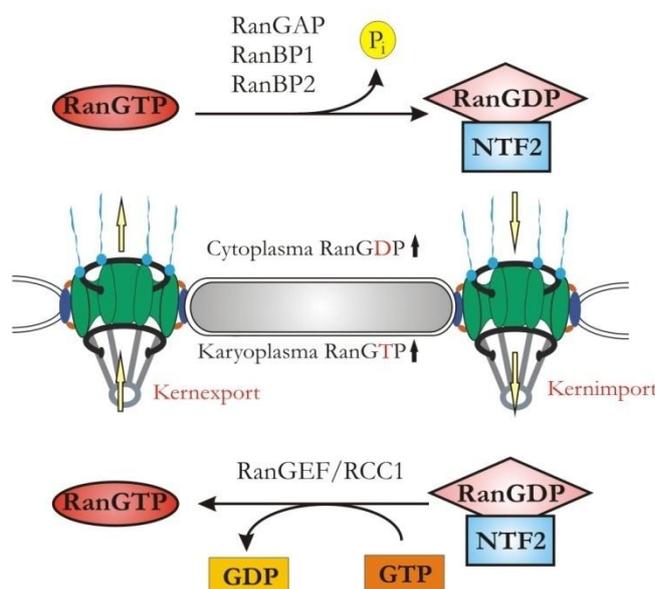


Abb. 2: Über die Kernhülle besteht ein RanGTP-Gradient.

Die cytoplasmatischen GTPase-Aktivatorproteine RanGAP, RanBP1 und RanBP2 stimulieren die intrinsische GTP-Hydrolyserate von Ran und depletieren auf diese Weise RanGTP im Cytoplasma; im Nucleus wird dagegen vorhandenes RanGDP durch RanGEF/RCC1 sofort zu RanGTP umgesetzt. Dadurch entsteht ein RanGTP-Gradient über die Kernhülle. Da RanGTP den Nucleus im Komplex mit Transportrezeptoren stetig verläßt, muß der RanGTP-Vorrat im Nucleus über den Re-Import von RanGDP durch den Transportrezeptor NTF2 und anschließenden Nucleotidaustausch wieder aufgefüllt werden.

1. Einleitung

In welche Richtung sich die Affinität zu Transportsubstraten ändert, wenn RanGTP an den Transportrezeptor bindet, hängt von der Richtung des Transports selbst ab. Während die Bindung von RanGTP an ein Importin die Affinität zum Importsubstrat erniedrigt, und damit ein in den Nucleus eintretender Importkomplex zerfällt, gilt für Exportine das Gegenteil: sie binden das Exportsubstrat überhaupt erst, wenn sie bereits RanGTP gebunden haben. Hier zerfällt der Transportkomplex im Cytoplasma unmittelbar nach der RanGAP-vermittelten GTP-Hydrolyse und der damit einhergehenden Dissoziation von RanGDP vom Exportin. Der physiologische Sinn liegt auf der Hand: karyoplasmatisches RanGTP dient für Importprozesse als Indikator des Transportziels, für Exportprozesse dient es als Initiator. So soll einerseits sichergestellt werden, daß ein Komplex aus Importin und Substrat den Nucleus nicht wieder verläßt, ehe das Substrat freigesetzt worden ist, andererseits wird gewährleistet, daß ein Komplex aus Exportin und Substrat im Cytoplasma nicht persistieren kann und ihm damit der Weg zurück in den Nucleus verwehrt ist. Ein vereinfachtes Schema von Kernimport- und -exportprozessen ist in Abb. 3 dargestellt.

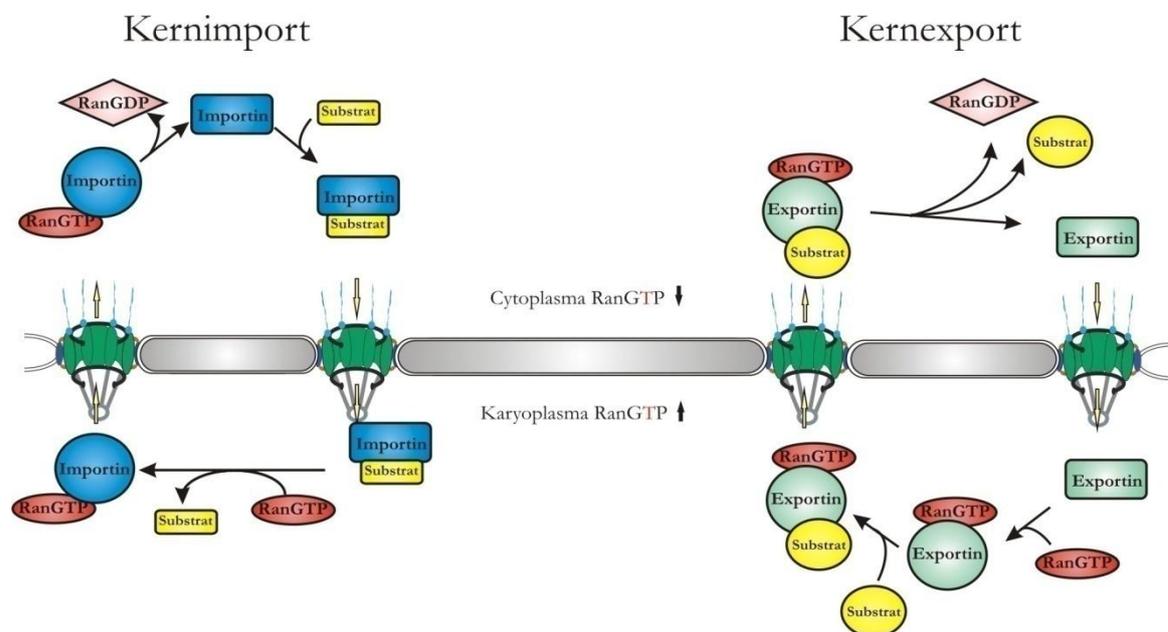


Abb. 3: Der Vergleich von Kernimport- und -exportprozessen zeigt die unterschiedliche Funktion von RanGTP (schematisierte Darstellung).

Ein Kernimportprozeß beginnt mit der spezifischen Erkennung des Importsubstrates durch das Importin. Der gebildete Importkomplex tritt anschließend durch die Kernpore in den Nucleus ein. An der kernwärtigen Seite der Kernpore dissoziiert der Importkomplex durch die Bindung von RanGTP an das Importin. Im RanGTP-gebundenen Zustand kehrt das Importin in das Cytoplasma zurück. Dort hydrolysiert Ran mit der Hilfe von Aktivatoren das gebundene GTP zu GDP, das Importin löst sich von RanGDP und steht für einen weiteren Importzyklus zur Verfügung.

Ein Kernexportprozeß beginnt hingegen im Nucleus mit der Bindung von RanGTP an das Exportin. Dadurch wird die Substrataffinität des Exportins ausreichend erhöht, um eine Interaktion mit dem Exportsubstrat zu ermöglichen. Der Exportkomplex aus Exportin, RanGTP und Substrat transloziert nun durch die Kernpore. Auf der cytoplasmatischen Seite der Kernpore wird RanGTP unmittelbar zu RanGDP hydrolysiert, der Exportkomplex dissoziiert vollständig. Das Exportin kehrt schließlich in den Nucleus zurück.

1.1.2 Der Kernporenkomplex

Die Bindung von Transportrezeptoren an ihre Substrate und deren Freisetzung im Anschluß an den Transportprozeß ist bereits beleuchtet worden. Warum aber sind für den Kerntransport durch den NPC spezifische Rezeptoren nötig, um die Translokation von Substraten zu ermöglichen? Diese Frage ist gleichbedeutend mit der Frage nach dem Mechanismus, wie eine ungerichtete Diffusion von Molekülen verhindert werden kann. Wie eingangs schon erwähnt, gilt die Annahme einer dichten Barriere nur für solche Moleküle, die eine bestimmte Größe, etwa 20 - 30 kDa, überschreiten. Für kleinere Moleküle jedoch ist die Kernpore durchlässig. Die Ursache hierfür liegt im Aufbau des NPC, eine Übersicht über die Struktur des Kernporenkomplexes ist in Abb. 4 gezeigt. Der NPC ist im Wesentlichen aus Kernporenproteinen, den Nucleoporinen zusammengesetzt. Diese Nucleoporine, auch Nups genannt, weisen repetitive Aminosäuresequenzen auf, deren Hauptcharakteristikum das besonders häufige Auftreten von Phenylalaninen und benachbarten Glycinen ist. Daher werden diese Sequenzen auch *FG-repeats* genannt. Obwohl diese *FG-repeats* auch in größeren Abschnitten

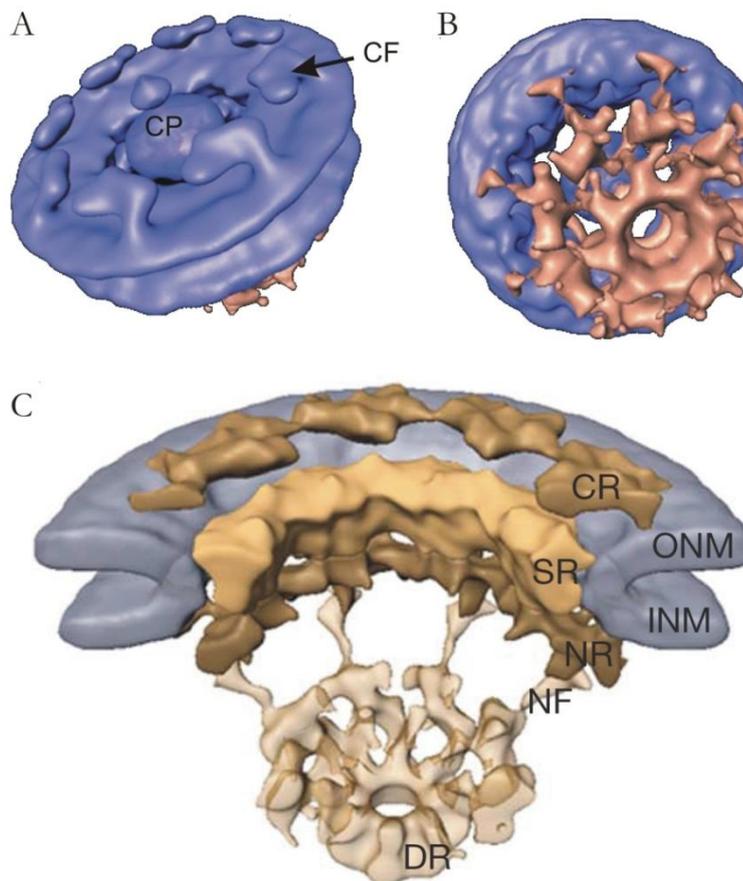


Abb. 4: Aufbau des Kernporenkomplexes (NPC).

(A-C) Dreidimensionale Rekonstruktionen der Kernporenstruktur auf der Basis von Cryo-Elektronen-tomographiedaten. (A) Die Sicht von cytoplasmatischer Seite auf den NPC zeigt deutlich die achtfache Rotationssymmetrie der cytoplasmatischen Filamente (CF) sowie den zentralen, konusförmigen *central plug* (CP), welcher einen großen Teil des Zentralkanals ausfüllt. (B) Auf der karyoplasmatischen Seite befindet sich der *nuclear basket*, dargestellt in rotbraun. (C) Organisation der Kernpore in Querschnittsdarstellung, die Auflösung ist höher als in A und B (CR = cytoplasmatischer Ring, ONM = äußere Kernmembran, INM = innere Kernmembran, SR = Speicher ring, NR = nucleärer Ring, NF = nucleäre Filamente, DR = distaler Ring). A-B modifiziert nach Beck et al., *Science*, 2004. C entnommen aus Beck et al., *Nature*, 2007.

1. Einleitung

derjenigen Proteine vorhanden sind, welche die cytoplasmatischen Filamente und die karyoplasma-tische Korbstruktur (engl. *nuclear basket*) des NPC bilden (Cook et al., 2007; Stewart, 2007), finden sie sich insbesondere in jenen Nucleoporinen in großer Zahl, welche den Zentralkanal des NPC bilden. Durch die Interaktion der FG-*repeats* im Zentralkanal miteinander wird eine hydrophobe Umgebung geschaffen, die den Eintritt größerer Moleküle in den Zentralkanal des NPC besonders wirkungsvoll verhindert. Importine und Exportine hingegen besitzen auf ihrer Oberfläche Bindungsstellen für die FG-*repeats* der Nups. Daher können sie mit den Nups interagieren und auf diese Weise durch den NPC hindurchtreten. Über den genauen Mechanismus der Translokation von Transportkomplexen besteht allerdings noch Unklarheit. Mittlerweile wurden jedoch mehrere kontrovers diskutierte Hypothesen entwickelt, die dieses Phänomen erklären sollen.

Der ersten Hypothese liegt die Beobachtung zugrunde, daß Impß auf dem Weg in den Nucleus einem Affinitätsgradienten folgt (Ben-Efraim & Gerace, 2001). Dabei steigt die Affinität von Impß zu verschiedenen Nups, je näher diese an der karyoplasmatischen Pforte der Kernpore liegen. Im Falle eines Exportprozesses sollte dieser Gradient umgedreht sein. In diesem Modell wird also nicht allein Ran die Gewährleistung der Unidirektionalität des Kerntransports zugeschrieben, sondern auch den Nucleoporinen. Darüber hinaus impliziert diese Hypothese die Möglichkeit, verschiedene Wege durch die Kernpore zu nutzen, in Abhängigkeit vom jeweiligen Transportkomplex.

Dem steht die Beobachtung gegenüber, daß ein bestimmtes Nucleoporin, welches über seinen N-Terminus am *nuclear basket* gebunden ist, einen flexiblen C-Terminus besitzt. Dieser kann sich erstaunlicherweise durch den Zentralkanal bis auf die cytoplasmatische Seite des NPC bewegen (Fahrenkrog et al., 2002). Jenes Nucleoporin ist Nup153, welches als letzter Bindungspartner vieler Importkomplexe vor der terminalen Freisetzung in den Nucleus bekannt ist (Ball & Ullman, 2005). Daher wurde postuliert, daß Nup153 in der Lage ist, einen Importkomplex durch den Zentralkanal zu ziehen, ein Mechanismus, der an die Zunge eines Chamäleons erinnert. Ähnliches konnte auch für ein Nucleoporin gezeigt werden, welches auf der anderen Seite des NPC verankert ist, Nup214. Obwohl der N-Terminus von Nup214 auf der cytoplasmatischen Seite des NPC fest verankert ist, zeigt der C-Terminus ein erhebliches Ausmaß an Flexibilität und konnte daher nicht nur auf der cytoplasmatischen, sondern auch auf der karyoplasmatischen Seite des NPC lokalisiert werden (Paulillo et al., 2005). Da die Bewegungen von Nup153 und Nup214 zu korrelieren scheinen, wurde eine konzertierte Aktivität der am Transport beteiligten Nucleoporine vorgeschlagen. Die hohe Geschwindigkeit der Kerntransportprozesse von etwa 1000 Transportereignissen pro Sekunde (Ribbeck & Görlich, 2001) kann auf diese Weise aber nicht vollständig erklärt werden.

Daher hat wahrscheinlich auch die Natur des Zentralkanals einen entscheidenden Einfluß auf die Transportraten. Wie der Zentralkanal aber beschaffen ist, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Allerdings wird aufgrund der Flexibilität der Nucleoporine angenommen, daß diese ein lockeres, hydrophobes Netzwerk aus filamentösen FG-*repeat*-Domänen aufbauen (Patel et al., 2007; Denning et al., 2003). Dieses könnte dann als molekulares Sieb wirken, welches größere Moleküle zurückhält. Lediglich die Transportrezeptoren wären dann mit ihren FG-*repeat*-Bindungsstellen in der Lage, dieses Sieb zu durchqueren.

In anderen Studien konnte hingegen gezeigt werden, daß die FG-*repeats* einiger isolierter Nucleoporine ein Hydrogel formen können, welches die Permeabilitätseigenschaften des NPC reproduzieren kann (Frey & Görlich, 2007; Frey et al., 2006). Dieser Befund unterstützt das Modell eines anderen Mechanismus der Permeabilitätsbeschränkung im Zentralkanal, das Modell der selektiven Phase (Ribbeck & Görlich, 2001). Demzufolge enthält der Zentralkanal nicht ein molekulares Sieb, sondern ein solides Gel, welches besonders den Transportrezeptoren einen

1. Einleitung

schnellen Ein- und Austritt erlaubt, da diese mit den Phenylalaninen, welche das Gel aufbauen, wechselwirken können.

Klarheit besteht jedoch in Bezug auf die Initiation der meisten Exportprozesse beziehungsweise die Termination von vielen Importprozessen. Sie involviert Nup153, welches Exportine im Komplex mit RanGTP bindet, Importin/RanGTP-Komplexe aber nicht (Ball & Ullman, 2005). Im Folgenden sollen verschiedene Kernimportprozesse näher beleuchtet werden.

1.1.3 Kernimport

Ein einfaches Schema eines Kernimportweges ist bereits in Abb. 3 dargestellt worden. In vielen Fällen sind Importwege jedoch komplexer. Neben dem in Abb. 3 gezeigten Schema, in welchem das Importin direkt an das Substrat bindet, dem sogenannten Einzelrezeptorweg, bildet besonders jener Importweg eine Ausnahme, welcher als der bekannteste gilt, nämlich der Import von cNLS-Substraten über Imp β und Importin α (Imp α , beleuchtet in Stewart, 2007 und Cook et al., 2007). In diesem Importprozeß fungiert Imp β als eigentlicher Transportrezeptor, das heißt es vermittelt die Translokation durch den Zentralkanal der Kernpore. Imp α hingegen stellt den Adapter zwischen Imp β und cNLS-Substrat dar (Abb. 5).

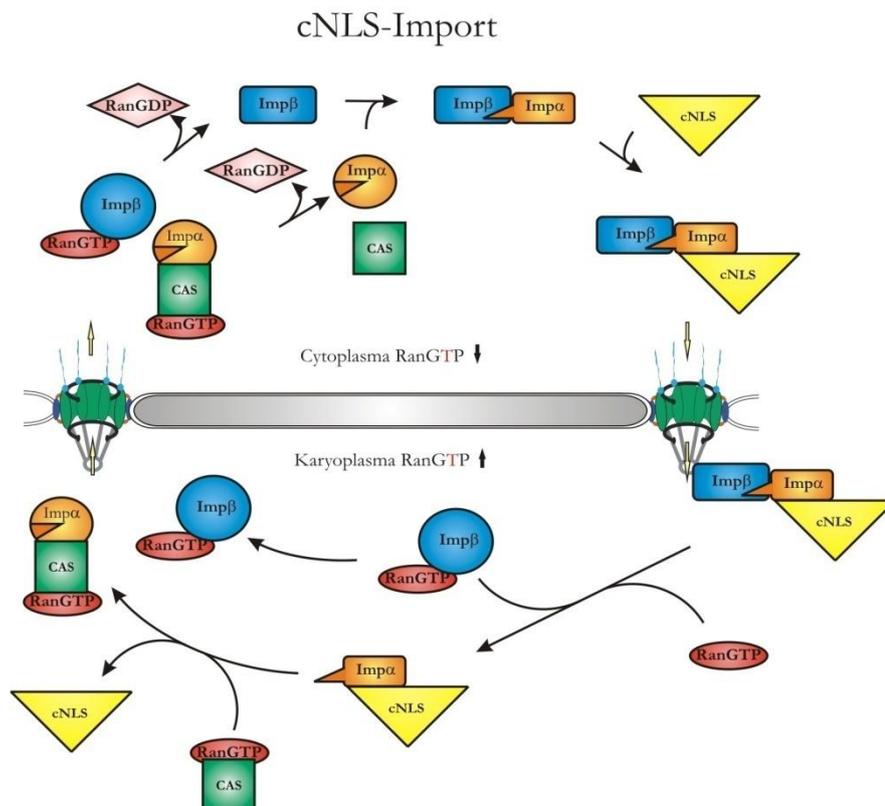


Abb. 5: Der Kernimport von cNLS-Substraten durch Imp β /Imp α .

Imp β fungiert als Transporter, Imp α als Adapter für das Substrat. Für die Erkennung des cNLS muß Imp α aber an Imp β gebunden sein, da die IBB $_2$ vorher eine Autoinhibition ausübt. Der ternäre Importkomplex transloziert nun durch den NPC und wird anschließend vom *nuclear basket* gelöst, indem RanGTP an Imp β bindet. Dabei dissoziiert der Komplex aus Imp α /cNLS-Substrat von Imp β . Das cNLS-Substrat wird schließlich durch CAS/RanGTP-Bindung an Imp α freigesetzt. Die Importin/RanGTP-Komplexe kehren ins Cytoplasma zurück. Nach GTP-Hydrolyse und Freisetzung der Importine kann ein neuer Zyklus beginnen.

1. Einleitung

Die Substraterkennung wird also von Imp α vermittelt. Folglich spricht man hier von einem Rezeptor-Adapter-Weg. In diesem speziellen Fall kann Imp α die Funktion der Substraterkennung jedoch erst nach der Heterodimerisierung mit Imp β wahrnehmen, da die Imp β -Bindedomäne von Imp α (*Importin-beta-binding domain of Importin α* , **IBB α**) in Abwesenheit von Imp β direkt in der Bindungstasche für das cNLS liegt und daher eine autinhibitorische Funktion hat (Harreman et al., 2003a und b; Kobe, 1999). Erst durch die Interaktion mit Imp β wird die IBB α aus der Bindungstasche für das cNLS entfernt. Folglich kann nur ein Imp β /Imp α -Heterodimer das Substrat erkennen. Anschließend erfolgt die Translokation des cNLS-Importkomplexes aus Imp β , Imp α und cNLS-Substrat durch die Kernpore. Schließlich bindet dieser Importkomplex an Nup153 am *nuclear basket* und wird von diesem durch Bindung von RanGTP an Imp β freigesetzt. Gleichzeitig dissoziiert auch der Komplex aus Imp α /cNLS-Substrat von Imp β . Der Imp α /cNLS-Substrat-Komplex zerfällt danach vermutlich erst am Zielort durch die Interaktion des Exportrezeptors CAS, gebunden an ein weiteres Molekül RanGTP, mit Imp α .

Imp β ist jedoch nicht nur am Import von cNLS-Substraten beteiligt, sondern auch an vielen anderen, zum Teil mechanistisch erheblich voneinander abweichenden Importprozessen. Die Vielseitigkeit von Imp β zeigt sich besonders im H1-Kernimport und im Import von U snRNPs. Auf diese Kernimportwege soll nun näher eingegangen werden.

1.2 Kernimport von H1 Linker Histonen durch Imp β /Imp7

Ebenso wie der cNLS-Import weicht auch der Import von Linker Histonen, den H1-Histonen, in den Nucleus vom Einzelrezeptorweg ab. Auch hier werden zwei Importine benötigt, Imp β und Importin7 (Imp7), allerdings wirken beide sowohl in der Substraterkennung als auch in der Translokation durch die Kernpore (Bäuerle et al., 2002; Jäkel et al., 1999). Beide Importine sind also echte Transportrezeptoren. Aus diesem Grund wird ein solcher Importweg auch als Doppelrezeptorweg bezeichnet. In diesem Fall bildet sich zu Beginn des Transportzyklus im Cytoplasma zunächst ein Heterodimer aus Imp β und Imp7 (Abb. 6). Das gebildete Imp β /Imp7-Heterodimer bindet nun kooperativ an das Transportsubstrat, das Linker Histon H1 (Jäkel et al., 1999). Aufgrund des kooperativen Bindungsmechanismus von Imp β /Imp7 wurde in Analogie zu Imp α ein autinhibitorischer Effekt von IBB β auf Imp7 vermutet, so lange Imp7 nicht an Imp β gebunden ist (Jäkel et al., 1999). Dies konnte später ausgeschlossen werden, als eine Bindung von H1 an ein Deletionskonstrukt von Imp7, welchem die IBB-Domäne fehlt, nachgewiesen werden konnte (Bäuerle et al., 2002). Dennoch scheint die Dimerisierung von Imp β und Imp7 die Affinität von Imp β /Imp7 zu H1 zu erhöhen (Jäkel et al., 1999). Ist nun die Bindung von Imp β /Imp7 an H1 erfolgt, so schließt sich der eigentliche Import durch den NPC in den Nucleus an. Auf der karyoplasmatischen Seite des NPC wird der ternäre Komplex aus Imp β /Imp7/H1 vermutlich an Nup153 immobilisiert. Die Dissoziation von Nup153 erfolgt nach Bindung von RanGTP an Imp β . Dabei zerfällt auch der H1-Importkomplex, wahrscheinlich in die Subkomplexe Imp β /RanGTP und Imp7/H1 (Jäkel et al., 1999). Imp β /RanGTP kehrt nun in das Cytosol zurück, während Imp7 das Substrat bis hin zum Chromatingerüst transportieren könnte. Daher wird für Imp7 eine Chaperonaktivität postuliert (Jäkel et al., 1999). Die Freisetzung von H1 wird schließlich durch die Bindung von RanGTP an Imp7 ausgelöst. Auch Imp7/RanGTP kehrt nun in das Cytosol zurück, so daß ein neuer Zyklus beginnen kann.

H1-Kernimport

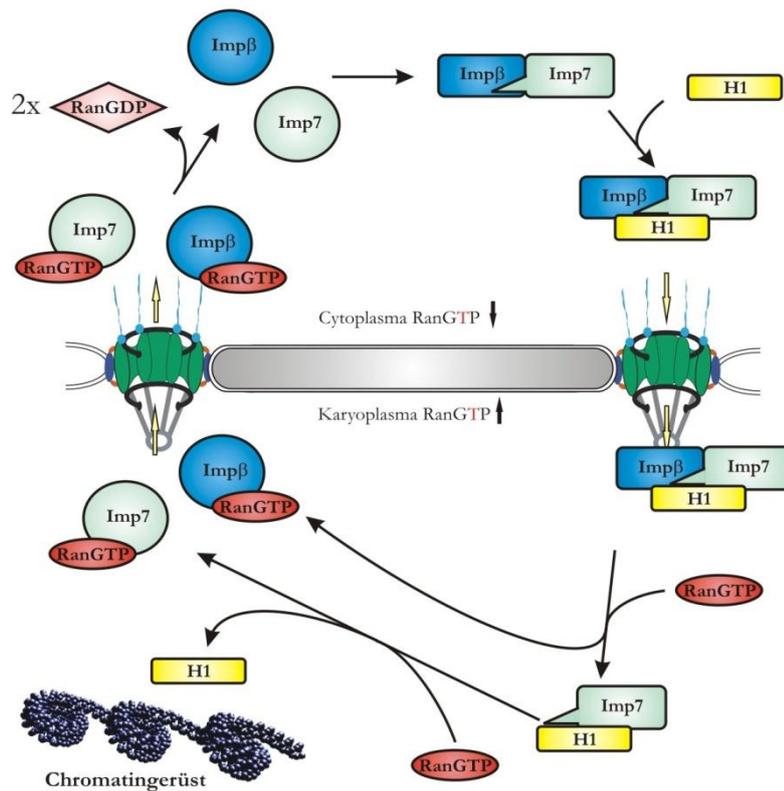


Abb. 6: Der Kernimport von H1 Linker Histonen durch Impβ/Imp7.

Der Kernimport von H1 beginnt mit der Heterodimerisierung von Impβ und Imp7. Es folgt die kooperative Bindung von Impβ/Imp7 an H1. Nach der Translokation durch die Kernpore bleibt der ternäre H1-Importkomplex über Impβ am *nuclear basket* gebunden. Die Bindung von RanGTP an Impβ ist das Signal für die Freisetzung von Impβ vom *nuclear basket* und gleichzeitig für die Dissoziation des H1-Importkomplexes. Während Impβ/RanGTP in das Cytoplasma zurückkehrt, bleibt Imp7 an H1 bis zum Erreichen des Chromatingerüsts gebunden. Dort wird H1 schließlich durch die Bindung von RanGTP an Imp7 freigesetzt. Imp7 tritt schließlich in RanGTP-gebundenem Zustand wieder in das Cytoplasma ein. Nach der cytosolischen GTP-Hydrolyse und einhergehender Dissoziation der Importin/Ran-Komplexe stehen beide Importine für einen neuen Zyklus zur Verfügung.

Erstaunlicherweise sind sowohl Impβ als auch Imp7 neben ihrer Funktion im H1-Import auch funktionelle Transportrezeptoren in Einzelrezeptorwegen, nämlich im Kernimport der ribosomalen Proteine rpS7, rpL5 und rpL23a (Jäkel & Görlich, 1998). Auch hier wurde eine Chaperonfunktion beider Importine vorgeschlagen. Die Gemeinsamkeit zwischen all diesen Substraten ist ihre basische Natur und die damit einhergehende positive Oberflächenladung. Als Erklärung, weshalb Impβ und Imp7 im H1-Import konzertiert agieren, obwohl sie offensichtlich auch als autonome Rezeptoren wirken können, wurde die besonders ausgedehnte, basische Oberfläche der H1 Histone angeführt, welche die Bindung von zwei Rezeptoren erforderlich machen könnte (Bäuerle et al., 2002; Jäkel et al., 1999). Wenn man sich vor Augen hält, daß Impβ daneben auch noch der Transportrezeptor im klassischen cNLS-Import ist, wird diese funktionelle Flexibilität umso beeindruckender.

1. Einleitung

Die Biogenese der U snRNPs beginnt im Nucleus mit der Transkription der prä-U snRNAs der späteren U1, U2, U4 und U5 snRNPs durch die RNA-Polymerase II (Hernandez, 2002). Die prä-U6 snRNA bildet hierbei eine Ausnahme, denn sie wird einerseits von der RNA-Polymerase III transkribiert (Kiss, 2004; Reddy et al., 1987; Kunkel et al., 1986), und im Gegensatz zu den anderen U snRNAs wird die U6 snRNA auch nicht für die weitere Prozessierung zum snRNP in das Cytoplasma transportiert, sondern verbleibt im Nucleus, bis das vollständige U6 snRNP assembliert ist. Die anderen prä-U snRNAs aber werden am 5'-Ende mit einem m⁷G-cap versehen (Shuman, 2002), um einerseits die Stabilität gegenüber 5'-Exonucleasen zu erhöhen (Furuichi et al., 1977) und andererseits ein Signal für den Export ins Cytoplasma zu vermitteln. Parallel wird die U snRNA am 3'-Ende modifiziert (Jacobs et al., 2004; Uguen & Murphy, 2004; Uguen & Murphy, 2003). Hierfür wird eine cis-agierende Sequenz, die sogenannte 3'-Box, und die Phosphorylierung der größten Untereinheit der RNA-Polymerase II benötigt (Medlin et al., 2003). Anschließend bindet der m⁷G-cap-bindende Komplex CBC an die U snRNA. Sie ist nun bereit für den Export in das Cytoplasma (Abb. 7).

Der Export der U snRNA wird durch einen RNA-Export-Adapter (engl. *phosphorylated adaptor for RNA export*, PHAX) und Crm1/RanGTP als Transportrezeptor vermittelt (Will & Lührmann, 2001). Nach der Dephosphorylierung von PHAX und der Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP zerfällt der Komplex (Ohno et al., 2000). Die U snRNA assembliert darauf folgend mit dem SMN-Komplex (von engl. *survival of motor neurons*). Dieser erleichtert die Bindung von 7 Sm-Proteinen, B/B', D1, D2, D3, E, F und G an den U snRNA/SMN-Komplex (Paushkin et al., 2002). Damit ist die Bildung des U snRNPs abgeschlossen, und die weitere Prozessierung kann ablaufen, welche den Reimport des U snRNPs in den Nucleus vorbereitet (Abb. 7).

Ein zentrales Ereignis dieser Prozessierung ist die Hypermethylierung des 5'-caps der U snRNA. Diese Reaktion wird durch die Methyltransferase Trimethylguanosinsynthase1 (Tgs1) katalysiert (Abb. 7, Mouaikel et al., 2002). Dadurch wird das Cap der U snRNA in ein dreifach methyliertes m^{2,2,7}G-Cap konvertiert, welches auch als m₃G-Cap bezeichnet wird. Nach der Hypermethylierung des Caps erfolgt die abschließende Reifung des 3'-Endes der U snRNA. Die überschüssigen Nucleotide werden durch eine nicht näher identifizierte Exoribonuclease entfernt (van Hoof et al., 2000; Neumann de Vegvar & Dahlberg, 1990). Das m₃G-Cap wird nun spezifisch vom Transportfaktor SPN1 erkannt (Strasser et al., 2005; Huber et al., 1998). Das m₃G-Cap stellt jedoch lediglich einen Teil eines bipartiten Importsignals des U snRNPs dar (Fischer et al., 1993; Hamm et al., 1990). Der zweite Teil des Importsignals ist noch nicht genau identifiziert, könnte sich jedoch aus Teilen der U snRNA, des Sm-Ringes und des SMN-Komplexes (Massenet et al., 2002; Narayanan et al., 2002) zusammensetzen. Die Erkennung dieser Teile erfolgt durch mindestens einen weiteren Transportfaktor. Als weiterer essentieller Transportrezeptor für den U snRNP-Import konnte Impβ identifiziert werden (Palacios et al., 1997). Wie nachgewiesen werden konnte, bindet Impβ spezifisch an den Sm-Ring (Fischer et al., 1993) und an den SMN-Komplex (Narayanan et al., 2002). Eine Interaktion zwischen SPN1 einerseits und der U snRNA und einigen Sm-Proteinen andererseits wird gegenwärtig untersucht. Darüber hinaus interagieren Impβ und SPN1 direkt miteinander. Daß auch in diesem Falle die Bindung des zweiten Transportfaktors, nämlich SPN1, an Impβ durch eine IBB-Domäne vermittelt wird (IBB_{SPN1}) soll später noch einige Signifikanz erlangen (siehe unten). Mit der Bindung von SPN1 und Impβ an das U snRNP ist die Assemblierung des Importkomplexes abgeschlossen.

Der U snRNP-Importkomplex wird nun durch den NPC transportiert und tritt ohne Aufenthalt am *nuclear basket* direkt in das Karyoplasma ein. Dies ist umso bemerkenswerter, als bislang kein anderer Importkomplex identifiziert worden ist, der die Bindung von RanGTP nicht benötigt, um sich vom *nuclear basket* zu lösen. Der eigentliche Importprozeß ist also RanGTP-unabhängig. Als Ursache für diese einmalige RanGTP-Unabhängigkeit in der Freisetzung vom *nuclear basket* konnte die Art der

1. Einleitung

Bindung zwischen Imp β und IBB_{SPN1} ermittelt werden (Huber et al., 2002). Dies konnte in Domänen-Austausch-Experimenten demonstriert werden, bei denen IBB_{SPN1} gegen IBB α ausgetauscht wurde. Obwohl das Hybridkonstrukt IBB α -SPN1 seine Importkompetenz unter normalen Bedingungen bewahrte, so war diese in Abwesenheit von RanGTP verloren, im Gegensatz zum Wildtyp von SPN1. Eine Erklärung dieses Phänomens konnte jedoch nicht gefunden werden. Auch die Antwort auf die Frage, wo im Kern RanGTP schließlich benötigt, um den Importkomplex selbst zu dissoziieren, ist bislang ausgeblieben.

Der weitere Weg des U snRNP-Importkomplexes innerhalb des Nucleus ist noch weitgehend unklar, lediglich das Ziel der U snRNPs ist bekannt: sie finden sich in den Cajal bodies wieder (Sleeman et al., 2001; Sleeman & Lamond, 1999), welche der Ort der weiterführenden Biogenese der U snRNPs sind, möglicherweise hin zum vollständig assemblierten Spleißosom (Lemm et al., 2006).

Wo genau durch die Bindung von RanGTP an Imp β der U snRNP-Importkomplex also dissoziiert wird, ist unbekannt. Es wird jedoch diskutiert, daß er bis zur Bindung des U snRNPs an ein karyoplasmatisches Transportprotein oder sogar bis zur Lokalisation in den Cajal *bodies* persistieren könnte (Dickmanns & Ficner, 2005).

1.4 Der Kernimportrezeptor Importin β

Imp β ist einer der vielseitigsten Kerntransportrezeptoren in höheren Eukaryoten. Wie bereits in Abschnitt 1.1 angeführt, ist dies unter anderem mit seinem Aufbau aus sich wiederholenden Struktureinheiten, den HEAT-*repeats*, zu erklären. Imp β interagiert, wie die anderen Mitglieder seiner Proteinfamilie auch, mit RanGTP und den Nucleoporinen des NPC. Zusätzlich kann es eine Vielzahl verschiedener Transportsubstrate, Transportadapter und auch Co-Rezeptoren binden (Tab. 1). Zum Verständnis dieser Variabilität haben Kristallstrukturen von Imp β mit verschiedenen Bindungspartnern beigetragen und liefern einen Einblick in die große strukturelle Flexibilität von Imp β (Abb. 8, Lee et al., 2005; Liu & Stewart, 2005; Lee et al., 2003; Cingolani et al., 2002; Cingolani et al., 1999).

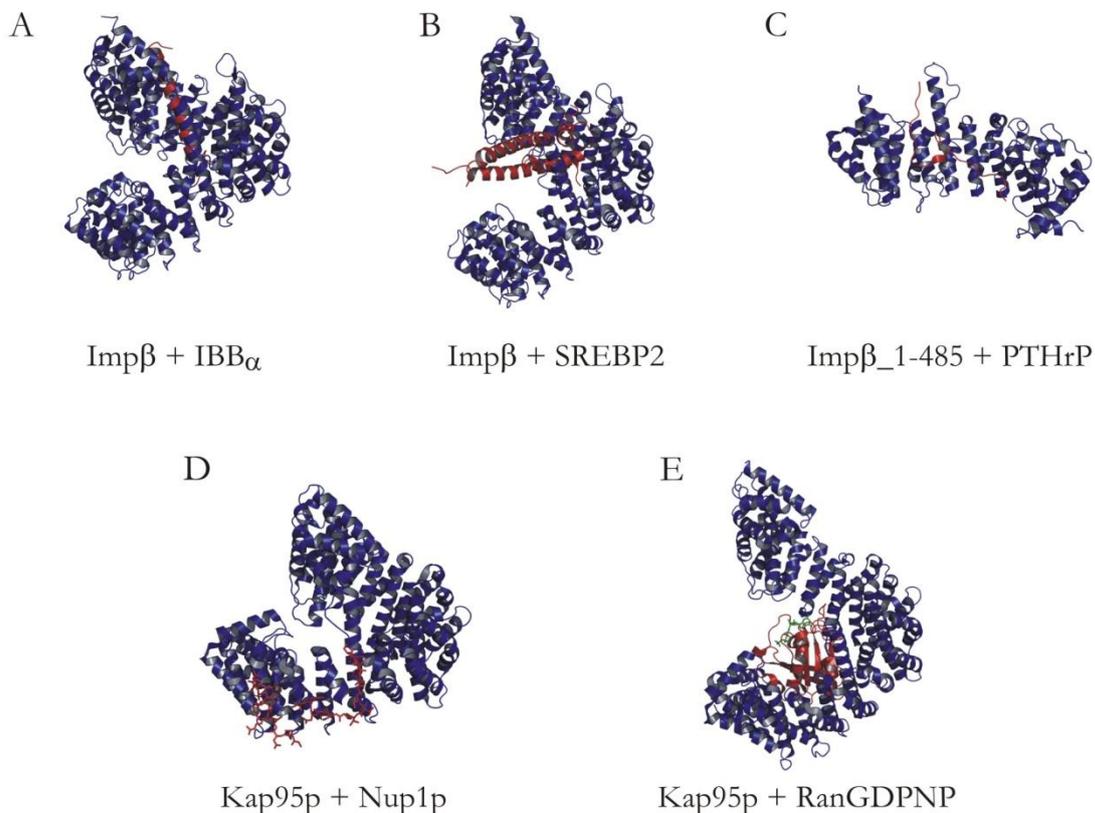


Abb. 8: Kristallstrukturen von Komplexen aus Imp β und verschiedenen Bindungspartnern.

Die Strukturen veranschaulichen die hohe Variabilität von Imp β . Imp β beziehungsweise sein Ortholog aus *S. cerevisiae*, Karyopherin95 (Kap95p), ist in blau dargestellt, der jeweilige Bindungspartner in Ziegelrot. (A) Kristallstruktur von Imp β im Komplex mit IBB α (Cingolani et al., 1999). Imp β nimmt eine geschlossene Konformation ein, die Superhelix ist gedrungen wie bei einer gespannten Feder. (B) Kristallstruktur von Imp β im Komplex mit dem nicht-klassischen NLS von SREBP2 (von engl. *sterol regulatory element-binding protein 2*). Die Superhelix von Imp β hat hier eine deutlich größere Ganghöhe und steht unter einer geringeren Spannung als in (A) (Lee et al., 2003). (C) Kristallstruktur des N-terminalen Bogens von Imp β (AS 1-485) im Komplex mit dem nicht-klassischen NLS von PTHrP (von engl. *parathyroid hormone related protein*). Nur der kristallisierte N-terminale Bogen von Imp β ist an der Interaktion beteiligt (Cingolani et al., 2002). (D) Kristallstruktur von Kap95p und einigen FG-*repeats* von Nucleoporin1 aus *S. cerevisiae* (Nup1p). Die FG-*repeats* von Nup1p sind hier als Stabmodell dargestellt. Im Gegensatz zur Bindungsoberfläche für Substrate, welche sich immer auf der konkaven Innenfläche von Imp β befindet, binden FG-*repeats* an der konvexen Außenfläche von Imp β (Liu & Stewart, 2005). (E) Kristallstruktur von Kap95p im Komplex mit RanGDPNP. Kap95p nimmt hier die entspannteste aller bislang kristallisierten Konformationen von Kap95p/Imp β ein. Die Superhelix hat hier die größte Ganghöhe. Anhand dieser Struktur ist ersichtlich, warum eine Bindung von RanGTP und einem Transportsubstrat (vgl. A-C) an Imp β sich aus sterischen Gründen gegenseitig ausschließen (Lee et al., 2005).

In diesen Kristallstrukturen zeigt sich, daß alle Vorteile, die sich aus der superhelicalen Struktur von Imp β ergeben, auch tatsächlich genutzt werden. So können durch eine Veränderung der Lage unterschiedliche Interaktionspartner an verschiedene Seitenketten von Imp β binden, obwohl sie in der gleichen Region des superhelicalen Moleküls binden. Dies demonstriert ein Vergleich der Komplexe Imp β /IBB α und Imp β /SREBP2 einerseits (Abb. 8A und B) und Imp β /IBB α und Imp β /PTHRP andererseits (Abb. 8A und C). Daneben können sich durch eine Veränderung der Krümmung der Superhelix neue oder andere Interaktionsregionen von Imp β eröffnen, wie am Beispiel Imp β /IBB α und Imp β /RanGTP zu sehen ist (Abb. 8A und E).

Warum jedoch die Bindung von Transportsubstraten oder Adaptern wie Imp α einerseits und RanGTP andererseits sich gegenseitig ausschließen, ist unter anderem damit zu erklären, daß RanGTP saure Seitenketten im N-terminalen Bogen (HEAT-*repeats* 1-11, AS 1-490) von Imp β bindet, welche auch in der Bindung nahezu aller Transportsubstrate involviert sind. Diese Seitenketten sind in einer Schleife lokalisiert, welche auch als saure Schleife bekannt ist (Abb. 1). Diese Bindung von RanGTP an die saure Schleife wurde zunächst als Hauptursache für die Freisetzung von Transportsubstraten oder Adaptern von Imp β nach RanGTP-Bindung angesehen (Vetter et al., 1999; Cingolani et al., 1999). Als das Imp β -Ortholog aus *S. cerevisiae*, Kap95p, in voller Länge mit RanGTP kokristallisiert wurde (Lee et al., 2005), zeigte sich jedoch, daß die relative Orientierung der beiden Bögen der Superhelix von Imp β zueinander von großer Bedeutung ist, denn nicht nur der N-terminale Bogen, sondern auch der C-terminale Bogen von Kap95p (HEAT-*repeats* 12-19) sind in der Interaktion mit RanGTP involviert. Dabei wird Kap95p in einer geöffneten Konformation der Superhelix fixiert. Daher sind wohl auch die Relaxation der Imp β -Superhelix nach RanGTP-Bindung und damit ein allosterischer Effekt maßgeblich für eine Dissoziation der Importkomplexe verantwortlich.

Allen bis hier diskutierten Bindungspartnern von Imp β ist gemein, daß sie mit der konkaven Innenfläche der Superhelix von Imp β interagieren. Die Nucleoporine des NPC hingegen nutzen die Tatsache, daß Imp β auch noch eine zweite Oberfläche für Interaktionen zur Verfügung stellt (Abb. 8D). Sie binden nämlich an die konvexe Außenfläche der Superhelix und nutzen dabei aromatische oder schlicht hydrophobe Bindungstaschen von Imp β . Dies erklärt, warum Imp β gleichzeitig sowohl mit den Nucleoporinen des NPC als auch mit Transportsubstraten oder RanGTP interagieren kann.

Von besonderem Interesse ist die strukturelle Variabilität von Imp β in Hinblick auf den Kernimport von Linker Histonen und U snRNPs, da in beiden Fällen Imp β nicht nur mit dem Co-Rezeptor (H1-Import) beziehungsweise dem Adapter (U snRNP-Import) interagiert, sondern auch das Transportsubstrat selbst spezifisch erkennt. Eine Kristallstruktur, welche dieses komplexere Interaktionsmuster erklären könnte, steht jedoch noch aus.

1.5 Der Kernimportrezeptor Importin7

Wie alle Mitglieder der Imp β -Superfamilie ist auch Imp7 aus HEAT-*repeats* aufgebaut und hat einen niedrigen isoelektrischen Punkt bei pH 4,6 (ExpASY Proteomics Server) und ein Molekulargewicht von 120 kDa (1038 Aminosäuren). Imp7 verfügt über eine N-terminale Ran-Bindungsstelle (Görlich et al., 1997)), eine oder mehrere Nucleoporin-Bindungsstellen, deren Positionen allerdings unbekannt sind, und offenkundig mehr als eine Substratbindungsstelle (Bäuerle et al., 2002; Baake et al., 2001a;

1. Einleitung

Jäkel et al., 1999; Jäkel und Görlich, 1998). Wie von Imp β bekannt, ist auch Imp7 in sich wahrscheinlich sehr flexibel (Fukuhara et al., 2004) und ist somit in der Lage, an die Erfordernisse seiner verschiedenen Substrate zu adaptieren.

Wie zuvor bereits angeführt (vgl. 1.2), kann Imp7 zudem gemeinsam mit Imp β ein Heterodimer bilden, welches dann den funktionellen Importrezeptor für H1 Linker Histone darstellt. Derjenige Teil von Imp7, der die Dimerisierung vermittelt, die Imp β -Bindungsdomäne (*Importin-beta-binding domain of Importin7*, **IBB₇**), umfaßt den C-Terminus (AS 1008-1038, Bäuerle et al., 2002). Allerdings ist IBB₇ mit IBB _{α} nur bedingt vergleichbar. In einem Sequenzvergleich mit anderen bekannten IBB-Domänen zeigt sich nämlich überraschenderweise keine signifikante Homologie zwischen IBB₇ und anderen IBBs. Dies legt einen Interaktionsmodus zwischen IBB₇ und Imp β nahe, welcher sich von dem anderer IBB-Domänen mit Imp β unterscheidet. Dies könnte die Ursache sein, weshalb Imp β im Komplex mit Imp7 zusätzlich noch H1 binden kann.

```
IBB $\alpha$  aa1-53 -----MSTNENANTPAARLHRFFN-KGKDSTEMRRRIEVNVELRRAKDDQLMK-RRNVS
IBBSPN1 aa1-67 MEELSQALASSFSVSDLNSTAAPHPLSQYMSKYSSLEQSERRR---LLELQSKSLDYVNAARLAE
IBBRIP $\alpha$  aa1-51 -----MAESLRSPARSLYMLVGSPPWKEAFRQCLERMNRNSDALLNRYRQAGSSG-
IBB7 aa1008-1038 -----SKMIEKHGGYKFSAPVVPSSFNFGGPAPGMN-----
```

Abb. 9: Rechner-gestützter Sequenzvergleich verschiedener IBB-Domänen.

In diesem Sequenzvergleich zeigt sich die ausgeprägte Konservierung basischer Aminosäuren in allen IBB-Domänen mit Ausnahme von IBB₇. Hier findet sich nach Lys1018 keine weiteren basischen Reste und nur wenige polare, sondern vielmehr zahlreiche hydrophobe Seitenketten. Darüber hinaus ist die IBB-Domäne von Imp7 mit Abstand die kürzeste aller IBB-Domänen. Die IBB-Domäne von SPN1 hingegen weist zusätzlich eine N-terminale Erweiterung von 14 Aminosäuren auf, welche sich in keiner der anderen IBBs findet. Basische Aminosäuren sind mit roten Kästchen markiert, saure mit gelben. Die N-terminale Erweiterung von IBB_{SPN1} ist grau hinterlegt (modifiziert nach Cingolani et al., 1999).

Die Substratbindungsstellen von Imp7 sind bislang unbekannt. Über eine Rechner-gestützte Sekundärstrukturanalyse konnten jedoch zwei putative Schleifen nahe dem C-Terminus identifiziert werden (AS 882-912 und AS 927-957, Wohlwend, 2004), welche jeweils einen hohen Anteil saurer Aminosäureseitenketten enthalten und folglich für die Erkennung der basischen Substrate von Imp7, also ribosomale Proteine (Jäkel & Görlich, 1998), Histone (Bäuerle et al., 2002; Mühlhäusser et al., 2001; Jäkel et al., 1999) und andere, essentiell sein könnten.

Eine Kristallstruktur von Imp7, alleine oder mit Bindungspartnern, fehlt allerdings bislang. So bleibt also eine Erklärung für die Substratspezifität und die gleichzeitige –variabilität im Dunkeln.

1.6 Der Kernimportadapter Snurportin1

SPN1 ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa (360 Aminosäuren) und weist drei voneinander zu unterscheidende Domänen auf. Am N-Terminus ist die Imp β -Bindungsdomäne lokalisiert (IBB_{SPN1}, AS 1-65, Cingolani et al., 1999, Huber et al., 1998). Auf diese folgt die m₃G-Cap-bindende Kerndomäne (AS 97-300, Strasser et al., 2005) und schließlich der C-Terminus (AS 301-360), dessen Funktion noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, der jedoch möglicherweise an

1. Einleitung

weiteren Interaktionen mit der U snRNA oder Proteinen des U snRNPs beteiligt ist (Strasser et al., 2005).

SPN1 gehört, anders als Imp β und Imp7, nicht zur Imp β -Superfamilie, ist also auch nicht aus HEAT-*repeats* aufgebaut, sondern besteht in seiner m₃G-Cap-bindenden Kerndomäne (AS 97-300) im Wesentlichen aus zwei β -Faltblättern, von denen eines aus fünf, das andere aus vier β -Strängen zusammengesetzt ist (Abb. 10, Strasser et al., 2005). Das Letztere ist zusätzlich von vier kurzen α -Helices umgeben.

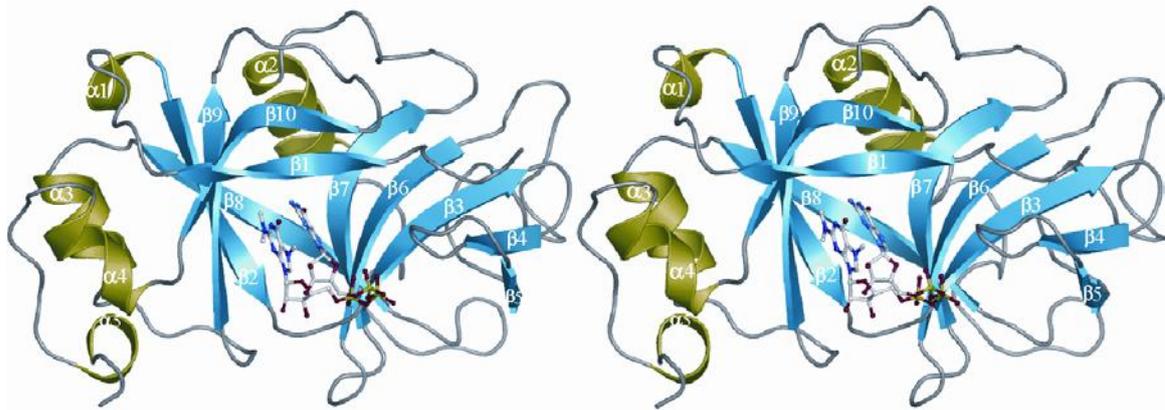


Abb. 10: Stereobild der Kristallstruktur der m₃G-Cap-bindenden Kerndomäne von SPN1 (AS 97-300).

SPN1₉₇₋₃₀₀ besteht aus zwei β -Faltblättern und vier α -Helices, welche eines der beiden β -Faltblätter flankieren. Die Bindungstasche für das m₃G-Cap liegt zwischen den β -Strängen 1 und 10. Dort ist das m₃G-Cap-Analogon m₃GpppG gebunden. Die β -Stränge von SPN1 sind in Himmelblau dargestellt, die α -Helices in Olivgrün. Das Dinucleotid m₃GpppG ist als Kugel-Stab-Modell gezeigt (Abb. entnommen aus Strasser et al., *EMBO J.*, 2005).

Welche Konformationen IBB_{SPN1} und der C-Terminus von SPN1 einnehmen, konnte bislang nicht geklärt werden. Aufgrund der Homologie zwischen IBB_{SPN1} und IBB α (Abb. 9), die bei einem Rechner-gestützten Sequenzvergleich festgestellt wurde (Cingolani et al., 1999), wird angenommen, daß IBB_{SPN1} wie IBB α hauptsächlich α -helical ist. Die Art der Bindung von IBB_{SPN1} an Imp β wurde ebenfalls als mit IBB α vergleichbar angenommen. Im Gegensatz zu IBB α konnte jedoch ein autinhibitorischer Effekt von IBB_{SPN1} ausgeschlossen werden, da keine Interaktion mit den C-terminalen Domänen von SPN1 beobachtet werden konnte (Strasser et al., 2005). Insbesondere aber die strukturelle Erklärung, wie IBB_{SPN1} Imp β nach der Bindung so modifiziert, daß der Imp β /SPN1/U snRNP-Komplex ohne die Bindung von RanGTP an Imp β vom *nuclear basket* dissoziieren kann, ist bis jetzt ausgeblieben.

1.7 Zielsetzung

Das erste Ziel dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung des H1-Kernimports durch Imp β /Imp7 einschließlich einer eingehenden thermodynamischen Analyse der Bildung und Dissoziation des Importkomplexes aus Imp β , Imp7 und H1. Darüber hinaus sollten die gewonnenen Daten genutzt werden, um Kristallstrukturen dieses Importkomplexes interpretieren zu können.

Das zweite Ziel der vorliegenden Arbeit bestand in der strukturellen Untersuchung der RanGTP-Unabhängigkeit der Freisetzung von U snRNP-Importkomplexen vom *nuclear basket* des Kernporenkomplexes. Dazu sollte Imp β im Komplex mit SPN1 kristallisiert werden, um eine Röntgenstrukturanalyse zu ermöglichen. Auch hier sollten thermodynamische Daten zur Strukturinterpretation beitragen.

Diese beiden Ansätze könnten zum tieferen Verständnis von Protein-Protein-Interaktionen unter Beteiligung von Imp β beitragen. Damit sollten die Voraussetzungen für eine übergreifende Analyse Imp β -abhängiger Kernimportprozesse und ihrer energetischen Charakteristika geschaffen werden. Schließlich sollte anhand der Ergebnisse ein tieferes Verständnis der Mechanismen des nucleocytoplasmatischen Transports erlangt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Großgeräte

<i>ABIPrism 3100 DNA Sequencer</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
Agarose Gelelektrophoresekammer	BioRad, München
<i>Äkta Prime</i>	GE Healthcare, München
<i>Äkta Purifier</i>	GE Healthcare, München
Binokulare	
<i>MZ 16</i>	Leica, Solms
<i>MZ 125</i>	Leica, Solms
<i>Frac900</i> Fraktionierer	GE Healthcare, München
Geldokumentationsgerät <i>GelDoc</i>	BioRad, München
Inkubationsschrank <i>Mytron</i>	Schütt, Göttingen
Isothermes Titrationskalorimeter <i>VP-ITC Microcalorimeter</i>	Microcal, USA
<i>Microfluidizer 110S</i>	Microfluidics, USA
Mikroskope	
<i>Leica DM IRE2</i> Confokales LASER-Scanning Mikroskop	Leica, Solms
<i>Leica TCS SP2</i> Spektraldetektor	Leica, Solms
<i>Zeiss Axioskop 20</i>	Carl Zeiss, Jena
PCR Thermocycler	Biometra, Göttingen
pH-Meter	Beckman Coulter, Krefeld
Photometer	Eppendorf, Hamburg
Röntgendiffraktometer <i>Micromax 007</i>	Rigaku/MSC, Japan
Röntgendiffraktometer <i>RU-H3R</i>	Rigaku/MSC, Japan
Röntgendetektor <i>mar345</i>	Marresearch, Norderstedt
Rotoren JA-20, JA-30.50 Ti, JLA-8.1000, S 4180	Beckman Coulter, Krefeld
Taumelrollenmischer <i>RM5</i>	Schütt, Göttingen
Thermomixer <i>Comfort</i>	Eppendorf, Hamburg
Unitron Schüttelinkubatoren	Infors, Einsbach
Vortexer	Schütt, Göttingen
Zentrifugen	

2. Material und Methoden

Tischzentrifuge <i>5415R</i>	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge <i>Allegra 21R</i>	Beckman Coulter, Krefeld
Ultrazentrifuge <i>J-30 I</i>	Beckman Coulter, Krefeld
Vakuumpzentrifuge <i>Speedvac 5301</i>	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge <i>J-20 XPI</i>	Beckman Coulter, Krefeld

2.1.2 Chromatographiesäulen

DEAE-Sepharose FF XK 16/20	GE Healthcare, München
GSH-Sepharose FF XK 16/20	GE Healthcare, München
HisTrap Ni-NTA-Sepharose 5ml	GE Healthcare, München
Mono S HR 5/5	GE Healthcare, München
Hypersil C18 4/200 mm ODS	Bischoff Chromatography, Leonberg
SP-Sepharose HR 10/30	GE Healthcare, München
Superdex 75 10/300 GL	GE Healthcare, München
Superdex 75 XK 16/60	GE Healthcare, München
Superdex 75 XK 26/60	GE Healthcare, München
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare, München
Superdex 200 XK 16/60	GE Healthcare, München
Superdex 200 XK 26/60	GE Healthcare, München

2.1.3 Feinchemikalien

Alle verwendeten Feinchemikalien wurden von den Firmen Applichem (Darmstadt), BioRad (München), Fluka (Buchs), Merck (Darmstadt), Mettler-Toledo (Steinbach), Oxoid (Basingstoke, GB), Roth (Karlsruhe) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen und besitzen den Reinheitsgrad *pro analysi*. Dabei wurde in der Regel der günstigste Anbieter gewählt.

2.1.4 Kitsysteme

<i>Big Dye Terminator v1.1 Mix</i>	Applied Biosystems, Darmstadt
<i>Nucleospin Extract</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>Nucleospin Plasmid</i>	Macherey-Nagel, Düren
<i>Qiagen Plasmid Maxi Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>Qiagen Plasmid Mini Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>Qiaquick Gel Extraction Kit</i>	QIAGEN, Hilden
<i>Qiaquick PCR Purification Kit</i>	QIAGEN, Hilden

2.1.5 Enzyme und Inhibitoren

Aprotinin	Applichem, Darmstadt
<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP)</i>	New England Biolabs, Frankfurt
Leupeptin	Applichem, Darmstadt
Pepstatin	Applichem, Darmstadt
<i>Pfu Turbo Polymerase</i>	Stratagene, USA
<i>Phusion Polymerase</i>	Finnzymes, Finnland
PreScission Protease	GE Healthcare, München
Protease Inhibitor Cocktail "EDTA free"	Roche Diagnostics, Mannheim
Restriktionsendonucleasen (<i>Bam</i> HI, <i>Hind</i> III, <i>Sma</i> I, <i>Xba</i> I)	Fermentas, St. Leon-Rot
<i>Taq Polymerase</i>	New England Biolabs, Frankfurt
T4-DNA-Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot

2.1.6 Zellstämme

BL21 (DE3)	Stammsammlung der AG Ficner
BL21 (DE3) RP	
M15 (pREP4)	
Rosetta (DE3)	
Rosetta2 (DE3)	
SG13009 (pREP4)	
XL1-Blue	

2.1.7 DNA-Oligonucleotide

Die Oligonucleotide (Primer) wurden HPSF-gereinigt von MWG-Biotech (München) bezogen und gemäß den Herstellerangaben gelöst und eingesetzt.

Die Berechnung der Schmelztemperaturen T_m für die verwendeten DNA-Oligonucleotide erfolgte nach der unten angegebenen Formel.

$$T_m = 81,5 + 0,41 (\%GC) - (675/N) \quad \text{mit } N = \text{Anzahl der Nucleotide}$$

Primer	Sequenz 5' → 3'	T_m [°C]
Imp7for	GCGGATCCATGGACCCCAACATCCTG	69,5
Imp7rev	GCAAGCTTTTAATTCATTCCTGGGGC	63,2
Imp7_C75for	GCGGATCCATGCCAGCAGAATTGCCGCCTCATAACC	86,8
Imp7_1-357rev	GCAAGCTTTTATAGTGGGAAGATGAC	61,6
Imp7_358-1038for	GCGGATCCATGTGTACTACTGAC	62,4
Imp7_1-693rev	GCAAGCTTTTACATATCTGTG	54,0
Imp7_694-1038for	GCGGATCCATGCCTCTCCTCCAC	67,8
Imp7_N875rev	CGAAGCTTTTAGGCTCTCTTTAGACCGTTAAAC	67,0
Imp7_876-1038for	CCGGATCCATGTACGCCTGCCATGC	69,5
Imp7_1-916rev	CCAAGCTTTTACAGGTACTCCTG	60,6
Imp7_917-1038for	CGGGATCCATGGAGATTTTAGCC	62,4
Imp7_1-1001rev	CCAAGCTTTTACTGATCTGCCAGTGTAGC	66,7
Imp7_1002-1038for	CCGGATCCATGAGGCGGGCAGCAC	71,3
Imp7_1-875Xrev	CGCCATGGGGCTCTCTTTAGACC	66,0
Imp7_916-1038Xfor	CCCCATGGGTGGAGATTTTAGCC	64,2
Imp7_1-916Xrev	CCCCATGGCAGGTACTCCTGCCC	69,6
Imp7_1002-1038Xfor	CCCCATGGAGGCGGGCAGCAC	69,6
Imp7_XhoIrev	GCCTCGAGTTAATTCATTCCTGGGGC	66,4
pQE_for	CGGATAACAATTTACACAG	53,2
pQE_rev	GTTCTGAGGTCATTACTGG	54,5
pQE80_for	GTGAGCGGATAACAATTTACACAG	61,3
pQE80_rev	CGCCCGCGGCAACCGAGCGTTCT	73,0
Imp7_N875xrev	GGGCGGCCGCGGCTCTCTTTAGACC	74,3
Imp7_C917xfor	CCGCGGCCGCGTGGAGATTTTAGCC	71,2
Imp7_N916xrev	CCGCGGCCGCCAGGTACTCCTGCCC	88,7
Imp7_C1002xfor	CCGCGGCCGCAGGCGGGCAGCACATG	88,7
Imp7N693Xho_rev	GCCTCGAGTTACATATCTGTGAAG	61,0
Imp7N916Xho_rev	CCCTCGAGTTACAGGTACTCCTG	64,2
Imp7N1001Xho_rev	CCCTCGAGTTACTGATCTGCCAGCG	66,3
Imp7N357Xho_rev	GCCTCGAGTTATAGTGGGAAGATG	62,7
Imp7_C598for	CGGGATCCGAGGAAGGAAGTGACGAC	69,5
Imp7_C665for	CGCCATGGATGCAGCAGGTTTCTCCCC	71,0
Imp7_C665rev	CGGGATCCCAGCAGGTTTCTCCCC	69,6
Imp7C755_BamHIfor	CGGGATCCGACCAGGTCATCCCGTTG	71,1
Imp7C824_BamHIfor	CGGGATCCGATGTGACTGCTTCC	66,1
Imp7_C849for	CGGGATCCCAGCGACCCCAAGTG	69,6
Imp7_C857for	GCCCATGGATGTCTCCAGATCCTTCC	71,0

2. Material und Methoden

Primer	Sequenz 5'→3'	T _m [°C]
Imp7_C922for	GGCCATGGATGCAGGCCGGCGAGGAC	74,3
p97f_BamHI	CGCGGATCCATGGAGCTGATCACCATTC	69,5
p97_32f_BamHI	CGCGGATCCAACCTGCCACTTTCTTGTG	71,0
p97_127f_BamHI	CGCGGATCCCCAGAACTCATTCCTCAGC	71,0
p97_210f_BamHI	CGCGGATCCGATAAAGAGTCTGAAAGGC	68,0
p97r_Sma	TCCCCGGGTCAAGCTTGGTTCTTCAG	69,5
p97_641r_Sma	TCCCCGGGACCACCCAACACTTCC	71,2
p97_726r_Sma	TCCCCGGGTCTCCAATAGCAAGGGC	72,6
p97_830r_Sma	TCCCCGGGCCCAAATGCTGTACATAAG	69,5
H1.11LC36_BamHIfor	CGGGATCCAAAGCCCGCAAGCCC	69,6
H1.11LC39_BamHIfor	CGGGATCCAAAGCCCGCGGGCCCC	74,9
H1.11L_HindIIIrev	CCCAAGCTTTTACTTCTTCTTGGC	61,0
pGEX_IBBa_Bam_f	CGGGATCCATGTCCACCAACGAGAATGC	69,5
pGEX_IBBa_Xho_r	GGCGAGCTCCTACTGCAGCGGAGAAG	71,1
Nup153_896C_f	GAAGATCTAACTCAGCAGCCTCCTCATCC	68,1
Nup153_896C_r	CGCTCGAGTTATTTCTTGCCTCTAACAGC	68,1

2.1.8 Vektoren

pQE-9-Imp7 *X. laevis*

Dr. Dirk Görlich, Göttingen

pQE-9-Imp7_1-356 *X. laevis*

pQE-9-Imp7_1-693 *X. laevis*

pQE-9-Imp7_1-916 *X. laevis*

pQE-9-Imp7_1-1001 *X. laevis*

pQE-9-Imp7_357-1038 *X. laevis*

pQE-9-Imp7_694-1038 *X. laevis*

pQE-9-Imp7-876-1038 *X. laevis*

pQE-9-Imp7-917-1038 *X. laevis*

pQE-9-Imp7-1002-1038 *X. laevis*

pQE-80-Imp7 *X. laevis*

Dr. Dirk Görlich, Göttingen

pQE-80-Imp7_1-356 *X. laevis*

pQE-80-Imp7_1-693 *X. laevis*

pQE-80-Imp7_1-916 *X. laevis*

pQE-80-Imp7_1-1001 *X. laevis*

pQE-80-Imp7_357-1038 *X. laevis*

pQE-80-Imp7_694-1038 *X. laevis*

pQE-80-Imp7-876-1038 *X. laevis*

pQE-80-Imp7-917-1038 *X. laevis*

2. Material und Methoden

pQE-80-Imp7-1002-1038 <i>X. laevis</i>	
pQE-80-Imp7Δ876-915 <i>X. laevis</i>	
pQE-80-Imp7Δ917-1001 <i>X. laevis</i>	
pGEX-6P-1-Imp7_598-1038 <i>X. laevis</i>	
pGEX-6P-1-Imp7_665-1038 <i>X. laevis</i>	
pGEX-6P-1-Imp7_694-1038 <i>X. laevis</i>	
pGEX-6P-1-Imp7_755-1038 <i>X. laevis</i>	
pGEX-6P-1-Imp7_824-1038 <i>X. laevis</i>	
pGEX-6P-1-Imp7_876-1038 <i>X. laevis</i>	
pGEX-6P-1-Imp7_917-1038 <i>X. laevis</i>	
pGEX-6P-1-Imp7_922-1038 <i>X. laevis</i>	
pGEX-6P-1-Imp7_1002-1038 <i>X. laevis</i>	
pGEX-6P-1-Imp7_694-1001 <i>X. laevis</i>	
pGEX-6P-1-Imp7_876-1001 <i>X. laevis</i>	
pGEX-6P-1-Imp7_917-1001 <i>X. laevis</i>	
pGEX-6P-1-Imp7_876-916 <i>X. laevis</i>	
pQE-60-Impβ <i>H. sapiens</i>	Dr. Anja Strasser, Göttingen
pGEX-6P-1-Impβ_1-641 <i>H. sapiens</i>	
pGEX-6P-1-Impβ_1-726 <i>H. sapiens</i>	
pGEX-6P-1-Impβ_1-830 <i>H. sapiens</i>	
pGEX-6P-1-Impβ_32-876 <i>H. sapiens</i>	
pGEX-6P-1-Impβ_127-876 <i>H. sapiens</i>	
pGEX-6P-1-Impβ_210-876 <i>H. sapiens</i>	
pTYB2-Impβ_1-396 <i>H. sapiens</i>	Dr. Ralph Kehlenbach, Göttingen
pTYB2-Impβ_304-876 <i>H. sapiens</i>	Dr. Ralph Kehlenbach, Göttingen
pET-11b-Ran/TC4	Dr. Ralph Kehlenbach, Göttingen
pET-13a-H1.11L <i>G. gallus</i>	Dr. Venki Ramakrishnan, Cambridge, UK
pQE-80-H1.11L_36-225 <i>G. gallus</i>	
pQE-80-H1.11L_39-225 <i>G. gallus</i>	
pET-28b-SPN1_1-65 <i>H. sapiens</i>	Dr. Anja Strasser, Göttingen
pKW32-Impα_1-65 <i>H. sapiens</i>	Dr. Ralph Kehlenbach, Göttingen
pGEX-6P-1-Impα_1-65 <i>H. sapiens</i>	
pGEX-6P-1-Nup153_896-1475	

2.1.9 Kristallisationsscreens

Crystal Screen I/II/Light/Cryo/PEG-ION	Hampton Research, USA
Footprint Screens 1-3	Stura et al., 1992
JB Screens 1-10	Jena Bioscience, Jena
Magic Screens 1-4	Biogenova, Kanada
Clear Strategy Screens 1-3	Brzozowski & Walton, 2001
Structure Screens 1-3	Molecular Dimensions, UK
Additive Screens 1-4	Hampton Research, USA
The Classics/The Cryos/The PEGs/pHclear/The AmSO4/The Anions/The Cations/MPD/Opti-Salts/PACT/JCSG+/MbClass	Nextal, USA

2.1.10 Computersoftware

Automar	Marresearch, Norderstedt
ARP/wARP	EMBL, 1998-2007
CCP4 Package	Collaborative Computational Project Number 4, 1994
ClustalW	EMBL-EBI, Pearson & Lipman, 1988
Coot	Emsley & Cowtan, 2004
Denzo/Scalepack	HKL Research, USA
ESPrpt 2.2	Gouet et al., 1999
ExPASy Proteomics Server	SIB, Schweiz
HKL2000	HKL Research, USA
hkl2map	HKL Research, USA – Pape et al., 2004
Origin 7.0	Northampton, USA
ProCheck	Laskowski et al., 1993
PHASER	Read et al., 2001-2004
PyMol 0.99	DeLano Scientific, USA
REFMAC5	Murshudov et al., 1999
XDS	Kabsch, 1993
XPrep	Sheldrick, 2005
XScale	Kabsch, 1993

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Mit Hilfe der PCR können zielgerichtet Gensequenzen amplifiziert werden, indem spezifische Oligonucleotide (Primer) eingesetzt werden, welche komplementär zu jenen Sequenzen der Matrizen-DNA sind, welche die zu amplifizierende Gensequenz flankieren. Dadurch wird das Amplifikat in seiner Länge sowohl am 5'- als auch am 3'-Ende in seiner Länge durch die Anlagerungsposition der Primer an die Matrizen-DNA begrenzt. Im Folgenden werden die allgemeinen Reaktionsbedingungen für eine typische PCR angegeben:

Reaktionszyklus	Temperatur	Dauer	
1. Initiale Denaturierung	94 °C bis 96 °C *	5'	30-45 Zyklen (2.-4.)
2. Denaturierung	94 °C bis 96 °C *	10-30" *	
3. Primer-Anlagerung	T _m -5 °C bis T _m / 15-30" *	15-30" *	
4. Elongation	68 °C bis 72 °C *	30"/kb bis 2'/kb *	
5. Terminale Elongation	68 °C bis 72 °C *	10'	
6. Stop	8 °C	∞	

*Die Zeit- und Temperaturoptima variieren je nach verwendeter Polymerase. Die entsprechenden Optima sind im Folgenden aufgeführt:

Polymerase	Quellorganismus	Zeit- und Temperaturoptima		
		Denaturierung	Primer-Anlagerung	Elongation
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	94 °C/30"	T _m - 5 °C/30"	1'/1kb
<i>Pfu Turbo</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>	94 °C/30"	T _m - 5 °C/30"	2'/1kb
<i>Phusion</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>	96 °C/10"	T _m /15"	30"/1kb

Ein typischer PCR-Ansatz setzt sich wie folgt zusammen:

5 µl	10x PCR-Puffer
je 200 µM	dNTPs
10 pmol	<i>forward</i> -Primer
10 pmol	<i>reverse</i> -Primer
10-100 ng	Matrizen-DNA
1-2 U	DNA-Polymerase
ad 50 µl	ddH ₂ O

2. Material und Methoden

2.2.1.2 Reinigung von PCR-Produkten

Für die Reinigung von PCR-Produkten wurden die Kit-Systeme *Qiaquick PCR Purification Kit* (Qiagen, Hilden) oder *Nucleospin Extract* (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Dabei wurde nach den Angaben des jeweiligen Herstellers verfahren.

2.2.1.3 DNA-Restriktionsverdau

Der Restriktionsverdau von DNA wird nach den Angaben des Herstellers der Restriktionsendonucleasen (Fermentas, St. Leon-Roth) durchgeführt. Die Inkubationszeit beträgt 1h und die Reaktion wird entweder durch Hitzeschock bei 95 °C für 10' oder Auftrennung der Reaktionsprodukte in einem Agarosegel (2.2.1.4) gestoppt.

2.2.1.4 Agarosegelelektrophorese

Laufpuffer (1x TAE)	Probenpuffer 6x
40 mM Tris	0,5 % (w/v) Bromphenolblau
20 mM Essigsäure	0,5 % (w/v) Xylencyanol FF
1 mM EDTA pH 8,0	60 % (v/v) Glycerin

Es werden ausschließlich Gele mit einem Agaroseanteil von 1 % (w/v) verwendet. Die aufzutrennenden Nucleinsäureproben werden mit Probenpuffer versetzt und anschließend bei einer konstanten Spannung von 8-12 V/cm Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend erfolgt eine 30-minütigen Inkubation des Gels in einem Ethidiumbromid-Färbebad (0,1 %). Schließlich wird die DNA im UV-Durchlicht bei 254 nm oder 365 nm (bei folgender Gelelution) detektiert. Die Archivierung erfolgt mit Hilfe eines Geldokumentationsgerätes (*Geldoc*, Biorad, München).

2.2.1.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Für die Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurden die Kit-Systeme *Nucleospin Extract* (Macherey-Nagel, Düren) oder *Qiaquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) verwendet. Dabei wurde nach den Angaben des jeweiligen Herstellers verfahren.

2.2.1.6 DNA-Ligation

Restringierte doppelsträngige DNA mit überhängenden Enden kann mit linearisierter Plasmid-DNA, welche mit den gleichen Restriktionsendonucleasen verdaut worden ist, ligiert werden. Die Ligation

2. Material und Methoden

erfolgt mit T4-DNA-Ligase nach den Angaben des Herstellers (Fermentas, St. Leon-Roth) unter Zusatz von 1 mM ATP bei 4 °C über Nacht. Dabei wird ein 3-5-facher molarer Überschuß des zu inserierenden DNA-Fragments in Relation zum restringierten Plasmid eingesetzt.

2.2.1.7 Plasmidpräparation

Die Präparation von Plasmid-DNA erfolgt mit Kit-Systemen (Qiagen, Hilden) durch alkalische Lyse von Bakterienzellen (XL1-Blue), welche mit dem gewünschten Plasmid transformiert worden sind (2.2.2.2) und anschließende Reinigung der Plasmid-DNA über Silica-Säulchen. In Abhängigkeit von der zu präparierenden DNA-Menge werden 5 ml (Mini), 50 ml (Midi) oder 250 ml (Maxi) LB-Medium (2.2.2.1) mit einem Selektionsantibiotikum versetzt, mit dem transformierten Bakterienstamm inokuliert und über Nacht bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Die Plasmidpräparation erfolgt nach den Angaben des Herstellers und die DNA wird schließlich in 50-250 µl 100 mM Tris pH 8,0 aufgenommen.

2.2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.2.1 Medien für die Aufzucht von *E. coli*

LB-Agar	LB-Medium	2YT-Medium	10x PBS
5 g Trypton	10 g Trypton	16 g Trypton	1,36 M NaCl
2,5 g Hefeextrakt	5 g Hefeextrakt	10 g Hefeextrakt	26,8 mM KCl
5 g NaCl	10 g NaCl	5 g NaCl	100 mM Na ₂ HPO ₄
7,5 g Agar-Agar	ad 1 l dH ₂ O	ad 1 l dH ₂ O	17,6 mM KH ₂ PO ₄ pH 7,4
ad 500 ml dH ₂ O			

LB-Agar-Platten werden einerseits benutzt, um *E. coli*-Stämme für einen Zeitraum von etwa 3 Monaten aufzubewahren, und andererseits eine Vereinzelung von Klonen zu erreichen. Die Flüssigmedien werden entweder zur Plasmidpräparation (LB-Medium, 2.2.1.7) oder zur Proteinexpression (2YT-Medium, 2.2.2.4) verwendet. Zur Selektion auf plasmidvermittelte Antibiotikaresistenzen können alle Medien mit entsprechenden Antibiotika versetzt werden. Für die Langzeitlagerung von *E. coli*-Stämmen werden diese als 1 ml Glycerin-Stock bei -80 °C gelagert, hierzu werden der Bakteriensuspension 30 % (v/v) Glycerin zugesetzt. PBS (*Phosphate-buffered saline*) wird zum Waschen von Bakterienzellen nach der Zellernte verwendet.

2. Material und Methoden

2.2.2.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Stämme

TFB1

30 mM Kaliumacetat pH 7,0
50 mM MnCl₂
10 mM CaCl₂
100 mM RbCl
15 % (v/v) Glycerin
auf pH 5,8 mit 0,2 M Essigsäure

TFB2

10 mM NaMOPS
75 mM CaCl₂
10 mM RbCl
15 % (v/v) Glycerin
auf pH 6,5 mit NaOH

Eine Kolonie des *E. coli*-Stammes, welcher chemisch kompetent für eine Transformation gemacht werden soll, wird in 5 ml LB-Medium überimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Diese Vorkultur wird anschließend in 495 ml LB-Medium überführt und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 wachsen gelassen. Die Ernte der Zellen erfolgt durch Zentrifugation (3.000 xg, 4 °C, 10'). Nach dem Resuspendieren des Pellets in 150 ml eiskaltem TFB1-Puffer werden die Zellen für 5' auf Eis inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation (3.000 xg, 4 °C, 10') werden die Zellen in 5 ml eiskaltem TFB2-Puffer vorsichtig resuspendiert, aliquotiert und zügig in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die kompetenten Zellen werden nun bei -80 °C gelagert.

2.2.2.3 Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Transformation von Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli*-Zellen wird ein 50 µl-Aliquot des entsprechenden Stammes auf Eis unter Zugabe von 10-100 ng Plasmid-DNA oder eines kompletten Ligationsansatzes aufgetaut und 20' auf Eis inkubiert. Nun werden die Zellen einem Hitzeschock bei 42 °C für 60" ausgesetzt und anschließend 2' auf Eis abgekühlt. Schließlich werden 450 µl LB-Medium (2.2.2.1) zugesetzt und der Transformationsansatz für 30' bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. 100 µl des Transformationsansatzes (entsprechend 2-20 ng Plasmid-DNA) werden auf einer Agarplatte mit dem nötigen Selektionsantibiotikum ausgestrichen und diese umgedreht bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.2.2.4 IPTG-induzierte Proteinexpression in *E. coli*

Alle in dieser Arbeit verwendeten Vektoren enthalten ein *lac*-Operon, welches die spezifische Induktion der Expression des Zielgens über das Lactose-Analogon Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) erlaubt. Zu diesem Zweck werden mit dem entsprechenden Vektor transformierte *E. coli*-Zellen in eine 5 ml-Vorkultur überführt, bestehend aus 2YT-Medium, den nötigen Antibiotika und 2 % Glucose zur Unterdrückung der Basisexpression des Zielgens. Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C unter Schütteln wird die Vorkultur auf 500 ml Gesamtvolumen des gleichen Mediums verdünnt und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 1,8 bis 2,2 wachsen gelassen. Anschließend wird die Expression des Zielgens durch Zugabe von 500 ml 2YT-Medium mit entsprechenden Antibiotika und einer zusätzlichen Endkonzentration von 30 mM

2. Material und Methoden

K_2HPO_4 und 100-600 μM IPTG induziert. Die IPTG-Konzentration richtet sich dabei nach dem verwendeten Expressionsvektor und ist im Folgenden aufgelistet:

Expressionsvektor	IPTG [μM]
pQE-9	500
pQE-60	300
pQE-80	100
pET-11b	600
pET-13a	400
pET-28b	400
pKW32	500
pGEX-6P-1	250
pTYB-2b	400

Die Angaben der IPTG-Konzentrationen können darüber hinaus um bis zu 50 % in Abhängigkeit von der Löslichkeit des Zielproteins nach dem Zellaufschluß (2.2.2.5) variieren. Dabei wird bei geringer Löslichkeit in der Regel die IPTG-Konzentration verringert.

Induzierte *E. coli*-Kulturen werden bei 15-20 °C für 18 h unter Schütteln inkubiert und anschließend durch Zentrifugation (5.000 xg, 4 °C, 20') geerntet. Die pelletierten Zellen werden in 1x PBS (2.2.2.1) gewaschen, erneut durch Zentrifugation (4.800 xg, 4 °C, 20') sedimentiert, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und schließlich bei -80 °C gelagert.

2.2.2.5 Zellaufschluß

Eingefrorene Bakterienpellets werden als Vorbereitung für den Zellaufschluß in 20-25 ml Lysispuffer resuspendiert. Dieser richtet sich in seiner Zusammensetzung in der Regel nach dem Puffer des ersten Reinigungsschrittes, zusätzlich enthält er jedoch Proteaseinhibitoren, und zwar entweder ½ Tablette Protease Inhibitor Cocktail „*Edta free*“ (Roche Diagnostics, München) oder 500 μl einer Proteaseinhibitorlösung folgender Zusammensetzung pro 8 g Zellen:

Komponente A	Komponente B
10 mM PMSF in ddH ₂ O	80 μM Aprotinin
	2 mM Leupeptin
	1 mM Pepstatin A
	in DMSO

fertige Proteaseinhibitorlösung	
Komponente A	125 μl
Komponente B	400 μl

2. Material und Methoden

Nach dem Resuspendieren werden die Zellen in einem pneumatischen Zelldesintegrator (*Fluidizer* 110S, Microfluidics, USA) unter Kühlung und hohem Druck (5,5 – 6 bar) aufgeschlossen und die Zelltrümmer sowie unlösliche Bestandteile des Zellsats durch Zentrifugation entfernt (30.000 xg, 4 °C, 40'). Der klare Überstand wird nun dem ersten Reinigungsschritt zugeführt.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Ammoniumsulfatfällung

Die Ammoniumsulfatfällung basiert auf der Möglichkeit, Proteine in Abhängigkeit von ihren biophysikalischen Eigenschaften spezifisch ein- und aussalzen zu können. Da Ammoniumsulfat als kosmotropes Salz hydrophobe Interaktionen innerhalb eines Proteins verstärkt, wirkt es als schonendes Präzipitans, welches ein Protein zwar fallen kann, dieses dabei aber nur selten vollständig denaturiert. Das präzipitierte Protein kann deshalb häufig durch Erniedrigung der Ammoniumsulfatkonzentration wieder gelöst werden und behält dabei seine Faltung bei. Daher eignet sich die Ammoniumsulfatfällung sowohl als Reinigungs- als auch als Konzentrationsschritt während einer Proteinpräparation. Die geeignete Ammoniumsulfatkonzentration für eine spezifische Fällung des Zielproteins muß für jede Präparation experimentell bestimmt werden und erfolgt häufig in mehreren Konzentrationsschritten. Für eine quantitative Fällung muß sichergestellt werden, daß das verwendete Ammoniumsulfat sehr fein gemörsert ist und sehr langsam zugesetzt wird.

2.2.3.2 Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Sepharose

His A	His B
50 mM Tris/HCl pH 7,5	His A
200 – 300 mM NaCl	+ Imidazol (300–500 mM)
2 mM β -Mercaptoethanol	

Affinitätssäulen mit gebundenen zweiwertigen Metallkationen (Ni^{2+} , Co^{2+}) werden zur Reinigung von Oligohistidin-markierten Proteinen eingesetzt. Die Probe, welche das oligohistidin-markierte Protein enthält, wird dabei zunächst auf die Säule geleitet. Das Zielprotein mit Oligohistidin-Markierung wird spezifisch immobilisiert, alle unspezifisch an die Säule gebundenen Proteine werden anschließend bei einer Imidazolkonzentration von 40 mM von der Säule gewaschen. In einem Imidazolgradienten bis zu 500 mM Konzentration kann das Zielprotein nun konzentriert eluiert werden. Nach jeder Nutzung wird die Säule mit 6 M Guanidinium-Hydrochlorid gewaschen und schließlich in 20 % EtOH gelagert. In dieser Arbeit wurden ausschließlich fertige 5 ml HisTrap-Säulen (GE Healthcare, München) verwendet.

2. Material und Methoden

2.2.3.3 Affinitätschromatographie über Glutathion-Sepharose

GSH A	GSH B
50 mM Tris/HCl pH 7,5	GSH A
100 – 300 mM NaCl	+ 25 mM red. Glutathion
2 mM β -Mercaptoethanol	

Zielproteine, welche N-terminal mit Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert sind, können über eine Säule mit kovalent gebundenem Glutathion (GSH) gereinigt werden. Zu diesem Zweck wird die Probe über eine 30 ml GSH-Sepharose-Säule XK 16/20 (GE Healthcare, München) geleitet. Das GST-Fusionsprotein wird spezifisch immobilisiert und kann nach ausgiebigem Waschen mit Ladepuffer GSH A in konzentrierter Form mit 25 mM reduziertem Glutathion im Elutionspuffer GSH B von der Säule eluiert werden. Nach Nutzung der Säule wird diese mit 6 M Guanidinium-Hydrochlorid regeneriert und in 20 % EtOH gelagert.

2.2.3.4 Proteolytische Spaltung mit PreScission Protease

GST-Fusionsproteine mit spezifischer Erkennungssequenz für die *PreScission* Protease, also alle Fusionsproteine, für welche die Vektorserie pGEX-6P codiert, können mit *PreScission* Protease gespalten werden. Dabei wird die GST-Markierung des Zielproteins entfernt. Die Stoffmenge der hierfür benötigten *PreScission* Protease beträgt etwa 1 % der Stoffmenge des zu verdauenden GST-Fusionsproteins. Der proteolytische Verdau wird über Nacht bei 4 °C inkubiert.

2.2.3.5 Anionenaustauschchromatographie über DEAE-Sepharose

DEAE A	DEAE B
50 mM Puffer*	50 mM Puffer*
100 mM NaCl	1 M NaCl
2 mM β -Mercaptoethanol	2 mM β -Mercaptoethanol

* Die Puffer variieren je nach pI des Zielproteins:

Puffer	Zielprotein
50 mM BisTrisPropan/HCl pH 6,5	Alle Imp β - und Imp7-Konstrukte
50 mM Tris/HCl pH 8,0 + 1 mM MgCl ₂	Ran/TC4
50 mM Tris/HCl pH 8,8	Alle H1.11L-Konstrukte

Proteine mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten (pIs) können nach ihrer Oberflächenladung mittels Ionenaustauschchromatographie voneinander getrennt werden. In der Anionenaustausch-

2. Material und Methoden

chromatographie werden Säulen verwendet, die eine Sepharose-Matrix enthalten, an welche Kationen kovalent gebunden sind. Wird ein pH-Wert des Ladepuffers gewählt, welcher etwa 1 bis 2 pH-Einheiten über dem pI des Zielproteins liegt, so wird dieses auf dem Anionentauscher gebunden und kann entweder in einem sinkenden pH- oder einem steigenden Anionengradienten in reiner Form eluiert werden. Hierfür wird die Probe auf eine 30 ml DEAE-Sepharose-Säule XK 16/20 geleitet und anschließend in einem Gradienten von DEAE A nach DEAE B aufgetrennt. Nach Nutzung wird die Säule mit 0,1 M NaOH gewaschen und in 20 % EtOH gelagert.

2.2.3.6 Kationenaustauschchromatographie über SP-Sepharose

SP A	SP B
50 mM Tris/HCl pH 8,8	50 mM Tris/HCl pH 8,8
500 mM NaCl	1 M NaCl
2 mM β -Mercaptoethanol	2 mM β -Mercaptoethanol

In der Kationenaustauschchromatographie werden Sepharose-Säulen mit kovalent gebundenen Anionen verwendet, mit denen lösliche Kationen nach pI getrennt werden können. Der pH des Puffers sollte etwa 1 bis 2 pH-Einheiten unter dem pI des zu reinigenden Zielproteins liegen. Ein gebundenes Kation kann in einem steigenden pH-Gradienten oder einem steigenden Kationengradienten eluiert werden. In dieser Arbeit wurde die Kationenaustauschchromatographie ausschließlich zur Reinigung von H1.11L-Konstrukten verwendet. Dazu wird der Probe NaCl bis zu einer Endkonzentration von 500 mM zugesetzt. Anschließend wird die Probe über eine SP-Sepharose HR 10/30 Säule geleitet und das entsprechende H1.11L-Konstrukt in einem Gradienten von SP A nach SP B eluiert. Die Säule wird anschließend mit 0,1 M NaOH gewaschen und in 20 % EtOH, 200 mM Natriumacetat gelagert.

2.2.3.7 Größenausschlusschromatographie

Gelfiltrationspuffer 1	Gelfiltrationspuffer 2
20 mM Tris/HCl pH 7,5	20 mM Tris/HCl pH 7,5
100 mM NaCl	300 mM NaCl
2 mM β -Mercaptoethanol	2 mM β -Mercaptoethanol
zusätzlich +1 mM MgCl ₂	zusätzlich +1 mM MgCl ₂
in Anwesenheit von RanGDPNP	in Anwesenheit von RanGDPNP

In der Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration) werden Proteine nach ihrer Größe aufgetrennt.

Für die analytische Gelfiltration werden Superdex 75 10/300 GL Säulen und Superdex 200 10/300 GL Säulen verwendet, je nach zu trennender Molekülgröße. Hierfür werden 100-500 μ l Probe

2. Material und Methoden

aufgetragen und im Gelfiltrationspuffer 1 (alle Einzelproteine und alle Proteinkomplexe ohne H1-Subtypen) oder 2 (alle Proteinkomplexe, welche H1-Subtypen enthalten) aufgetrennt.

Für die präparative Gelfiltration werden Superdex 75 XK 26/60 und Superdex 200 XK 26/60 Säulen verwendet, das Auftragsvolumen liegt zwischen 1 und 4 ml Probe. Die Wahl des Puffers ist analog zur analytischen Gelfiltration. Das nötige Konzentrieren der Proteinlösung vor der Gelfiltration erfolgt über Vivaspin Konzentratoren (Sartorius, Göttingen). Die Ausschlußgröße der Membranen, angegeben als Molekulargewicht, wird dabei so gewählt, daß sie unter der Hälfte des Molekulargewichts des zu konzentrierenden Proteins liegt. Nach der Gelfiltration werden die Präparate auf eine Konzentration von 5-15 mg/ml eingengt, in 150 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.3.8 Nucleotidaustausch mit alkalischer Phosphatase (CIAP)

Der Nucleotidaustausch von GDP gegen das nicht hydrolysierbare GTP-Analogon GDPNP erfolgt nach der Methode von John et al., 1988. Dabei wird RanGDP quantitativ zu RanGDPNP umgesetzt. Ein Reaktionsansatz setzt sich wie folgt zusammen:

20 mM	HEPES/KOH pH 7,4
200 mM	NH ₄ SO ₄
1 mM	MgCl ₂
0,1 mM	ZnCl ₂
5 U/mg RanGDP	CIAP

Dem Ansatz wird die gewünschte Menge RanGDP und ein 5-facher Überschuß GDPNP zugesetzt.

Der Reaktionsansatz wird für 90' bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird RanGDPNP von allen anderen Reaktionsprodukten über eine analytische Gelfiltration mit einer Superdex 75 10/300 GL Säule abgetrennt (2.2.3.7). Die Nucleotidaustauscheffizienz wird mittels Perchlorsäurefällung (2.2.3.9) und anschließender HPLC-Umkehrphasenchromatographie (2.2.3.10) verifiziert.

2.2.3.9 Perchlorsäurefällung von Proteinen

Um die Spezies der Guanosinnucleotide, welche an Ran/TC4 gebunden sind, über Umkehrphasenchromatographie zu verifizieren, wird Ran/TC4 mit Perchlorsäure gefällt. dazu werden 10 µl Probe auf Eis mit 1 µl 1 M Perchlorsäure (HClO₄) versetzt und 1' auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 20 µl 2 M Kaliumacetat wird das präzipitierte Protein durch Zentrifugation (16.100 xg, 4 °C, 10") sedimentiert und 10 µl des nucleotidhaltigen Überstands in der Umkehrphasenchromatographie analysiert.

2. Material und Methoden

2.2.3.10 HPLC-Umkehrphasenchromatographie

Hypersil Laufpuffer

0,1 M Kaliumphosphat pH 6,5

7,5 % (v/v) Acetonitril

10 mM Tetrabutylaminobromid

Hypersil Lagerpuffer

50 % (v/v) Acetonitril/H₂O

Die Analyse der Guanosinnucleotidspezies, welche an Ran gebunden ist, erfolgt mittels isokratischer *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) nach Tucker et al. (Tucker et al., 1986). Hierzu wird eine C18 Umkehrphasensäule (Hypersil C18 4/200 mm, Bischoff Chromatography, Leonberg) benutzt. Als Standards werden definierte Mengen GDP, GTP und GDPNP eingesetzt. Anhand dieser Standards können die gebundenen Nucleotidspezies quantifiziert werden. Es werden 10 µl Probe pro Lauf injiziert.

2.2.3.11 Interaktionsstudien über pull down assays

Bindungspuffer

50 mM Tris/HCl pH 7,5

100-300 mM NaCl*

2 mM β-Mercaptoethanol

Elutionspuffer

Bindungspuffer

+ 30 mM red. Glutathion

*100 mM NaCl bei Interaktionsstudien zwischen Impβ- und Imp7-Fragmenten

300 mM NaCl bei Interaktionsstudien mit H1-Subtypen

zusätzlich +1 mM MgCl₂ in Anwesenheit von RanGDPNP

Ein *pull down assay* dient dem qualitativen Nachweis einer Interaktion zwischen zwei Proteinen. In einem solchen Experiment wird ein Protein mit Affinitätssequenz an einer entsprechenden Sepharose-Matrix immobilisiert. Ein zweites Protein, welches als möglicher Interaktionspartner des immobilisierten Proteins in Frage kommt, seinerseits aber nicht mit der Sepharose-Matrix interagieren kann, wird anschließend über die Sepharose-Matrix geleitet. Werden nach ausgiebigem Waschen beide Proteine im Elutionsagens spezifisch von der Sepharose gelöst, so ist eine Interaktion zwischen beiden Proteinen nachgewiesen. Eluiert das zweite Protein allerdings schon beim Waschen, so findet unter den gegebenen Pufferbedingungen keine Interaktion statt. In dieser Arbeit wurden *pull down assays* ausschließlich mit GSH-Sepharose im Eppendorf-Reaktionsgefäß durchgeführt. Dabei werden 2 nmol des GST-Fusionsproteins auf 50 µl GSH-Sepharose in 1 ml Bindungspuffer immobilisiert und durch dreimalige Zentrifugation (1.000 xg, 4 °C, 1') mit jeweils folgendem Pufferaustausch gewaschen. Nun werden 4 nmol des fraglichen, gereinigten Interaktionspartners in 1 ml Bindungspuffer zugegeben und für 20' auf Eis inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in Bindungspuffer mit anschließender Zentrifugation (1.000 xg, 4 °C, 1') erfolgt die Elution der immobilisierten Proteinspezies mit Elutionspuffer. Alle entsprechenden Proben werden mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung analysiert.

2. Material und Methoden

2.2.3.12 Interaktionsstudien über Gelfiltration

Gelfiltrationspuffer 1	Gelfiltrationspuffer 2
20 mM Tris/HCl pH 7,5	20 mM Tris/HCl pH 7,5
100 mM NaCl	300 mM NaCl
2 mM β -Mercaptoethanol	2 mM β -Mercaptoethanol

Bei Interaktionsstudien über analytische Gelfiltration wird die Bildung eines homogenen Proteinkomplexes untersucht. Um eine gute Trennung des Komplexes von kleineren Subkomplexen oder Einzelkomponenten zu erreichen, werden 2-4 nmol des größten beteiligten Proteins mit dem 1,5-fachen Überschuß des nächstkleineren und dem 2-fachen Überschuß des kleinsten Proteins für 20' auf Eis inkubiert und anschließend über analytische Gelfiltration aufgetrennt (2.2.3.7). Bei Interaktionsstudien in Anwesenheit von H1-Subtypen wird Gelfiltrationspuffer 2 verwendet, in allen anderen Fällen Gelfiltrationspuffer 1.

2.2.3.13 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Trenngel 15%	Sammelgel 5 %
15 % Acrylamid / 0,4 % Bisacrylamid	5 % Acrylamid / 0,13 % Bisacrylamid
375 mM Tris/HCl pH 8,8	125 mM Tris/HCl pH 6,8
0,1 % (w/v) SDS	0,1 % (w/v) SDS
0,1 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat	0,1 % (w/v) Ammoniumperoxodisulfat
0,03 % (v/v) TEMED	0,03 % (v/v) TEMED

Laufpuffer	2x Laemmlipuffer
192 mM Glycin	62,5 mM Tris/HCl pH 6,8
25 mM Tris/HCl pH 8,3	70 mM SDS
0,1 % (w/v) SDS	50 % (v/v) Glycerin
	0,1 % (w/v) Bromphenolblau
	5 % (v/v) β -Mercaptoethanol

Färbelösung
10 % (v/v) Ethanol
5 % (v/v) Essigsäure
0.003 % (w/v) Coomassie G/R 250 in EtOH

Für die SDS-PAGE wird ein Gelelektrophoresesystem der Firma Hoefer/GE Healthcare (München) verwendet. Alle zu analysierenden Proben werden 1:1 mit Laemmlipuffer versetzt, mit Ausnahme von Proben aus *E. coli*-Kulturen. Diese werden zunächst zentrifugiert (16.100 xg, 4 °C, 2') und das Zellpellet in 0.2 * OD₆₀₀ ml Laemmlipuffer aufgenommen. Die Auftrennung in der SDS-PAGE erfolgt bei 30 mA für 65'. Die Gele werden in 50 ml Färbelösung inkubiert und in H₂O entfärbt. Die Archivierung erfolgt über ein Geldokumentationssystem (BioRad, München).

2.2.4 Reinigungsprotokolle der verwendeten Proteine

2.2.4.1 Importin β (*Homo sapiens*) in pQE-60

Die Expression von Imp β -(His)₆ in pQE-60 erfolgt in *E. coli* M15 (pREP4) und wird nach den angegebenen Methoden bei 18 °C durchgeführt (2.2.2.1 – 2.2.2.4). Nach dem Zellaufschluß (2.2.2.5) erfolgt eine Ni-NTA-Affinitätschromatographie (2.2.3.2), bei welcher zwei verschiedene Imp β -Spezies im Imidazolgradienten eluieren. Die aktive Spezies eluiert bei etwa 200 mM Imidazol. Es folgt eine Gelfiltration über eine Superdex 200 XK 26/60 Säule (2.2.3.7). Das fertige Präparat wird eingengt, tiefgefroren und bei -80 °C gelagert (2.2.3.7).

2.2.4.2 Importin7 (*X. laevis*) in pQE-9

(His)₆-Imp7 in pQE-9 wird in *E. coli* SG13009 (pREP4) nach den angegebenen Protokollen bei 15 °C exprimiert (2.2.2.1 – 2.2.2.4). Das Expressionsmedium enthält jedoch außer 2YT-Medium, 500 μ M IPTG und 30 mM K₂HPO₄ zusätzlich 4% EtOH, um die Co-Expression von Chaperonen zu induzieren. Außerdem werden für die Präparation immer Zellpellets aus 10 l Expressionskultur verwendet. Nach dem Zellaufschluß (2.2.2.5) erfolgt eine Affinitätschromatographie über 2 hintereinandergeschaltete 5 ml HisTrap-Säulen (2.2.3.2). Imp7 wird anschließend mittels Gelfiltration über eine Superdex 200 XK 26/60 Säule gereinigt (2.2.3.7). Das fertige Präparat wird konzentriert, eingefroren und bei -80 °C gelagert (2.2.3.7).

2.2.4.3 Importin7 (*X. laevis*) und Importin7_1-1001 in pQE-80

Die Expression und Reinigung von (His)₁₀-Imp7 und (His)₁₀-Imp7_1-1001, jeweils in pQE-80, verläuft analog zu (His)₆-Imp7 in pQE-9 (2.2.4.2), allerdings eluieren diese (His)₁₀-Konstrukte in der Affinitätschromatographie über Ni-NTA-Sepharose (2.2.3.2) bei höheren Imidazolkonzentrationen als (His)₆-Imp7.

2.2.4.4 Importin β _1-641, Importin β _1-726, Importin β _32-876, Importin β _127-876 und Importin β _210-876 in pGEX-6P-1

Diese Deletionsmutanten von Imp β (*H. sapiens*) werden als GST-Fusionsproteine in *E. coli* BL21 (DE3) nach den angegebenen Protokollen bei 18 °C exprimiert (2.2.2.1 – 2.2.2.4) und nach dem Zellaufschluß (2.2.2.5) über eine GSH-Sepharose-Säule (2.2.3.3) vorgereinigt. Nach der Spaltung der Fusionsproteine durch *PreScission* Protease (2.2.3.4) werden sie schließlich durch Gelfiltration über eine Superdex 200 XK 26/60 Säule (2.2.3.7) gereinigt. Die Präparate werden konzentriert, eingefroren und bei -80 °C gelagert (2.2.3.7).

2. Material und Methoden

2.2.4.5 *Importin β _127-641 und Importin7_598-1038 in pGEX-6P-1*

Importin β _127-641 (*H. sapiens*) und Importin7_598-1038 (*X. laevis*) in pGEX-6P-1 werden ebenfalls als GST-Fusionsproteine in *E. coli* BL21 (DE3) bei 20 °C exprimiert und analog zu 2.2.4.4 gereinigt und aufbereitet mit der Ausnahme, daß nach Spaltung der Fusionsproteine mit *PreScission* Protease (2.2.3.2) vor der abschließenden Gelfiltration (2.2.3.7) eine Anionenaustauschchromatographie über DEAE-Sepharose erfolgt, um GST und das Zielprotein voneinander trennen zu können (2.2.3.5).

2.2.4.6 *Importin β _1-396 und Importin β _304-876 in pTYB-2b*

Diese Imp β -Fragmente werden jeweils in pTYB-2b als (His)₆-Intein-Fusionsproteine exprimiert. Als Expressionsstamm wird *E. coli* Rosetta2 (DE3) benutzt, die Expression bei 18 °C verläuft nach den angegebenen Methoden (2.2.2.1 – 2.2.2.4). Nach dem Zellaufschluß (2.2.2.5) werden diese Fusionsproteine affinitätschromatographisch über Ni-NTA-Sepharose vorgereinigt (2.2.3.2). Dem Eluat der Affinitätschromatographie werden nun 30 mM DTT zugesetzt und diese Lösung wird anschließend über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dabei wird das Fusionsprotein autoproteolytisch zwischen (His)₆-Intein und dem Zielprotein gespalten. Über eine abschließende Gelfiltration mit einer Superdex 200 XK 26/60 Säule wird das fertige Präparat gewonnen (2.2.3.7). Es kann nun konzentriert, eingefroren und bei -80 °C gelagert werden (2.2.3.7).

2.2.4.7 *Importin7_665-1038, Importin7_824-1038, Importin7_917-1038, Imp7_876-1001, Imp7_917-1001 und Importin7_876-916 in pGEX-6P-1*

Diese GST-Fusions-Konstrukte (alle aus *X. laevis*) werden alle in *E. coli* BL21 (DE3) nach den angeführten Methoden bei 20 °C exprimiert (2.2.2.1 – 2.2.2.4). Nach dem Zellaufschluß (2.2.2.5) werden sie über GSH-Affinitätschromatographie (2.2.3.3) gereinigt und direkt für Bindungsexperimente in *pull down assays* (2.2.3.11) eingesetzt, da die Spaltung dieser Fusionsproteine mit *PreScission* Protease zur Präzipitation führt.

2.2.4.8 *Importin7_1002-1038 und Importin α _1-65 in pGEX-6P-1*

Sowohl GST-Imp7_1002-1038 (*X. laevis*) als auch GST-Imp α _1-65 werden in *E. coli* BL21 (DE3) bei 20 °C exprimiert, wie beschrieben (2.2.2.1 – 2.2.2.4). Nach dem Zellaufschluß (2.2.2.5), GSH-Affinitätschromatographie (2.2.3.3) und *PreScission* Protease Verdau (2.2.3.4) werden diese Deletionsmutanten über eine Superdex 75 XK 26/60 Säule gereinigt und wie angeführt für die Lagerung bei -80 °C prozessiert (2.2.3.7).

2.2.4.9 *Ran/TC4 (Homo sapiens) in pET-11b*

Ran-Aufschlußpuffer

50 mM Tris/HCl pH 8,0

75 mM NaCl

1 mM MgCl₂

2 mM β -Mercaptoethanol

Protease Inhibitoren (2.2.2.5)

Ran/TC4 wird in *E.coli* Rosetta2 (DE3) bei 18 °C exprimiert (2.2.2.1 – 2.2.2.4). Die Zellen werden vor dem Zellaufschluß (2.2.2.5) in Ran-Aufschlußpuffer aufgenommen. Nach dem Zellaufschluß wird das Lysat über eine DEAE-Sepharose Säule (2.2.3.5) geleitet. Ran/TC4 eluiert dabei schon im Durchfluß, während der Großteil der zellulären Proteine an der Säule gebunden bleibt. Aus dem Durchfluß wird Ran/TC4 mit 35 % Ammoniumsulfat ausgefällt (2.2.3.1) und danach über Ultrazentrifugation (100.000 xg, 4 °C, 60') sedimentiert. Ran/TC4 wird nun in 2-3 ml Gelfiltrationspuffer aufgenommen und über eine Superdex 75 XK 26/60 Säule gereinigt (2.2.3.7). Abschließend wird der Nucleotidaustausch gegen GDPNP durchgeführt (2.2.3.8), die Effizienz des Austausches überprüft (2.2.3.9, 2.2.3.10) und das Präparat für die Langzeitlagerung bei -80 °C weiterverarbeitet (2.2.3.7).

2.2.4.10 *H1.11L (Gallus gallus) in pET-13a*

H1.11L-Aufschlußpuffer

50 mM Tris/HCl pH 7,5

100 mM NaCl

Protease Inhibitoren (2.2.2.5)

H1.11L wird in *E. coli* BL21 (DE3) bei 20 °C wie angegeben exprimiert (2.2.2.1 – 2.2.2.4). Die Pellets werden in H1.11L-Lysispuffer aufgenommen, aufgeschlossen und zentrifugiert (2.2.2.5). Das klare Lysat wird auf pH 8,8 titriert und darauf folgend über eine DEAE-Sepharose Säule geleitet (2.2.3.5). H1.11L bindet unter diesen Bedingungen nicht an die Säule und findet sich daher im Durchfluß wieder, während der Großteil der bakteriellen Proteine an der Säule gebunden bleibt. Die NaCl-Konzentration des Durchflusses wird nun auf 500 mM eingestellt. H1.11L kann jetzt aus diesem DEAE-Durchfluß über eine Kationenaustauschchromatographie mit einer SP-Sepharose-Säule gereinigt werden (2.2.3.6). Nach einer Gelfiltration über eine Superdex 75 XK 26/60 Säule wird das Präparat konzentriert, eingefroren und bei -80 °C gelagert (2.2.3.7).

2. Material und Methoden

2.2.4.11 H1.11L_36-225 und H1.11L_39-225 in pQE-80

Diese Deletionskonstrukte von H1.11L werden in *E. coli* SG13009 (pREP4) bei 17 °C exprimiert (2.2.2.1 – 2.2.2.4). Da weder (His)₁₀-H1.11L_36-225 noch (His)₁₀-H1.11L_39-225 an einer Ni-NTA-Sepharose-Matrix immobilisiert werden, ist die Reinigung analog zum Vollängenprotein (2.2.4.10).

2.2.4.12 Snurportin_1-65 (*Homo sapiens*) in pET-28b

SPN1_1-65-(His)₆ wird in *E. coli* Rosetta2 (DE3) bei 18 °C exprimiert (2.2.2.1 -2.2.2.4). Nach dem Zellaufschluß (2.2.2.5) wird SPN1_1-65 über Affinitätschromatographie (2.2.3.2) und Gelfiltration mit einer Superdex 75 XK 26/60 Säule gereinigt (2.2.3.7). Das Präparat wird schließlich bei -80 °C gelagert (2.2.3.7).

2.2.5 Spektroskopische Methoden

2.2.5.1 Bestimmung nativer molarer Extinktionskoeffizienten

Extinktionskoeffizienten nativer Proteine bei 280 nm (ϵ_{280}) werden nach Gill & von Hippel (Gill & von Hippel, 1989) ausgehend vom Lambert-Beerschen Gesetz errechnet:

$$A = \epsilon \times c \times d$$

mit ϵ = molarer Extinktionskoeffizient [$M^{-1} \text{ cm}^{-1}$]

c = Konzentration [M]

d = Schichtdicke der Küvette [cm]

Der Extinktionskoeffizient eines denaturierten Proteins ($\epsilon_{280\text{denat}}$) lässt sich von seiner Aminosäuresequenz ableiten (Software DNASTar, Lasergene). Der native Extinktionskoeffizient läßt sich schließlich aus dem Vergleich der Absorption einer nativen und einer denaturierten Proteinprobe gleicher Konzentration (c) bei 280 nm (A_{280}) in einer Küvette gleicher Schichtdicke (d) bestimmen.

$$\frac{A_{280\text{denat}}}{A_{280\text{nat}}} = \frac{\epsilon_{280\text{denat}} \times c \times d}{\epsilon_{280\text{nat}} \times c \times d}$$

$$\epsilon_{\text{nat}} = \frac{\epsilon_{\text{denat}} \times A_{\text{nat}}}{A_{\text{denat}}}$$

2. Material und Methoden

Dazu wird die Absorption zweier Proteinlösungen identischer Konzentration in je 20 mM Kaliumphosphat pH 6,5 bei 280 nm und 20 °C gemessen, wobei die eine Lösung natives Protein enthält, während die zweite Probe zuvor zusätzlich mit 6 M Guanidinium-Hydrochlorid versetzt und für 2 h bei 37 °C inkubiert worden ist. Sie stellt die denaturierte Probe dar.

2.2.5.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen und Nucleinsäuren

Für die Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen wird entweder Bradford-Reagens benutzt oder der native Extinktionskoeffizient bei 280 nm.

Die Konzentration von Nucleinsäurelösungen wird ausschließlich photometrisch bestimmt. Ausgehend von einem gemittelten Absorptionskoeffizienten für dsDNA, entspricht bei 1 cm Lichtweg eine OD₂₆₀ von 1 in etwa einer Konzentration von 50 µg/ml, während bei ssDNA eine OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 33 µg/µl entspricht.

2.2.6 *in-vitro*-Kernimportassay

Transportpuffer

50 mM HEPES/KOH pH 7,3
110 mM KAcetat
4 mM MgAcetat
1 mM DTT
1 µg/ml Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin A

Transportfaktoren

20 µM RanGDP
0,2 – 2 µM Impβ
0,2 – 2 µM Impβ₁₂₇₋₆₄₁
0,2 – 2 µM Imp7
0,2 – 2 µM Imp7₅₉₈₋₁₀₃₈
0,5 – 2 µM Imp7₁₋₁₀₀₁

ATP-regenerierendes System (pro Experiment)

1 mM ATP
0,2 mM GTP
10 mM Kreatinphosphat
0,05 µg/µl Kreatinphosphatkinase

Substrate

6z-H1⁰ (Fluorescein-isothiocyanat-markiert)
4z-rpL23a (Fluorescein-5'-Maleimid-markiert)

Transportlösung

20 µM RanGDP
ATP-regenerierendes System
Importine wie angegeben
(außer Negativ- und Positivkontrolle)
Reticulocytenlysate (Positivkontrolle)
ad 20 µl Transportpuffer

Der *in-vitro*-Kernimportassay (Adam et al., 1991) wird durchgeführt, um die Transportaktivität rekombinant hergestellter Transportfaktoren zu analysieren. Adhärenz wachsende HeLa-Zellen werden hierfür auf Multitest-Objektträgern mit 10 Fenstern ausgesät und bei einer Konfluenz von ca. 70 % für den Assay verwendet. Nach dreimaligem Waschen in Transportpuffer werden die Zellen mit 50 µg/ml Digitonin in Transportpuffer für 5' bei RT permeabilisiert. Die Zellen werden erneut

2. Material und Methoden

dreimal mit Transportpuffer gewaschen und anschließend auf eine mit Parafilm beschichtete Schale überführt. Auf die gewaschenen Zellen werden jeweils 20 μl Transportpuffer mit 20 μM RanGDP und ATP-regenerierendem System gegeben und für 10' bei RT in einer feuchten Kammer inkubiert, um membrangebundene, endogene, transportaktive Faktoren zu depletieren. Die Zellen werden dreimal mit Transportpuffer gewaschen und anschließend für 10' bei 30 °C (H1-Import) bzw. 37 °C (rpL23a-Import) in einer feuchten Kammer mit 20 μl Transportlösung überschichtet. Die Transportreaktion wird durch dreimaliges Waschen mit Transportpuffer beendet und die Zellen für 10' mit 5 % Paraformaldehyd in 1x PBS fixiert. Die Zellen werden nun mit 1x PBS pH 7.4 dreimal kurz gewaschen.

Für die Immunofluoreszenzdetektion kernlokalisierter oligohistidinmarkierter Transportfaktoren werden die Nuclei anschließend mit 0,5 % Triton X-100 permeabilisiert und dreimal gewaschen. Nach dem Blockieren mit 0,2 % Fischgelatine werden die Zellen mit einem α -His-Antikörper aus *Mus musculus* inkubiert. Nach viermaligem Waschen werden die Zellen mit dem Sekundäntikörper inkubiert, einem Alexa594-markierten α -Maus-Antikörper aus *Capra hircus*. Schließlich werden die Assays luftdicht eingedeckelt. Schließlich wird der Kernimport über Fluoreszenzmikroskopie mit einem Axioskop20 (Carl Zeiss, Jena) analysiert. Konfokale LASER Scanning Mikroskopie zur exakten Lokalisation der Fluoreszenzsignale wird mit einem Leica DM IRE2 Mikroskop, einem Leica TCS SP2 Spektraldetektor und Leica Confocal Software (Leica, Solms) durchgeführt. Die Immunofluoreszenzsignale von 40 zufällig ausgewählten Nuclei pro Experiment werden mit ImageJ quantifiziert. Um verschiedene Kernimportassays vergleichen zu können, wird das durchschnittliche Immunofluoreszenzsignal der Negativkontrolle von allen anderen Meßwerten vor der endgültigen Evaluation abgezogen.

2.2.7 Isotherme Titrationskalorimetrie

ITC-Puffer 1

20 mM Tris/HCl pH 7,3

100 mM NaCl

1 mM MgCl₂

ITC-Puffer 2

20 mM Tris/HCl pH 7,3

200 mM KAcetat

20 mM K-Phosphat

1 mM MgCl₂

Mit Hilfe der isothermen Titrationskalorimetrie (ITC) lassen sich die thermodynamischen Parameter einer Bindungsreaktion erfassen. Dies geschieht über eine experimentelle Bestimmung der Wärmeenergie ΔH , die bei dieser Reaktion freigesetzt (exotherme Reaktion) oder aufgenommen wird (endotherme Reaktion).

Im ITC-Experiment werden wiederholt aus einer Injektionsspritze kleine Volumina einer Lösung eines Moleküls in die Meßzelle titriert, welche eine Lösung des Bindungspartners enthält, man spricht hier von einer diskreten Titration. Die Flächen der Wärmeänderungen jeder Einzeltitration im Titrationsdiagramm werden integriert und gegen den im Experiment zunehmenden Quotienten aus der Konzentration des injizierten Moleküls und des in die Meßzelle vorgelegten aufgetragen. Da bei dieser Art der ITC eine vollständige Sättigung des in die Meßzelle vorgelegten Moleküls erst am Ende des Experiments erreicht wird, kann eine vollständige Titrationskurve mit sigmoidem Kurvenverlauf errechnet werden. Die Abszisse des Wendepunktes stellt die Stöchiometrie N der Bindung dar, seine

2. Material und Methoden

Steigung gibt die Assoziationskonstante K_A an. Basierend auf der Gleichung für die freie Gibbs-Energie

$$\Delta G = \Delta G^0 + RT \ln K$$

und der Annahme, daß bei im Gleichgewicht befindlichen Reaktionen $\Delta G = 0$ gilt, folgt

$$\Delta G^0 = -RT \ln K.$$

Da K bekannt ist (K_A), kann folglich auch ΔG^0 bestimmt werden. Aus der Anwendung von

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$$

folgt schließlich die exakte Berechnung der Bindungsentropie ΔS .

In dieser Arbeit wurden Proteinkonzentrationen von 5 – 10 μM in der Meßzelle und 50 – 120 μM in der Injektionsspritze mit Injektionsvolumina von 5 – 10 μl pro Injektion benutzt. Für die Bestimmung der Bindungskonstanten zwischen Imp β , Imp7, IBB $_7$, IBB $_{\alpha}$, IBB $_{\text{SPN1}}$ und RanGDPNP werden alle Messungen bei 25 °C in ITC-Puffer 1 durchgeführt, ITC-Experimente unter Beteiligung von H1.11L werden bei 10 °C in ITC-Puffer 2 durchgeführt. Die Bestimmung der spezifischen Wärmekapazität der Bindung von Imp β an Imp7 erfolgt in ITC-Puffer 1 bei 10 °C, 15 °C und 25 °C. Um die Vergleichbarkeit dieser Interaktion mit den ITC-Experimenten mit H1.11L zu gewährleisten, wird sie zusätzlich in ITC-Puffer 2 gemessen.

Die Auswertung der Experimente erfolgt mit Origin 7.0 (MicroCal, Northampton, USA). Die Anpassungskurven werden nach dem Modell für eine Bindungsstelle errechnet:

$$\Delta Q(i) = Q(i) + \frac{dV_i}{V_0} \left[\frac{Q(i) + Q(i-1)}{2} \right] - Q(i-1)$$

mit $Q(i)$ = freigesetzte Wärme bei Injektion i

ΔV_i = Injektionsvolumen

ΔV_0 = aktives Meßzellvolumen

Die Anpassung der Ausgleichskurve besteht aus der Berechnung der freigesetzten Wärme für jede Injektion nach obiger Formel, dem Vergleich dieser Werte mit der tatsächlich gemessenen Wärme der entsprechenden Injektion und der Verbesserung der ermittelten Parameter N , ΔH und K_A nach einer Standard-Marquardt-Methode (implementiert in Origin 7.0, MicroCal, Northampton, USA). Diese Prozedur wird iterativ angewandt, bis sich X^2 nicht mehr ändert. X^2 wird nach folgender Formel berechnet:

$$\chi^2 = \frac{1}{n_{eff} - p} \sum [y_i - f(x_i; p_1, p_2, \dots)]^2$$

2.2.8 Röntgenkristallographische Methoden

2.2.8.1 Proteinkristallisation

Die Kristallisation findet in *sitting drop* Kristallisationsschalen (Crychem, Hampton Research, USA) durch Dampfdiffusion statt. In das Reservoir werden 500 μl der Mutterlauge vorgelegt. In die Kristallisationssenkung werden 1-2 μl Proteinlösung mit einer Konzentration von 6-15 mg/ml eingesetzt und 1:1 mit der Mutterlauge gemischt. Die Ansätze werden mit durchsichtigem Klebeband abgedeckt und bei 4, 10 oder 20 °C inkubiert.

2.2.8.2 Seeding-Experimente

Seeding wird eingesetzt, um das Wachstum und die Ordnung von für die Datensammlung ungeeigneten Kristallen zu verbessern. Hierbei unterscheidet man zwischen Makro- und Mikroseeding. Beim Makroseeding werden kleine Einkristalle in Kristallisationsansätze überführt, welche frisch präpariertes Protein enthalten. Auf diese Weise soll die Wachstumsphase der Kristalle ausgedehnt werden, um größere Einkristalle zu produzieren. In Mikroseedingexperimenten werden hingegen zunächst erste Kristalle physisch zerstört. Die resultierenden winzig kleinen Kristallsplitter werden als Kristallisationskeime anschließend in frisch angesetzte Kristallisationsexperimente überführt. Diese Technik wird hauptsächlich angewandt, um die Kristallordnung zu verbessern oder aber, wenn Makroseeding nicht erfolgreich ist. In dieser Arbeit wurde Mikroseeding erfolgreich eingesetzt, um ein Wachstum von Kristallen des Komplexes aus Imp β _127-876 und der Imp β -Bindedomäne von SPN1 (SPN1_1-65, IBB_{SPN1}), welches nur wenige μm übersteigt, von einer auf zwei Dimensionen zu erweitern. Hierzu werden Einkristalle aus einem klassischen Kristallisationsexperiment in 20 μl einer frischen Kristallisationsbedingung überführt und zu unsichtbaren Kristallfragmenten, den *Seeds*, zerteilt. Von dieser Kristallsuspension (1:20) wird eine Verdünnungsreihe angesetzt (1:100, 1:200, 1:500). Die Keime werden nun in frisch präparierte Kristallisationsansätze überführt, welche zuvor 1 h vorinkubiert worden sind. Dies kann entweder durch Zugabe von 0.2 μl unterschiedlich verdünnter Kristallsuspension in die Kristallisationsbedingungen geschehen (klassisches Mikroseeding), oder durch Überführung einzelner Kristallisationskeime in die frischen Kristallisationsexperimente mittels eines Katzenschnurrhaars (Hauskater Pedro, 2003). Hier spricht man von *Streak-Seeding*. Da die Anlagerung von Molekülen an einen bereits gebildeten Kristall, im Gegensatz zur Kristallneubildung, thermodynamisch begünstigt ist, wird das Wachstum der bestehenden Kristallisationskeime bevorzugt, während die Kristallneubildung unterdrückt wird.

2.2.8.3 Kryo-Kristallographie

Die Wahl des Kryopuffers, in welchem ein Kristall für die Kryo-Kristallographie vorbereitet wird, kann einen sehr großen Einfluß auf das Beugungsverhalten des Kristalles haben. Die Zusammensetzung des Kryopuffers muß die Bildung von Eiskristallen bei 100 K verhindern, welche sonst nicht nur ein eigenes Beugungsverhalten zeigen, welches die Datenauswertung erschweren

2. Material und Methoden

kann, sondern auch den Proteinkristall durch Scherkräfte zerstören können. Üblicherweise werden Kristalle direkt in einer kleinen Nylonschleife, mit welcher sie aus der Kristallisationsbedingung herausgehoben worden sind, mit Kryopuffer benetzt und anschließend für die Messung im 100 K kalten N₂-Strom auf dem Goniometerkopf montiert. Die direkte Überführung in Kryopuffer kann das Beugungsverhalten allerdings auch negativ beeinflussen, so daß eine schrittweise Erhöhung der Konzentration des Kryoprotektans erforderlich sein kann. Kristalle des Komplexes aus Imp β _127-876 und IBB_{SPN1} können direkt in den finalen Kryopuffer überführt werden, bestehend aus der Kristallisationsbedingung und zusätzlich 20 % Glycerin.

2.2.8.4 Datensammlung

Kristalle werden zur Datensammlung auf einem Goniometerkopf im Schnittpunkt des Röntgenstrahls mit der Rotationsachse des Goniometers montiert. Ein nativer Datensatz eines Kristalles von Imp β _127-876/IBB_{SPN1} wurde am Strahlrohr 7T WLS/2-KMC2 (BL 14.2 der Proteinstrukturfabrik PSF) am Berliner Elektronensynchrotron (BESSY) bei 100 K, einer Wellenlänge von 0.91841 Å und einem Kristall-Detektor Abstand von 18 cm mit einem CCD-Detektor (mar165ccd, Marresearch, Norderstedt) aufgenommen. Pro Aufnahme wurde der Kristall 20" belichtet. Der Kristall wurde insgesamt um 174° bei 1° Rotation pro Bild gedreht. Zur Indizierung, Integration und Datenreduktion werden die Programme XDS, XSCALE (Kabsch, 1993) und XPREP (Sheldrick, 2005) benutzt

2.2.8.5 Phasenbestimmung (MR) und Berechnung der Elektronendichteverteilung

Um aus den gemessenen Beugungsdaten eine Elektronendichteverteilung zu berechnen, wird eine Fourier-Transformation angewandt, welche die experimentellen Beugungsdaten im reziproken Raum mit der Elektronendichte im Realraum verbindet (Rhodes, 2006; Messerschmidt, 2007).

$$\rho(xyz) = 1/V \sum_h \sum_k \sum_l \vec{F}_{hkl} e^{-2\pi i(hx+ky+lz)}$$

Für Strukturfaktoren \vec{F}_{hkl} gilt:

$$\vec{F}_{hkl} = |F_{hkl}| e^{i\varphi(hkl)}.$$

Daraus wird ersichtlich, daß die Kenntnis der Phasen $\varphi(hkl)$ zwingend notwendig ist für die Berechnung der Elektronendichte:

$$\rho(xyz) = 1/V \sum_h \sum_k \sum_l |F_{hkl}| e^{-2\pi i(hx+ky+lz)+i\varphi(hkl)}$$

Die Phaseninformation kann bei kleinen Molekülen (bis etwa 100 Atome) durch direkte Methoden erhalten werden. Bei komplexeren Molekülen jedoch müssen andere Methoden gewählt werden. So kann die Phaseninformation zum Beispiel durch Anomale Dispersion (SAD/MAD) oder durch isomorphen Ersatz (SIR/MIR) ermittelt werden. Zeigen die verwendeten Schwermetallionen bei der angewendeten Wellenlänge ein anomales Dispersionsverhalten, ist auch eine Kombination des

2. Material und Methoden

isomorphen Ersatzes und der anomalen Dispersion möglich. Ist dagegen bereits ein Molekül mit ähnlicher bekannter Struktur in der Protein-Datenbank verfügbar, kann die Methode des molekularen Ersatzes (MR) angewendet werden. Dabei wird von der Möglichkeit Gebrauch gemacht, eine Patterson-Karte berechnen zu können, welche eine interatomare Vektorkarte ist, die durch Quadrierung der Strukturfaktoramplituden und Nullsetzen aller Phasen erhalten wird (Rhodes, 2006).

$$P(u, v, w) = 1/V \sum_{hkl} |F_{hkl}|^2 e^{-2\pi i(hu+kv+lw)}$$

Die Patterson-Karte der unbekanntes Struktur kann nun über eine Rotationsfunktion, basierend auf der *maximum-likelihood*-Methode, in Korrelation zur Patterson-Karte der bekannten Struktur, dem Suchmodell, gebracht werden. Die höchste Korrelation tritt dabei auf, wenn sowohl die unbekanntes als auch die bekannte Struktur annähernd gleich orientiert sind. Die Orientierung des Suchmodells kann in Eulerwinkeln angegeben und für die anschließende Translationssuche genutzt werden. Bei dieser wird in einer sog. *fast translation function* das Suchmodell durch Translation in die korrekte Position in der Einheitszelle verschoben. Auch hier wird nach der höchsten Korrelation der Patterson-Karten von Suchmodell und unbekanntes Struktur gesucht. Die korrekte Translation wird in kartesischen Koordinaten angegeben.

Mit den Ergebnissen der Rotations- und der Translationssuche können nun die Phasen der unbekanntes Struktur ermittelt werden. Diese Methode kam bei der Strukturbestimmung des Komplexes Imp β _127-876/IBB_{SPN1} zum Einsatz. Hierfür wurde das Programm PHASER verwendet.

2.2.8.6 Modellbau und Strukturverfeinerung

Das Modell der Struktur von Imp β _127-876/IBB_{SPN1} wurde in COOT (Emsley & Cowtan, 2004) gebaut und mit dem CCP4-Softwarepaket verfeinert. Nach einem Vergleich des Modells, welches aus dem molekularen Ersatz resultiert, mit der $2 F_{obs} - F_{calc}$ Elektronendichtekarte werden zunächst alle Bereiche des Modells gelöscht, welche nicht mit der Elektronendichtekarte übereinstimmen, ebenso wie solche, welche eine gemeinsame Dichte okkupieren und daher einander überlagern. Anhand dieses neuen Modells werden die Strukturfaktoren erneut verfeinert. In die nicht besetzten Bereiche der verfeinerten Elektronendichtekarte wird ein C α -Gerüst eingepaßt, welches nach ersten Strukturverfeinerungen schrittweise in die Aminosäuresequenz überführt wird. Während der Strukturverfeinerung werden sowohl die van-der-Waals-Abstände, polare und ionische Wechselwirkungen und Temperaturfaktoren der einzelnen Atome (B-Faktoren) berücksichtigt, als auch die beobachteten den berechneten Strukturfaktoren angeglichen. Die Qualität der Angleichung wird durch Vergleich der beobachteten und der aus dem Modell berechneten Strukturfaktoramplituden abgeschätzt. Als Maß für die Übereinstimmung wird der R-Faktor verwendet. Der kristallographische R-Faktor R_{crist} ist der aus diesem Vergleich berechnete Fehler und ist definiert als:

$$R_{crist} = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum F_{obs}}$$

F_{obs} entspricht den beobachteten und F_{calc} den berechneten Strukturfaktoramplituden. Zur weiteren Kontrolle der Strukturverfeinerung wird der freie R-Faktor (R_{free}) herangezogen, der sich auf dieselbe

2. Material und Methoden

Weise wie R_{cryst} berechnet, jedoch von nicht in die Verfeinerung einbezogenen Reflexen (5 %) Gebrauch macht. Dieser sogenannte Testsatz wird zur Kreuzvalidierung eingesetzt, um die Konvergenz der Strukturverfeinerung zu kontrollieren. Darüber hinaus wird die verfeinerte Elektronendichtekarte mit der ursprünglichen Dichte, berechnet aus der Phaseninformation des molekularen Ersatzes, verglichen und die resultierende $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichtekarte zum Abgleich während des Modellbaus verwendet.

3. Ergebnisse

3.1 Funktionelle Analyse des H1-Kernimports durch Imp β /Imp7

In früheren Studien konnte gezeigt werden, daß das Imp β /Imp7-Heterodimer der einzige funktionelle Kernimportrezeptor für H1 Linker Histone ist (Bäuerle et al., 2002; Jäkel et al., 1999). Ebenso konnten durch Kartierungsexperimente die Bindungsstellen von Imp β sowohl für Imp7 als auch für den H1-Subtypus H1⁰ identifiziert werden (Jäkel et al., 1999). Die Imp7-Bindungsstelle wurde dabei auf einen Bereich eingegrenzt, welcher die HEAT-*repeats* 4-9 (AS 143-409, minimale Bindungsstelle AS 203-364) umfaßt, die H1⁰-Bindungsstelle erstreckt sich von HEAT-repeat 6-19 (AS 203-876, minimale Bindungsstelle AS 203-618). Beide Bindungsstellen überlappen also offenbar im zentralen Bereich von Imp β . Wie bereits angeführt (vgl. 1.5) konnte auch die Imp β -Bindungsdomäne von Imp7, IBB₇, bereits identifiziert werden (AS 1008-1038, Bäuerle et al., 2002).

Allerdings waren sowohl die H1-Bindungsstellen von Imp7 als auch die Bindungsstellen von Imp β für alle H1-Subtypen außer H1⁰ unbekannt. Weiterhin sollten die spezifischen Eigenschaften beider Importine im H1-Import in einem zellbasierten *in-vitro*-System näher beleuchtet werden. Darüber hinaus fehlten thermodynamische Daten zur Charakterisierung der Bindungsprozesse zwischen Imp β , Imp7 und H1. Diese waren insbesondere in Hinblick auf die postulierte Kooperativität von Imp β /Imp7 und ihre Chaperonaktivität von großem Interesse. Schließlich sollte anhand der thermodynamischen Charakterisierung der Komplexbildung geklärt werden, ob energetische Gründe für das Erfordernis eines Importrezeptor-Heterodimers im H1-Import ursächlich sind.

3.1.1 Generierung von Deletionsmutanten von Imp β und Imp7

Um eine eingehende Kartierung der Bindungsstellen aller Komponenten des H1-Importkomplexes füreinander zu ermöglichen, wurden zunächst Deletionsmutanten von Imp β und Imp7 kloniert und gereinigt (vgl. 2.2.1 – 2.2.5). Die generierten Mutanten sollten zur Bestimmung der Bindungsstellen für die H1-Subtypen H1.2 und H1.11L (Imp β und Imp7) und zusätzlich für H1⁰ (Imp7) herangezogen werden. Weiterhin sollten sie dazu dienen, die Effekte der Heterodimerisierung von Imp β und Imp7 auf die H1-Bindung thermodynamisch mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) zu quantifizieren.

3.1.1.1 Deletionsmutanten von Imp β

Zur Planung der Deletionsstellen von Imp β wurde die Kristallstruktur von Imp β im Komplex mit IBB_x herangezogen (Cingolani et al., 1999). Dabei wurden die Schnittstellen so gewählt, daß immer nur ganze HEAT-*repeats* deletiert wurden. So sollte eine korrekte Faltung des jeweiligen Deletionskonstruktes gewährleistet bleiben. Im Übrigen wurde vorgegangen, wie in 2.2.1 - 2.2.2 angegeben. Eine Liste aller generierter Imp β -Deletionsmutanten findet sich in Abb. 11 wieder.

3. Ergebnisse

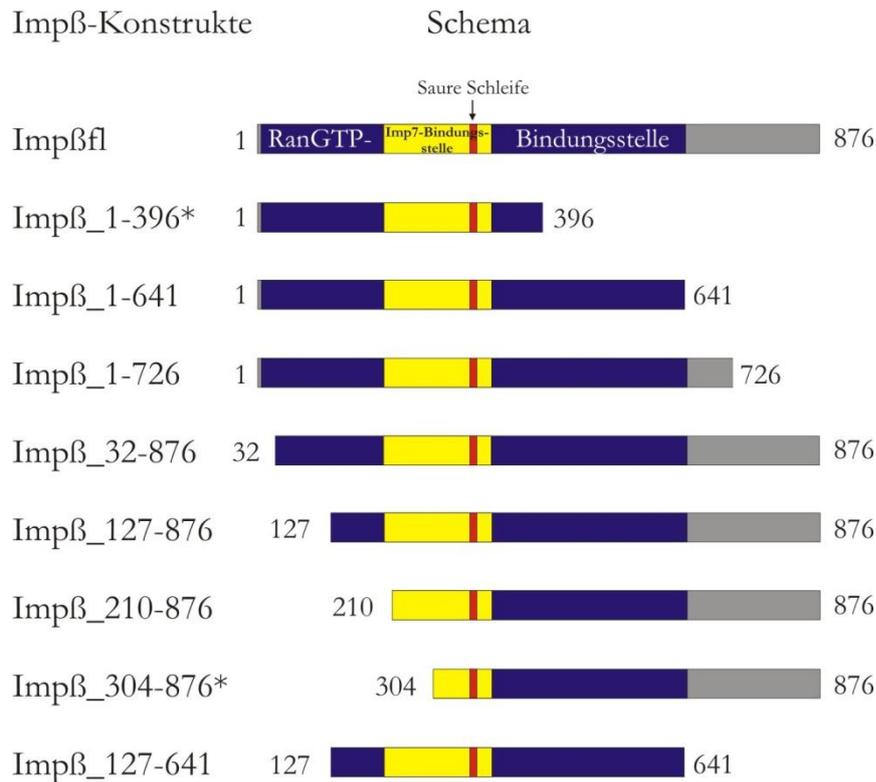


Abb. 11: Deletionskonstrukte von Imp β .

Es sind alle verfügbaren Deletionsmutanten aufgeführt, welche sich später auch reinigen ließen. Das Konstrukt Imp β _1-830 wurde zwar ebenfalls kloniert, ließ sich aber nicht reinigen. In Blau ist die bekannte RanGTP-Bindungsstelle dargestellt (AS 14-650 in Kap95p, Lee et al., 2005), in Gelb die minimale Bindungsstelle für Imp7 (AS 203-364, Jäkel et al., 1999). Die saure Schleife von Imp β (AS 333-343) ist rot. Die Konstrukte Imp β _1-396 und Imp β _304-876, welche mit einem Stern markiert sind, wurden von R. Kehlenbach (Göttingen) zur Verfügung gestellt. Als Referenz ist Imp β in voller Länge (Imp β fl) angeführt.

Einigen dieser Deletionsmutanten, namentlich Imp β _1-396 und allen N-terminalen Deletionen, fehlt ein signifikanter Teil der RanGTP-Bindungsstelle, Imp β _304-876 zusätzlich noch ein großer Teil der Bindungsstelle für Imp7. Anhand der unter 2.2.2-2.2.5 angegebenen Protokolle konnten alle in Abb. 11 angeführten Imp β -Deletionsmutanten in Mengen gereinigt werden, welche eine eingehende funktionelle Charakterisierung erlauben. Die gereinigten Produkte sind in Abb. 12 dargestellt.

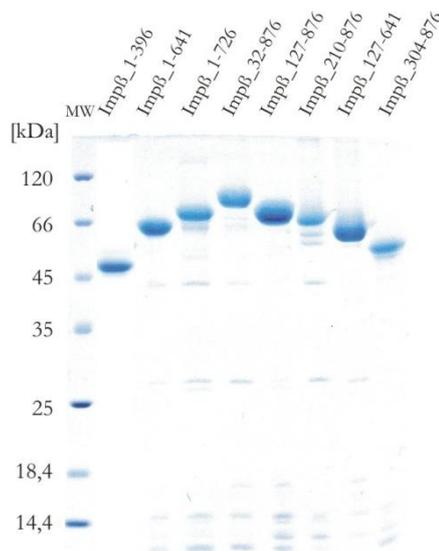


Abb. 12: Gereinigte Deletionsmutanten von Imp β .

Dargestellt ist eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung aller Imp β -Fragmente nach der abschließenden Gelfiltration (vgl. 2.2.4.4-2.2.4.6). Alle gezeigten Fragmente konnten in einer Menge und Reinheit gewonnen werden, welche für nachfolgende biochemische Experimente, wie *pull down assays*, Bindungsstudien über Gelfiltration und isotherme Titrationskalorimetrie, geeignet sind. Die Molekulargewichte der Markerproteine (MW) sind angegeben.

3. Ergebnisse

So war es mithilfe dieses Satzes verschiedener Deletionsmutanten möglich, die Bindungsstellen für verschiedene H1-Subtypen einzugrenzen und dies auch in Abhängigkeit von Imp7 und RanGTP zu erfassen.

3.1.1.2 Deletionsmutanten von Imp7

Da von Imp7 noch keine Kristallstruktur vorlag, mußten bei der Konstruktion von Imp7-Deletionsmutanten die Schnittstellen nach einer Vorhersage der Sekundärstrukturelemente in Imp7 (Wohlwend, 2004) gewählt werden. Dabei wurde darauf geachtet, daß vorhergesagte Sekundärstrukturelemente erhalten blieben. Die Klonierung der Fragmente wurde entsprechend den unter 2.2.1-2.2.2 angegebenen Methoden durchgeführt.

Da jedoch die Konstruktion der Imp7-Fragmente nicht auf einer Kristallstruktur basierte, sondern lediglich auf einer Sekundärstrukturvorhersage, welche die tatsächlich vorhandenen Sekundärstrukturelemente nicht immer akkurat identifiziert, waren viele dieser Fragmente unlöslich oder fehlgefaltet und damit nicht zu reinigen. Daher sind in Abb. 13 nur diejenigen Deletionsmutanten aufgeführt, die entweder alleine oder als GST-Fusionsproteine in ausreichenden Mengen präpariert werden konnten. Eine Liste aller verfügbaren Fragmente von Imp7 befindet sich im Anhang in Abb. A1.

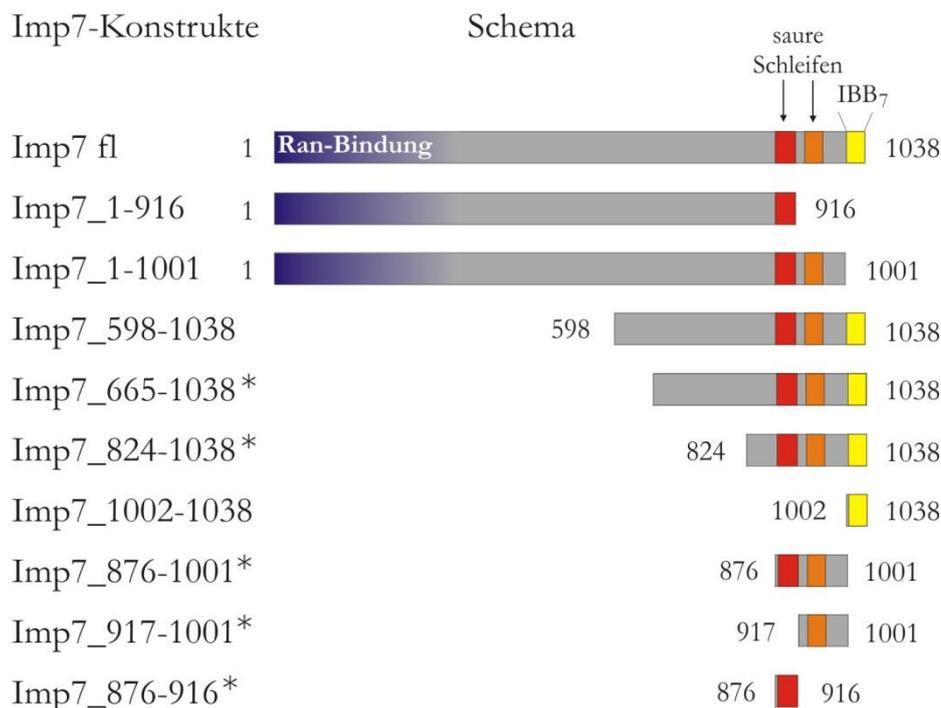


Abb. 13: Deletionskonstrukte von Imp7.

Liste aller präparierbaren Imp7-Fragmente. In Gelb ist die Imp β -Bindungsdomäne dargestellt (IBB₇), in Rot und Orange die beiden sauren Schleifen. Die Ran-Bindungsstelle (blau) befindet sich am N-Terminus von Imp7 (Görlich et al., 1997) und fehlt allen aufgeführten Konstrukten mit N-terminaler Deletion. Lediglich als GST-Fusionskonstrukte ließen sich Imp7_665-1038, Imp7_824-1038, Imp7_876-1001, Imp7_917-1001 und Imp7_876-916 präparieren, diese sind mit einem Sternchen markiert. Alle anderen konnten vollständig isoliert werden. Als Referenz ist Imp7 in voller Länge ebenfalls dargestellt (Imp7 fl).

3. Ergebnisse

In Abb. 14 sind die fertigen Präparate gezeigt. Besonders auffällig ist das hohe Ausmaß von Verunreinigungen der Konstrukte GST-Imp7₈₇₆₋₁₀₀₁ und GST₉₁₇₋₁₀₀₁. Vermutlich ist dies einer Fülle von Translationsabbrüchen geschuldet. Ein deutlicher Hinweis darauf ist die Tatsache, daß die Verunreinigungen gemeinsam mit dem Zielkonstrukt spezifisch mit Glutathion von einer GSH-Sepharose-Säule eluiert werden können. Da jedoch diese Zielkonstrukte später nur in qualitativen Bindungsexperimenten verwendet wurden, ist die dargestellte Reinheit ausreichend, zumal die Verunreinigungen höchstwahrscheinlich nur verkürzte Fragmente der entsprechenden Deletionskonstrukte sind.

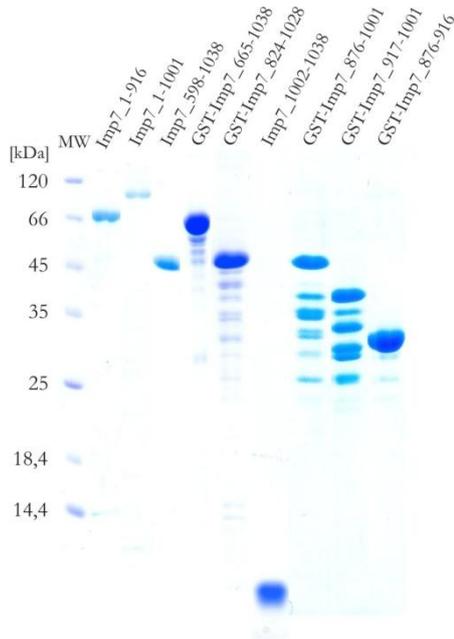


Abb. 14: Gereinigte Deletionsmutanten von Imp7.

Hier ist eine SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung gezeigt. Die Deletionsmutanten Imp7₁₋₉₁₆, Imp7₁₋₁₀₀₁, Imp7₅₉₈₋₁₀₃₈ und Imp7₁₀₀₂₋₁₀₃₈ konnten vollständig isoliert werden und eignen sich für biochemische Experimente wie *pull down assays*, Bindungsstudien über Gelfiltration und ITC. Die anderen dargestellten Präparate konnten lediglich als GST-Fusionsproteine gewonnen werden und können nur in *pull down assays* verwendet werden. Die Molekulargewichte der Markerproteine (MW) sind angegeben.

3.1.2 Nachweis der Funktionalität der verwendeten Deletionskonstrukte

3.1.2.1 Funktionalität der Imp β -Fragmente in Bezug auf die Imp7-Bindung

Für die weiterführende thermodynamische Analyse der Bildung und Dissoziation des ternären H1-Imp7-Komplexes aus Imp β , Imp7 und H1 war es notwendig, zunächst die volle Funktionalität der präparierten Fragmente von Imp β und Imp7 nachzuweisen. Zu diesem Zwecke wurden die schon früher publizierten Kartierungsexperimente mit Imp β und Imp7 (Bäuerle et al., 2002; Jäkel et al., 1999) reproduziert. In diesen Arbeiten konnte die minimale Imp7-Bindungsstelle von Imp β auf die Aminosäuren 203-364 eingegrenzt werden (Jäkel et al., 1999). Für eine Bindung, welche mit Imp β in voller Länge vergleichbar ist, sind die Aminosäuren 143-409 nötig. Die Imp β -Bindungsstelle von Imp7 (IBB₇) konnte ebenfalls lokalisiert werden (Bäuerle et al., 2002). Sie umfaßt nur einen sehr kleinen Bereich direkt am C-Terminus von Imp7 (AS 1008-1038).

Die Kontrolle der Imp β -Fragmente auf ihre Fähigkeit, Imp7 zu binden, war dabei besonders wichtig, da sich die Bindungsstelle von Imp β für Imp7 über einen relativ großen Bereich von mindestens 162 Aminosäuren erstreckt (HEAT-*repeats* 6-8) und damit für die Bindung an Imp7 die korrekte Faltung der entsprechenden Imp β -Fragmente voraussetzt. Als Nachweis der Bindung der verschiedenen Imp β -Fragmente an Imp7 wurden die Imp β -Fragmente mit Imp7 oder Imp7₁₀₀₂₋₁₀₃₈

3. Ergebnisse

vorinkubiert. Imp7_1002-1038 enthält dabei die vollständige IBB-Domäne von Imp7 (Bäuerle et al., 2002). Mögliche Komplexe wurden über eine analytische Gelfiltration isoliert (vgl. 2.2.3.12). Eine Komplexierung zweier Proteine kann dabei über eine Verschiebung des gemeinsamen Absorptionsmaximums in Richtung des Ausschlußvolumens verifiziert werden. Ein Beispiel eines solchen Experimentes ist in Abb. 15 dargestellt.

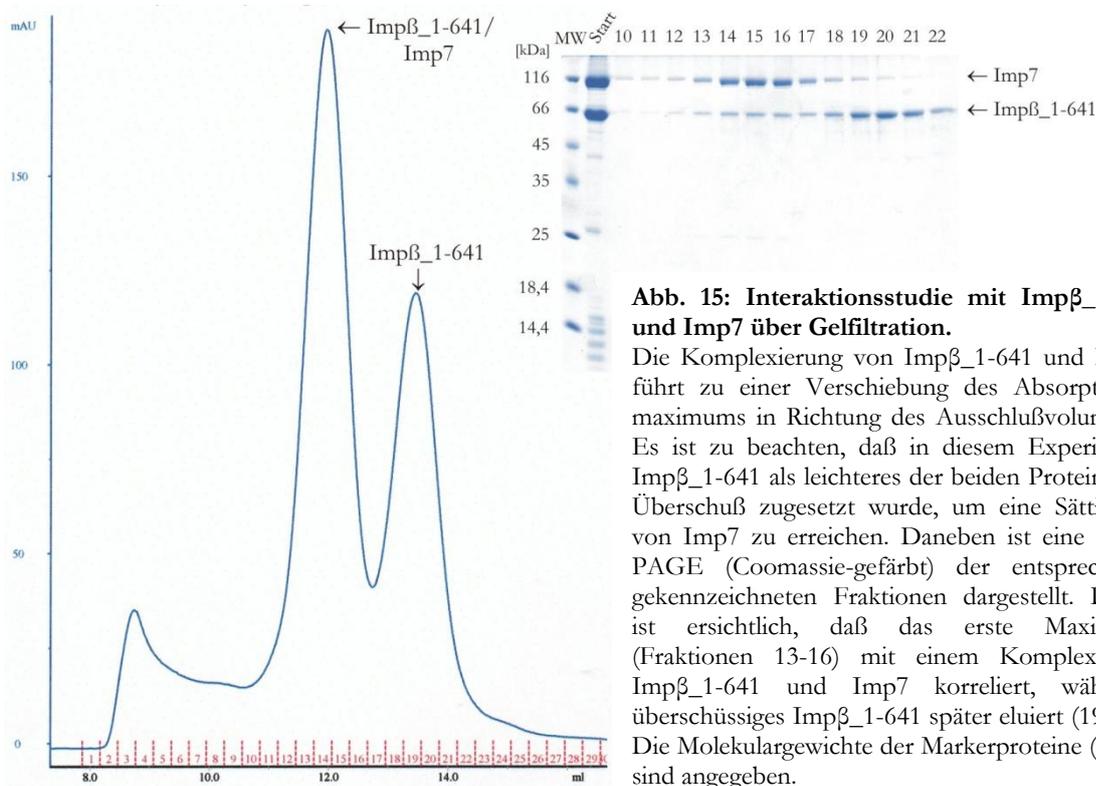


Abb. 15: Interaktionsstudie mit Imp β _1-641 und Imp7 über Gelfiltration.

Die Komplexierung von Imp β _1-641 und Imp7 führt zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums in Richtung des Ausschlußvolumens. Es ist zu beachten, daß in diesem Experiment Imp β _1-641 als leichteres der beiden Proteine im Überschuß zugesetzt wurde, um eine Sättigung von Imp7 zu erreichen. Daneben ist eine SDS-PAGE (Coomassie-gefärbt) der entsprechend gekennzeichneten Fraktionen dargestellt. Darin ist ersichtlich, daß das erste Maximum (Fraktionen 13-16) mit einem Komplex aus Imp β _1-641 und Imp7 korreliert, während überschüssiges Imp β _1-641 später eluiert (19-22). Die Molekulargewichte der Markerproteine (MW) sind angegeben.

Anschließend wurden Proben der entsprechenden Absorptionsmaxima per SDS-PAGE analysiert (Abb. 16). Dabei konnte die zuvor identifizierte Imp7-Bindungsstelle von Imp β bestätigt werden. N-terminale Deletionen von Imp β , die über AS 210 hinausgingen, banden nicht mehr an Imp7, wie durch das Fragment Imp β _304-876 demonstriert wird. Die verfügbaren C-terminalen Deletionen hingegen zeigten alle eine stabile Interaktion mit Imp7, einschließlich der kürzesten Mutante Imp β _1-396. Ein Unterschied in der Bindungsstärke im Vergleich mit dem Wildtyp von Imp β konnte bei diesen Experimenten nicht festgestellt werden. Die hier ermittelte minimale Imp7-Bindungsstelle erstreckt sich also von AS 210-396 und liegt damit in der N-terminalen Hälfte von Imp β .

Aus diesen Experimenten kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß alle verwendeten Imp β -Fragmente eine korrekte Faltung und volle Funktionalität aufweisen. Diese Aussage kann auch auf Imp β _304-876 ausgeweitet werden, da dieses Fragment eine stabile und spezifische Interaktion mit SPN1 eingehen kann (A. Strasser, unveröffentlichte Daten).

3. Ergebnisse

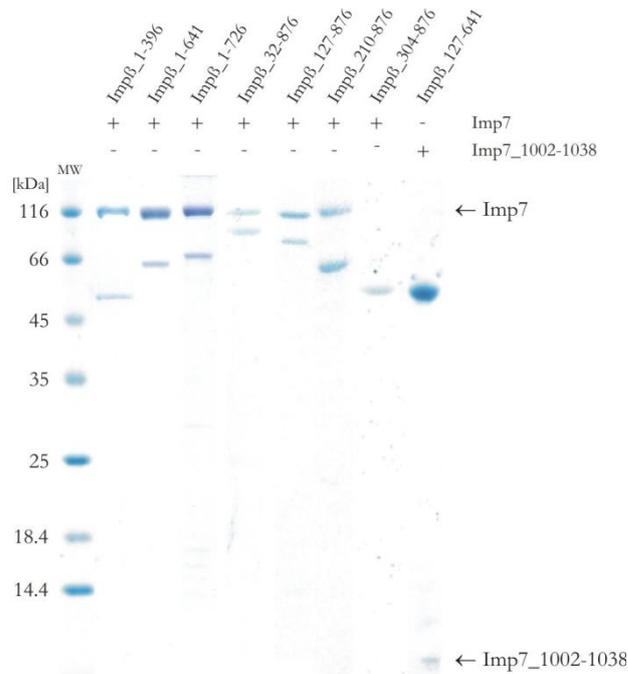


Abb. 16: Kartierung der Imp7-Bindungsstelle von Imp β .

SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. Dargestellt sind Proben der jeweiligen Absorptionsmaxima in analytischen Gelfiltrationsexperimenten zur Isolierung stabiler Komplexe. In diesen Experimenten wurden alle verfügbaren Imp β -Fragmente auf ihre Bindungsfähigkeit an Imp7 und Imp7_1002-1038 getestet. Dabei zeigt sich eine stabile Interaktion mit Imp7 beziehungsweise mit Imp7_1002-1038 für alle Imp β -Fragmente mit Ausnahme von Imp β _304-876. Dies bestätigt die Kartierung der Imp7-Bindungsstelle in einer früheren Studie (Jäkel et al., 1999). Die Molekulargewichte der Markerproteine (MW) sind angegeben.

3.1.2.2 Funktionalität der Imp7-Fragmente in Bezug auf die Imp β -Bindung

Im Gegensatz zu Imp β ist der Nachweis der Funktionalität von Imp7 über die Bindung an den jeweils anderen Importrezeptor, in diesem Falle also Imp β , deutlich weniger aussagekräftig, da die Imp β -Bindungsdomäne (IBB $_7$) nur einen sehr kleinen und wohl auch ungeordneten Teil des Gesamtproteins ausmacht (Wohlwend, 2004; Bäuerle et al., 2002). Dennoch war ein Nachweis der Imp β -Bindungsfähigkeit derjenigen Imp7-Fragmente, welche IBB $_7$ enthalten, für die spätere Analyse der H1-Bindung durch Imp β /Imp7 von großer Bedeutung.

Auch hier wurden Gelfiltrationsstudien durchgeführt, um eine stabile Komplexierung der Imp7-Deletionsmutanten mit Imp β nachzuweisen (vgl. 2.2.3.12). Eine Ausnahme bildeten die GST-Fusionsproteine (vgl. 3.1.1.2). Ihre Bindungsfähigkeit an Imp β wurde über *pull down assays* mit GSH-Sepharose verifiziert (vgl. 2.2.3.11). Eine SDS-PAGE der Absorptionsmaxima in analytischen Gelfiltrationsläufen beziehungsweise der Elutionsfraktionen in *pull down assays* ist in Abb. 17 dargestellt.

Die Interaktionsstudien mit den Imp7-Fragmenten bestätigen die Kartierung der IBB-Domäne (Bäuerle et al., 2002). Deletionsmutanten, denen diese Domäne (AS 1008-1038) fehlt, zeigen keinerlei Interaktion mit Imp β , während alle anderen Fragmente stabil an Imp β binden. Die gereinigten Imp7-Fragmente eigneten sich also für die darauf aufbauende Kartierung der H1-Bindungsstelle von Imp7 und, gemeinsam mit den Imp β -Fragmenten, für die Analyse der Bildung des ternären H1-Importkomplexes aus Imp β , Imp7 und H1.

3. Ergebnisse

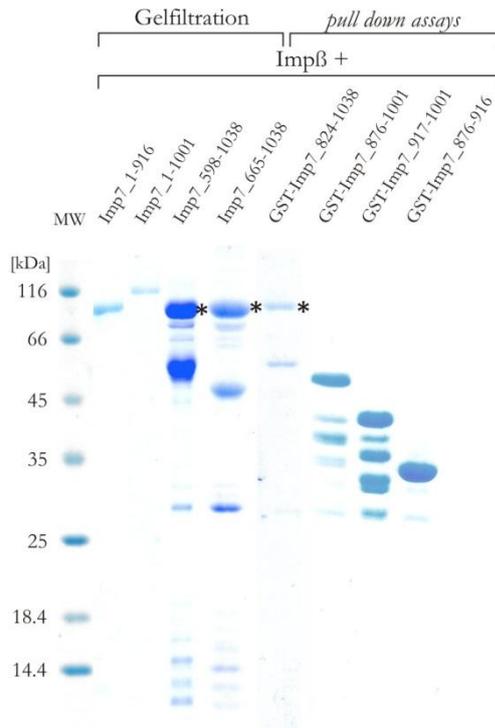


Abb. 17: Interaktionsstudien mit Imp β und Imp7-Fragmenten.

SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. Gezeigt sind Proben der jeweiligen Absorptionsmaxima in analytischen Gelfiltrationsexperimenten zur Isolierung stabiler Komplexe beziehungsweise die Elutionsfraktionen von *pull down assays* mit GSH-Sepharose. Imp7-Fragmente, welche die IBB-Domäne enthalten (AS 1008-1038), interagieren stabil mit Imp β . Mutanten ohne IBB-Domäne gehen keine Bindung mit Imp β ein. Anmerkung: Imp7_665-1038 konnte in diesem Falle nicht als GST-Fusionsprotein, sondern als frei isoliertes Protein verwendet werden, da es bereits vor dem Verdau durch PreScission-Protease (2.2.3.4) mit Imp β komplexiert worden war. Dadurch konnte es stabilisiert und anschließend verdaut werden.

Die Bindung von Imp7_1002-1038 an Imp β wird hier nicht gezeigt, da sie bereits in Abschnitt 3.1.2.1 (Abb. 16) nachgewiesen worden ist. Die Molekulargewichte der Markerproteine (MW) sind angegeben

3.1.3 Kartierung der gegenseitigen Bindungsstellen im ternären H1-Importkomplex

Nachdem die Funktionalität der generierten Deletionsmutanten von Imp β und Imp7 verifiziert werden konnte (vgl. 3.1.2.1 und 3.1.2.2), wurden diese Fragmente benutzt, um die H1-Bindungsstellen von beiden Importinen zu identifizieren. Wie bereits angeführt (3.1), war die minimale H1^o-Bindungsstelle von Imp β bereits bekannt (AS 203-618, Jäkel et al., 1999). Da H1^o, welches auch als *replacement histone* bezeichnet wird, jedoch nur einen Subtypus innerhalb der Familie der H1-Histone darstellt, war es von großem Interesse, zu zeigen, ob die identifizierte Bindungsstelle für alle H1-Histone gleichermaßen gilt. Dazu sollte die Kartierung der H1-Bindungsstellen auf die H1-Subtypen H1.2 (*B. taurus*) und H1.11L (*G. gallus*) erweitert werden.

Da die H1-Bindungsstellen von Imp7 unbekannt waren, sollten die Kartierungsexperimente auch die Imp7-Fragmente einbeziehen. Die experimentellen Befunde sollten schließlich die Basis für die thermodynamische Analyse der H1-Importkomplexbildung darstellen.

3.1.3.1 Identifizierung der H1-Bindungsstelle von Imp β

Für die Identifizierung der H1-Bindungsstelle von Imp β wurden zunächst *pull down assays* mit H1.2 und immobilisierten Imp β -Fragmenten durchgeführt (2.2.3.11). Eine Bindung von H1.2 konnte dabei über seine Wiedergewinnung bei der Elution der immobilisierten Imp β -Fragmente nachgewiesen

3. Ergebnisse

werden. Anschließend wurde in analytischen Gelfiltrationsexperimenten eine stabile Komplexbildung verifiziert (2.2.3.12).

In Abb. 18 ist eine SDS-PAGE derjenigen Fraktionen dargestellt, welche mit den Absorptionsmaxima in der analytischen Gelfiltration korrespondieren. Dabei zeigte sich, daß die minimale H1.2-Bindungsstelle von Imp β die HEAT-repeats 4-9 (AS 127-396) umfaßt. Allerdings muß diese Aussage eingeschränkt werden, da sich in der analytischen Gelfiltration von Imp β _1-396 und H1.2 die physiologisch irrelevante Bildung eines unspezifischen Oligomers zeigte (Daten nicht gezeigt). Dies wird später noch im Zusammenhang mit der thermodynamischen Analyse detailliert diskutiert werden. Die physiologisch relevante minimale Bindungsstelle für H1.2 umfaßt daher die HEAT-repeats 4-14 (AS 127-641). Weitere N-terminale Deletionen verhindern eine Bindung an H1.2, wie die Fragmente Imp β _210-876 und Imp β _304-876 belegen.

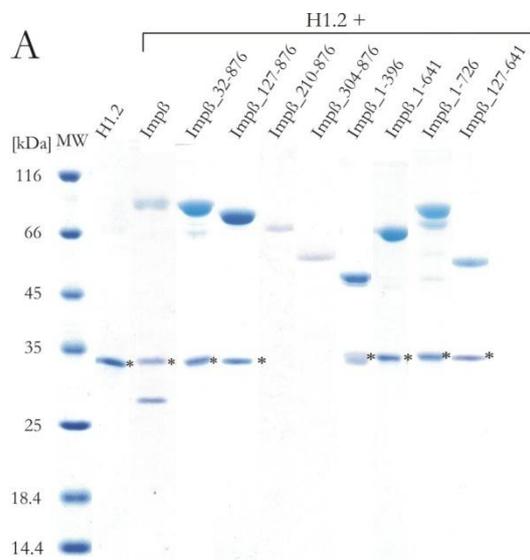


Abb. 18: Kartierung der H1.2-Bindungsstelle von Imp β .

(A) SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. Aufgetragen sind diejenigen Fraktionen, welche in analytischen Gelfiltrationsstudien mit den Absorptionsmaxima der jeweiligen Komplexe korrespondieren. Die H1.2-Bindungsstelle von Imp β besteht aus den HEAT-repeats 4-14 (AS 127-641). Einzig Imp β _210-876 und Imp β _304-876 binden nicht an H1.2. Die Molekulargewichte der Markerproteine (MW) sind angegeben. (B) Zusammenfassung der Kartierungsexperimente. Das Wildtyp-Niveau (Imp β fl) der Bindungen wird durch +++ gekennzeichnet, schwächere Interaktionen dementsprechend abgewertet. Die Farbcodierung der einzelnen Bindungsstellen ist wie in Abb. 11: RanGTP-Bindung = blau, Imp7-Bindung = gelb. Die Position der sauren Schleife zwischen HEAT 8A und 8B ist zusätzlich rot markiert.

Imp β -Konstrukte	Schema	Bindung an	
		Imp7	H1
Imp β fl	1 876	+++	+++
Imp β _1-396	1 396	+++	-
Imp β _1-641	1 641	+++	+++
Imp β _1-726	1 726	+++	+++
Imp β _32-876	32 876	+++	+++
Imp β _127-876	127 876	+++	+++
Imp β _210-876	210 876	++	-
Imp β _304-876	304 876	-	-
Imp β _127-641	127 641	+++	+++

3. Ergebnisse

Die Bindungsstelle von Imp β für H1.2 ist also weitestgehend identisch mit jener für H1⁰. Auch bei einer Wiederholung der Bindungsexperimente mit H1⁰ aus *H. sapiens* und H1.11L aus *G. gallus* konnte diese Bindungsstelle bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

Aus den Ergebnissen der angeführten Experimente folgt, daß die H1-Bindungsstelle von Imp β für alle getesteten H1-Subtypen identisch ist und damit der Mechanismus der Substraterkennung bei allen gleich ist, und dies obwohl die H1-Subtypen allesamt aus verschiedenen Organismen gewonnen worden waren.

Die Ursache hierfür liegt in der signifikanten Ähnlichkeit zwischen den verschiedenen H1-Subtypen, wie sie sich in einem Sequenzvergleich offenbarte (siehe Anhang, Abb. A2). Die Sequenzidentität von H1⁰ (*H. sapiens*) und H1.2 (*B. taurus*) liegt bei 43 %, die von H1⁰ und H1.11L (*G. gallus*) immer noch bei 41 %. Folglich erfordert eine hohe Ähnlichkeit in der Primärstruktur also ähnliche, wenn nicht sogar identische Eigenschaften der Substratbindungsstelle von Imp β . Dies sollte auch für Imp7 verifiziert werden, wie im Folgenden dargelegt wird.

3.1.3.2 Lokalisation der H1-Bindungsstelle von Imp7

Die H1-Bindungsstelle von Imp7 wurde in Analogie zur Kartierung der H1-Bindungsstelle von Imp β (3.1.3.1) untersucht. Auch hier wurden zunächst *pull down assays* angewandt, um eine Interaktion der Imp7-Fragmente mit H1.2, später auch mit H1⁰ und H1.11L, nachzuweisen. In Gelfiltrationsexperimenten wurde aufgrund des Migrationsverhaltens eine 2:1-Stöchiometrie festgestellt, das heißt, daß zwei Moleküle des entsprechenden Imp7-Fragmentes an ein Molekül H1 banden (Daten nicht gezeigt). Eine stabile und stöchiometrische Komplexbildung konnte über Gelfiltration allerdings nicht für alle Imp7-Fragmente verifiziert werden, welche in *pull-down*-Experimenten mit H1 interagierten, da die Mutanten Imp7_665-1038 und Imp7_824-1038 nur als GST-Fusionsproteine stabil waren. Da GST selbst zur Dimerisierung neigt und damit Komplexe aus GST-Fusionsproteinen und H1 sehr groß werden, kann das genaue Molekulargewicht solcher Komplexe in der analytischen Gelfiltration aufgrund der mangelnden Auflösung in diesem Bereich nicht bestimmt werden. Daher konnte eine 2:1-Stöchiometrie der H1-Bindung in diesen Fällen nicht zweifelsfrei verifiziert werden. Eine Zusammenfassung der Kartierungsexperimente findet sich in Abb. 19 wieder.

Es zeigte sich, daß die Bindung von Imp7 an H1.2 (*B. taurus*) hauptsächlich durch den C-Terminus (AS 824-1001) vermittelt wird. IBB₇ (AS 1008-1038) interagiert selbst nicht mit H1.2 und ist also entbehrlich. Wie vermutet (vgl. 1.5) sind die sauren Bereiche am C-Terminus, also die putativen Schleifen zwischen AS 882 und 912 sowie zwischen AS 927 und 957 für die Substraterkennung essentiell. Allerdings sind sie allein nicht ausreichend, wie das Fragment Imp7_876-1001 belegt. Für eine Interaktion, welche in ihrer Stärke mit Imp7 in voller Länge vergleichbar ist, sind zusätzlich Bereiche zwischen AS 665 und den sauren Schleifen nötig. Die H1.2-Bindungsstelle ist folglich im Bereich von AS 665-1001 lokalisiert. Eine Wiederholung der C-terminalen Kartierung von Imp7 mit H1⁰ (*H. sapiens*) H1.11L (*G. gallus*) erbrachte identische Ergebnisse (Daten nicht gezeigt).

3. Ergebnisse

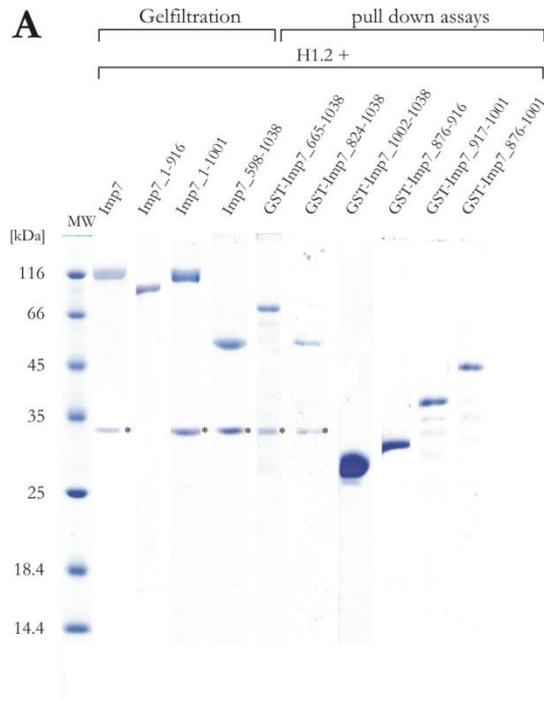


Abb. 19: Kartierung der H1.2-Bindungsstelle von Imp7.

SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung. Aufgetragen wurden entweder Fraktionen analytischer Gelfiltrationsexperimente, welche mit den Absorptionsmaxima möglicher Komplexe korrespondieren, oder die Elutionsfraktionen von *pull-down*-Experimenten. Die minimale H1.2-Bindungsdomäne von Imp7 umfaßt die AS 824-1001. Weitere N- oder C-terminale Deletionen lassen keine Interaktion mit H1.2 mehr zu. Für eine Bindung, welche mit dem Wildtyp von Imp7 vergleichbar ist, sind allerdings die AS 665-1001 essentiell. Die Molekulargewichte der Markerproteine (MW) sind angegeben

(B) Zusammenfassung der Kartierungsexperimente. Das Wildtyp-Niveau (Imp7 fl) einer Bindung wird als Referenz mit +++ angegeben, schwächere Bindungen werden dementsprechend abgewertet.

B

Imp7-Konstrukte	Schema	Bindung an	
		Impβ	H1
Imp7 fl	1 1038	+++	+++
Imp7_1-916	1 916	-	-
Imp7_1-1001	1 1001	-	+++
Imp7_598-1038	598 1038	+++	+++
Imp7_665-1038	665 1038	+++	+++
Imp7_824-1038	824 1038	+++	+
Imp7_1002-1038	1002 1038	+++	-
Imp7_876-1001	876 1001	-	-
Imp7_917-1001	917 1001	-	-
Imp7_876-916	876 916	-	-

3. Ergebnisse

3.1.3.3 Unterschiedliche Organisation der Bindungsstellen von Imp β und Imp7

Aus den in den Abschnitten 3.1.2 und 3.1.3 gezeigten Ergebnissen folgt, daß Imp β und Imp7 in Bezug auf die Lage der Bindungsstellen für H1 und für den jeweils anderen Transportrezeptor völlig unterschiedlich organisiert sind. Während die Interaktionsbereiche von Imp β für Imp7 (AS 210-396) und H1 (127-641) überlappen, also parallel organisiert sind, so sind die entsprechenden Bindungsstellen von Imp7 für H1 (AS 665-1001) und Imp β (1008-1038) strikt seriell aufgebaut und zeigen keinerlei Überlappung (Abb.20). Dabei ist auffällig, daß die RanGTP-Bindungsstelle von Imp β die vollständige H1-Bindungsstelle und diese ihrerseits die komplette Imp7-Bindungsstelle beinhaltet.

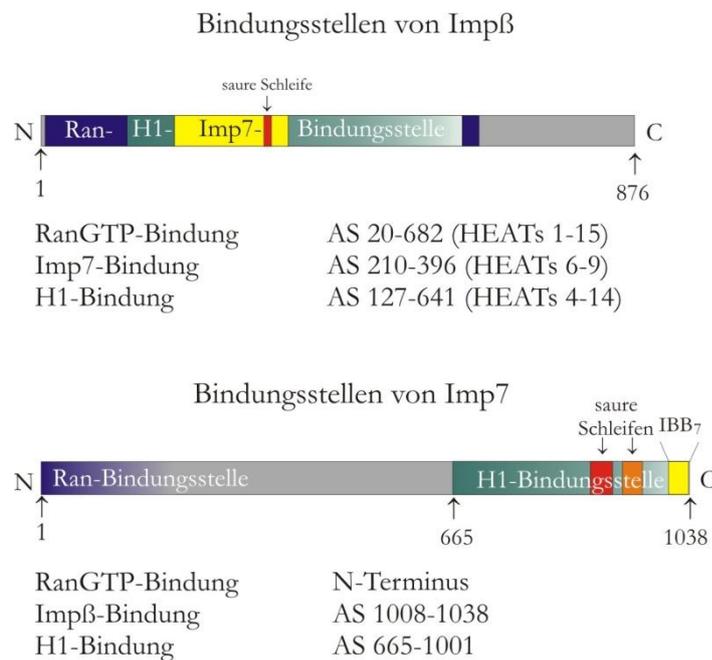


Abb. 20: Organisation der Bindungsstellen von Imp β und Imp7.

Die Bindungsstellen für Imp7, H1 und auch für RanGTP überlappen auf Imp β . Die Imp7-Bindungsstelle umfaßt den kleinsten Bereich. Dieser ist vollständig in der H1-Bindungsstelle enthalten, welche wiederum komplett in die RanGTP-Bindungsstelle inkorporiert ist. Dem entgegengesetzt überlappen keine der bekannten Bindungsstellen von Imp7, sondern sind seriell angeordnet. Die RanGTP-Bindungsstelle von Imp7 ist noch nicht zweifelsfrei identifiziert.

Aus der Erkenntnis, daß sowohl Imp β als auch Imp7 Proteine der Imp β -Superfamilie sind und daher aus seriell angeordneten HEAT-*repeats* aufgebaut sind, ergibt sich, daß die lineare Anordnung der Bindungsstellen von Imp7 mit einer seriellen, räumlichen Anordnung dieser Interaktionsflächen in der Tertiärstruktur einhergeht. Ganz im Gegensatz dazu könnten sich Imp7 und H1 den überlappenden Teil der Bindungsfläche von Imp β teilen. Da sich die relative Lage und die Organisation der Bindungsstellen auf Imp β und auf Imp7 also diametral unterscheiden, eröffnet sich die Frage, wie nun die einzelnen Interaktionsstellen zusammenwirken, um die postulierte Kooperativität des Imp β /Imp7-Heterodimers zu erzeugen (Jäkel et al., 1999). Eine solche könnte einerseits aus einer kooperativen Modulation von Imp β bestehen, und dies aufgrund der Okkupation einer gemeinsamen Bindungsfläche durch Imp7 und H1. Andererseits könnte auch eine allosterische Regulation von Imp7 durch Imp β ursächlich sein.

3.1.4 *in-vitro*-Kernimport von H1 durch Imp β /Imp7

Zur weiteren Untersuchung der möglichen Kooperativität von Imp β /Imp7 im H1-Kernimport wurde in *in-vitro*-Kernimportexperimenten (vgl. 2.2.6) zunächst die Funktionalität der Importrezeptoren überprüft. Als Importssubstrat dieser Kontrollexperimente wurde rpL23a verwendet, welches als Substrat für Einzelrezeptorwege bekannt ist (Jäkel & Görlich, 1998). Es kann sowohl durch Imp β als auch durch Imp7 in den Nucleus importiert werden.

Die Experimente zeigten, daß beide Importrezeptoren das Substrat effizient in den Nucleus transportieren können (Abb. 21, Ansätze 3 und 4).

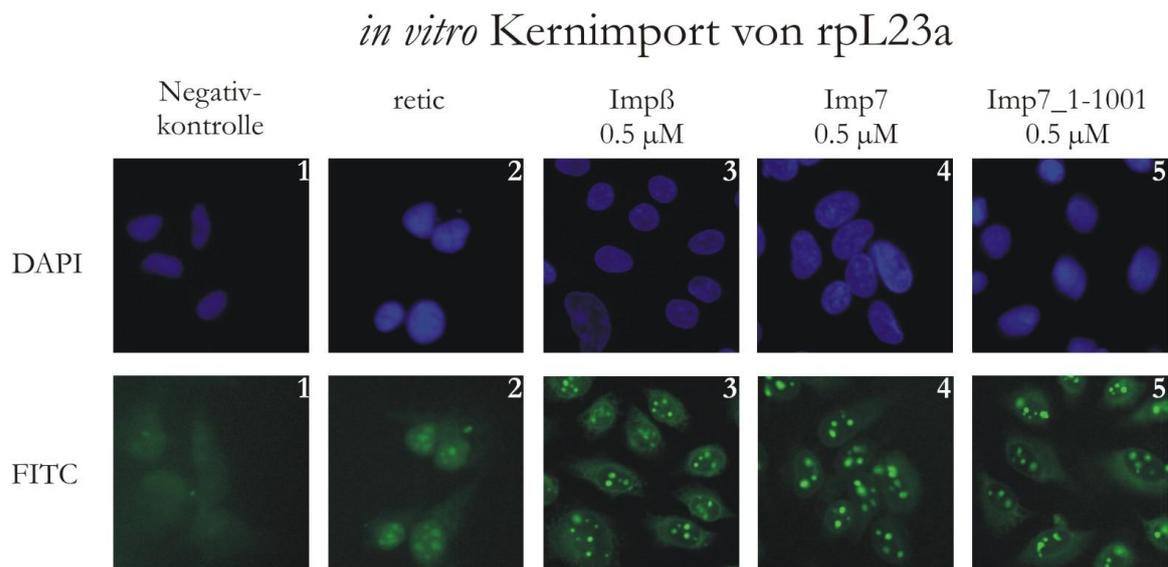


Abb. 21: *in vitro* Kernimport von rpL23a durch Imp β und Imp7.

In-vitro-Kernimportexperimente mit rekombinatem und fluoreszenzmarkierten rpL23a belegen die physiologische Funktionalität der gereinigten Import-rezeptoren Imp β und Imp7 (Ansätze 3 und 4). Die Lokalisation von rpL23a nach erfolgtem Kernimport in den Nucleoli ist aufgrund des Fluoreszenzsignals deutlich zu erkennen. Auch die Deletionsmutante Imp7_1-1001 ist im rpL23a-Import voll funktionsfähig, die IBB-Domäne übernimmt in diesem Einzelrezeptorweg keine essentielle Funktion und ist daher entbehrlich. Als Positivkontrolle diente zugesetztes Zellysate aus Reticulocyten (retic). Mit dem DAPI-Filter ist das Chromatin im Nucleus zu erkennen, mit dem FITC-Kanal die Lokalisation des Importsubstrats.

Weiterhin ist aus diesen Experimenten ersichtlich, daß Imp7 seine Imp β -Bindungsdomäne für den Import von rpL23a, einem klassischen Vertreter des Einzelrezeptorweges, nicht benötigt. Dies demonstriert der effiziente rpL23a-Import durch Imp7_1-1001, ein Fragment, welchem die IBB-Domäne (AS 1008-1038) fehlt. Die Funktion dieser Domäne ist also wohl auf den Co-Rezeptorimport mit Imp β beschränkt. Damit konnten gleich lautende Ergebnisse einer früheren Studie bestätigt werden (Bäuerle et al., 2002).

Die Entbehrlichkeit der IBB-Domäne von Imp7 im rpL23a-Import steht im Gegensatz zu ihrer Notwendigkeit für den effizienten Kernimport von H1 durch Imp β /Imp7 (Abb. 22). Während ein präinkubierter Imp β /Imp7-Komplex selbst in niedrigen Konzentrationen H1 schnell und effizient in den Nucleus transportiert (Abb. 22, Ansatz 5), kann der Kernimport von H1 mit Imp β und der

3. Ergebnisse

Deletionsmutante Imp7_1-1001 nicht rekonstituiert werden (Abb. 22, Ansatz 8) und dies, obwohl in den Bindungsstudien (3.1.3.2) demonstriert werden konnte, daß diese Mutante eine stabile Interaktion mit H1 eingeht. Die Dimerisierung von Imp β und Imp7 ist also für den H1-Import essentiell. Dieses Ergebnis bestätigt ebenfalls frühere Erkenntnisse (Bäuerle et al., 2002).

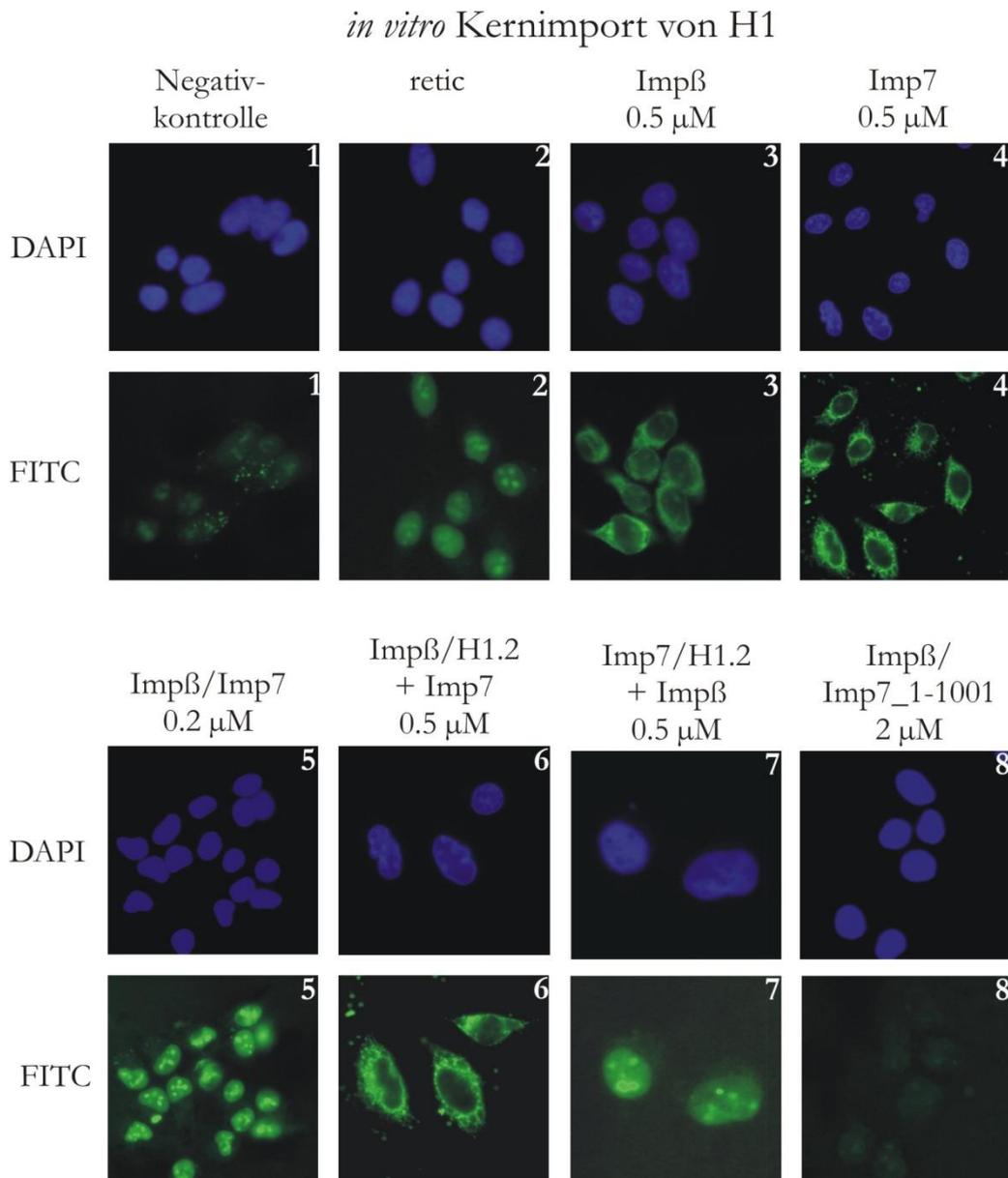


Abb. 22: *in vitro* Kernimport von H1 durch Imp β /Imp7.

In vitro Kernimportexperimente mit rekombinantem und fluoreszenzmarkiertem H1.2. Nur die gleichzeitige Präsenz von Imp β und Imp7 kann den H1-Import in den Nucleus vermitteln (Ansatz 5), die einzelnen Rezeptoren reichen nicht aus (Ansätze 3 und 4). Zusätzlich müssen beide Importine dimerisieren. Dies zeigt sich im Rekonstitutionsexperiment mit Imp β und Imp7_1-1001 (Ansatz 8), welchem die IBB-Domäne fehlt. Hier findet kein H1-Import statt. Weiterhin muß die Dimerisierung vor der Substratbindung erfolgen, da nur ein zuerst gebildetes Imp β /Imp7-Heterodimer H1 effizient in den Nucleus transportieren kann (Ansätze 5, 6 und 7). Wird hingegen einer der beiden Rezeptoren erst nach der Zugabe von H1 zugesetzt, so ist die Importrate vermindert (Imp β , Ansatz 7) oder sogar völlig reduziert (Imp7, Ansatz 6). Als Positivkontrolle diente Reticulocytenlysate (retic). Mit dem DAPI-Filter ist das Chromatin im Nucleus zu erkennen, mit dem FITC-Kanal die Lokalisation des Importsubstrats.

3. Ergebnisse

Ob aber die Dimerisierung von Imp β und Imp7 vor der H1-Bindung stattfinden muß, also in welcher Reihenfolge Imp β , Imp7 und H1 assemblieren, konnte bislang nicht dargelegt werden. Zur Klärung dieser Fragestellung wurde jeweils einer der beiden Importrezeptoren mit H1 präinkubiert und der andere dann 15 min später unmittelbar vor dem Transportexperiment zugesetzt. Dabei zeigte sich, daß die nachträgliche Zugabe von Imp7 zu einem Imp β /H1-Komplex den H1-Import nicht rekonstituieren kann (Abb. 22, Ansatz 6). Wird hingegen Imp β später zugesetzt, so findet der H1-Import statt (Abb. 22, Ansatz 7), wenn auch mit geringerer Effizienz als mit dem vorher gebildeten Imp β /Imp7-Heterodimer (Abb.22, Ansatz 5).

Daraus folgt, daß erstens die Heterodimerisierung von Imp β und Imp7 eine Voraussetzung für den H1-Import ist, und zweitens, daß für die höchste Importrate diese Heterodimerisierung vor der H1-Bindung stattfinden muß. IBB₇ nimmt dabei offensichtlich eine zentrale Rolle ein und könnte daher die postulierte Kooperativität von Imp β /Imp7 in der H1-Bindung vermitteln.

Zur Untersuchung der energetischen Effekte der Heterodimerisierung von Imp β und Imp7 und zur Charakterisierung des Bindungsmechanismus an H1 wurde in der Folge eine thermodynamische Analyse der H1-Importkomplexbildung vorgenommen, welche insbesondere die Untersuchung des kooperativen Effektes als Ziel haben sollte.

3.1.5 Thermodynamische Analyse der H1-Importkomplexbildung

3.1.5.1 Thermodynamische Charakterisierung der Bindung von Imp β an IBB $_7$

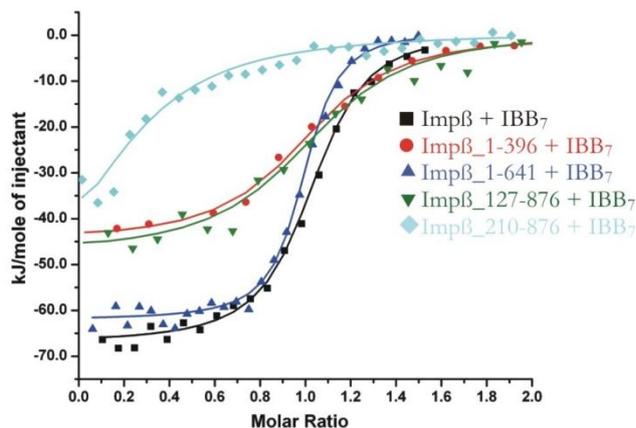
Um eine mögliche Kooperativität des Imp β /Imp7-Heterodimers in der H1-Bindung zu untersuchen, wurde die isotherme Titrationskalorimetrie (ITC) herangezogen (vgl. 2.2.7). Damit können die Bindungskonstanten der unterschiedlichen Komplexe quantifiziert und damit ihre Bindungseigenschaften charakterisiert werden.

Zunächst wurde die Heterodimerisierung von Imp β und Imp7 analysiert. Hierzu wurden die Bindungsparameter verschiedener Imp β -Fragmente und Imp7 $_{1002-1038}$ erfaßt. Imp7 $_{1002-1038}$ enthält, wie bereits angeführt (3.1.2.2, Bäuerle et al., 2002), die vollständige Imp β -Bindungsdomäne (IBB $_7$, AS 1008-1038) und wird daher im Folgenden aus Gründen der Annehmlichkeit vereinfachend als IBB $_7$ bezeichnet.

Wie die Bindungsisotherme von Imp β und IBB $_7$ zeigt (Abb. 23), ist die Bindungsaffinität relativ hoch mit einem K_D -Wert von 71 nM. Die Heterodimerisierung ist ein exothermer Prozeß mit einer Bindungsenthalpie ΔH von etwa -67 kJ/mol und einer Bindungsentropie ΔS von etwa -90 J/(K* μ mol) bei 25° C. Aus der Beziehung zwischen der Gibbs'schen freien Energie und den Enthalpie- und Entropieänderungen folgt, daß die Dimerisierung von Imp β und IBB $_7$ enthalpiegetrieben ist, obwohl eine deutliche Enthalpie-Entropie-Kompensation beobachtet werden kann, wie sie typisch ist für Protein-Protein-Interaktionen:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -66,9 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} + 298 \text{ K} \times 89,6 \frac{\text{J}}{\text{K} \times \text{mol}} = -40,2 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} .$$

Die Entropieerniedrigung wird also vollständig durch die freigesetzte Enthalpie kompensiert. Die spezifische Wärmekapazität des Imp β /IBB $_7$ -Komplexes ΔC_p beträgt 1,3 kJ/(K* μ mol), da die Bindungsisotherme von Imp β und IBB $_7$ bei 15 °C eine Enthalpieerniedrigung von -54 kJ/mol zeigt (Daten nicht gezeigt). Die Erniedrigung der Bindungsenthalpie mit sinkender Temperatur deutet auf die Beteiligung hydrophober Seitenketten an der Interaktion zwischen Imp β und IBB $_7$ hin.



	K_D [nM]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/(K* μ mol)]	N
Imp β + IBB $_7$	71 \pm 7	-66,9 \pm 0,6	-89,6	1,01 \pm 0,01
Imp β _1-396 + IBB $_7$	216 \pm 33	-44,9 \pm 1,0	-23,1	0,98 \pm 0,02
Imp β _1-641 + IBB $_7$	40 \pm 5	-62,3 \pm 0,6	-67,4	0,97 \pm 0,01
Imp β _127-876 + IBB $_7$	258 \pm 60	-48,0 \pm 1,7	-35,1	1,02 \pm 0,02
Imp β _210-876 + IBB $_7$	1862 \pm 641	-69,4 \pm 20,6	-123,1	0,27 \pm 0,07

Abb. 23: Thermodynamische Analyse der Bindung von Imp β an IBB $_7$ (ITC).

Dargestellt sind die Bindungsisothermen von Imp β beziehungsweise verschiedener Imp β -Fragmente mit IBB $_7$ bei 25 °C. Die Heterodimerisierung von Imp β und IBB $_7$ ist eine exotherme Reaktion. Sie involviert den kompletten N-Terminus von Imp β (AS 1-641, HEAT-repeats 1-14). Dies demonstriert ein Vergleich der Isothermen von Imp β + IBB $_7$ und Imp β _1-641 + IBB $_7$. Der C-Terminus (AS 642-876) hingegen ist entbehrlich. Eine reduzierte, aber immer noch hohe Affinität ist für N-terminale Deletionen bis AS 127 (Imp β _127-876) und C-terminale Deletionen bis AS 396 (Imp β _1-396) gegeben. Eine sehr geringe Affinität mit unphysiologischer Stöchiometrie (N = 0,27) zeigt Imp β _210-876.

3. Ergebnisse

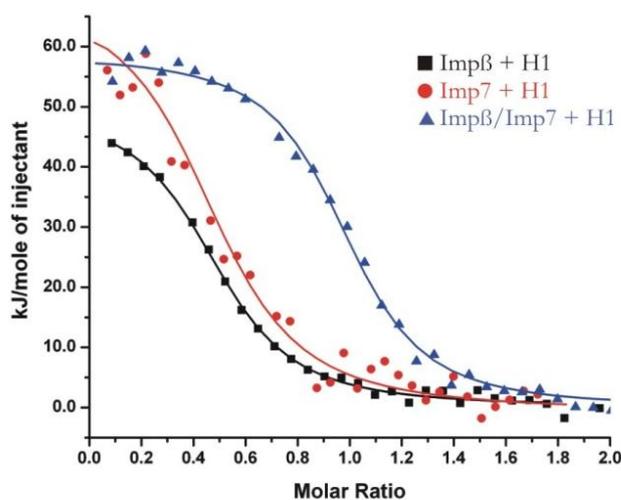
Der Vergleich der Bindungsisothermen der verschiedenen Imp β -Fragmente mit IBB $_7$ zeigt, daß eine Verminderung der Affinität mit fortschreitenden N- und C-terminalen Deletionen korreliert, wenn sie den Bereich von AS 1-641 beschneiden (Abb. 23). Überraschenderweise schließt dies auch die Deletionsmutanten Imp β ₁₂₇₋₈₇₆ und Imp β ₁₋₃₉₆ mit ein, obwohl diese in *pull-down*-Experimenten und analytischen Gelfiltrationen offenkundig so effizient an Imp7 banden wie Imp β in voller Länge. Im Falle von Imp β ₂₁₀₋₈₇₆ ist dies noch dramatischer, hier sinkt die Affinität von 71 nM (Imp β in voller Länge) auf 1,86 μ M (Imp β ₂₁₀₋₈₇₆). Werden hingegen die HEAT-repeats 15-19 deletiert (AS 642-876), wird die Affinität von Imp β zu IBB $_7$ nicht verringert, tatsächlich steigt sie sogar über das Wildtyp-Niveau hinaus, wie die Isotherme von Imp β ₁₋₆₄₁ und IBB $_7$ offenlegt ($K_D = 40$ nM).

Die Imp7-Bindungsstelle, wie sie in den qualitativen Experimenten wie *pull downs* und Gelfiltrationsstudien ermittelt wurde (vgl. 3.1.2.1 und Jäkel et al., 1999), erwies sich folglich als nur unzureichend bestimmt. Sie erstreckt sich also nicht nur von AS 143-409, sondern umfaßt vielmehr den vollständigen N-terminalen und ein Drittel des C-terminalen Bogens von Imp β (HEAT-repeats 1-14, AS 1-641). Dieses Ergebnis zeigt deutlich, daß eine Erfassung der Bindungsregionen zweier Proteine füreinander alleine mittels qualitativer Methoden nicht ausreichend ist.

3.1.5.2 Thermodynamische Analyse der Bindung von Imp β /Imp7 an H1.11L

Da bei der ITC-Analyse der Interaktion von Imp β und IBB $_7$ festgestellt wurde, daß die Bindung enthalpiegetrieben ist und mit einem signifikanten Entropieabfall einhergeht (3.1.5.1), wurde nachfolgend untersucht, wie die Charakteristika der Bildung des ternären H1-Importkomplexes aus Imp β , Imp7 und H1 beschaffen sind. Für diese Experimente wurde H1.11L (*G. gallus*) gewählt, weil es sich in den erforderlichen, großen Mengen leicht präparieren ließ (2.2.4.10).

Für die Charakterisierung der H1-Importkomplexbildung durch die ITC wurden sowohl die Bindungsisothermen der Subkomplexe Imp β /H1.11L und Imp7/H1.11L als auch des ternären Komplexes aus Imp β /Imp7 und H1.11L bei 10 °C bestimmt (Abb. 24).



	K_D [nM]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/(K*mol)]	N
Imp7 + H1	273 \pm 20	50,0 \pm 0,8	308,9	0,50 \pm 0,01
Imp β + H1	336 \pm 77	66,7 \pm 3,8	359,6	0,50 \pm 0,02
Imp β /Imp7 + H1	126 \pm 13	58,7 \pm 0,7	339,6	0,97 \pm 0,01

Abb. 24: Thermodynamische Analyse der Bindung von Imp β und Imp7 an H1.

Dargestellt sind die Isothermen der Bindung von Imp β , Imp7 und Imp β /Imp7 an H1 bei 10 °C. Die Bindung der Importine an H1 ist eine endotherme Reaktion, welche durch die enorme Entropiesteigerung ermöglicht wird. Imp β und Imp7 binden H1 jeweils mit vergleichbarer Affinität. Für Imp7/H1 liegt der K_D -Wert bei 273 nM, für Imp β /H1 bei 336 nM. Nach der Dimerisierung wird die Affinität von Imp β /Imp7 zu H1 deutlich stimuliert ($K_D = 126$ nM). Sie ist also mehr als doppelt so hoch, wie die der einzelnen Importine.

Es ist zu beachten, daß die einzelnen Importine jeweils eine 2:1 Stöchiometrie zu H1 aufweisen ($N = 0,5$), also je zwei an ein H1-Molekül binden, während eine 1:1-Stöchiometrie nur mit dem Imp β /Imp7-Heterodimer erreicht wird ($N \approx 1$).

3. Ergebnisse

Dabei fällt zunächst auf, daß die Bindung der Importine an H1 im Gegensatz zu Imp β /IBB₇ (vgl. 3.1.5.1) eine endotherme Reaktion ist, welche durch den massiven Entropieanstieg vorangetrieben wird:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = 58,7 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} - 283 \text{ K} \times 339,6 \frac{\text{J}}{\text{K} \times \text{mol}} = -37,4 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

Die Bindung von Imp β /Imp7 an H1 ist also entropiegetrieben. Ursächlich hierfür ist wahrscheinlich die Freisetzung großer Mengen an Salzionen von der H1-Oberfläche während der Bindung der Transportrezeptoren.

In der Titration von Imp β beziehungsweise Imp7 mit H1 erwiesen sich die Affinitäten beider Importine zu H1 als vergleichbar, mit K_D -Werten von etwa 340 nM (Imp β) und 270 nM (Imp7). Die Affinität des präinkubierten Imp β /Imp7-Heterodimers hingegen ist um den Faktor 2-3 höher mit einem K_D -Wert von 126 nM. Durch die Heterodimerisierung wird die Affinität also stimuliert. Weiterhin ist auffällig, daß bei der Titration von Imp β mit H1 zwei Imp β -Moleküle an ein H1-Molekül binden, die Stöchiometrie ist also 2:1 ($N = 0,5$). Die gleiche Beobachtung konnte bei der Titration von Imp7 mit H1 gemacht werden. Das zweite Importin-Molekül scheint also an diejenige Bindungsfläche von H1 zu binden, an welche *in vivo* sonst der jeweils andere Importrezeptor bindet. Diese Vermutung wird durch die 1:1-Stöchiometrie bei der Titration von Imp β /Imp7 mit H1 erhärtet. Da die Titrations der einzelnen Importine mit H1 jeweils eine 2:1-Stöchiometrie aufweisen, müssen folglich die Enthalpie- und Entropieänderungen halbiert werden, um den Beitrag eines einzelnen Importins näherungsweise zu erfassen. Die Summe der Beiträge jeweils eines Imp β - und eines Imp7-Moleküls sollte dann in etwa den Energieänderungen entsprechen, welche bei der Titration von Imp β /Imp7 mit H1 gemessen wurden. Dies wird durch die Beobachtung bestätigt, daß die Bindungsenthalpie des ternären Imp β /Imp7/H1-Komplexes genau so hoch wie das arithmetische Mittel der Bindungsenthalpien von (Imp β)₂/H1 und (Imp7)₂/H1:

$$\frac{(\Delta H_{\text{Imp}\beta+\text{H1}} + \Delta H_{\text{Imp7}+\text{H1}})}{2} = \frac{(66,7+50,0) \text{ kJ/mol}}{2} = 58,4 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} \approx \Delta H_{\text{Imp}\beta/\text{Imp7}+\text{H1}}$$

Die gleiche Beobachtung kann bei Betrachtung der Entropieänderungen gemacht werden:

$$\frac{(\Delta S_{\text{Imp}\beta+\text{H1}} + \Delta S_{\text{Imp7}+\text{H1}})}{2} = \frac{(359,6+308,9) \text{ J}}{2 \text{ K} \times \text{mol}} = 333,8 \frac{\text{J}}{\text{K} \times \text{mol}} \approx \Delta S_{\text{Imp}\beta/\text{Imp7}+\text{H1}}$$

Anhand der dargestellten Ergebnisse kann also die Schlußfolgerung gezogen werden, daß der Affinitätsanstieg des Heterodimers zu H1 nicht einfach durch das Erschließen zusätzlicher Bindungsstellen zu erklären ist. In diesem Falle würden sich nämlich die Enthalpie- und Entropieänderungen bei der Bildung des ternären Imp β /Imp7/H1-Komplexes signifikant von den arithmetischen Mitteln der Einzeltitrations, also Imp β mit H1 und Imp7 mit H1, unterscheiden. Die Ursache für die Stimulierung der Affinität muß demnach entweder in einer kooperativen Bindung durch Imp β /Imp7 oder in einem Konformationsschalter in einem oder in beiden Importinen liegen.

3.1.5.3 Allosterische Aktivierung von Imp7 über seine IBB-Domäne durch Imp β

Um die Frage nach der Ursache der stimulierten Affinität von Imp β /Imp7 zu H1 zu klären, wurden in der Folge Titrationsexperimente mit den verfügbaren Deletionsmutanten von Imp β und Imp7 und mit H1 durchgeführt. Auf diese Weise sollte bestimmt werden, welcher Mechanismus der Affinitätsstimulation von Imp β /Imp7 zugrunde liegt.

Zu diesem Zweck wurde zunächst der Effekt von IBB₇ auf die Substraterkennung durch Imp β /Imp7 untersucht. Dafür wurden die H1-Bindungskonstanten des Imp7-Fragmentes Imp7₁₋₁₀₀₁, welchem IBB₇ fehlt, sowohl allein als auch gemeinsam mit Imp β bestimmt (Abb. 25 A). Die H1-Bindungskonstanten von Imp7₁₋₁₀₀₁ unterscheiden sich erwartungsgemäß nicht signifikant vom Wildtyp-Protein, da eine stabile Interaktion zwischen Imp7₁₋₁₀₀₁ und H1 bereits nachgewiesen werden konnte (vgl. 3.1.3.2). Damit kann ein autinhibitorischer Effekt von IBB₇, wie er bei IBB _{α} beobachtet wurde (Harreman et al., 2003a und b), ausgeschlossen werden. Als diese Mutante mit Imp β präinkubiert und anschließend mit H1 titriert wurde, so konnte im Gegensatz zu Imp β /Imp7 (vgl. 3.1.5.2, Abb. 24) keine erhöhte Affinität festgestellt werden, in der Tat ist sie sogar etwas niedriger. Damit konnte die Notwendigkeit der Dimerisierung von Imp β und Imp7 für eine hochaffine Substraterkennung auch in der ITC nachgewiesen werden. Damit wird die Bedeutung von IBB₇ für die H1-Bindung zusätzlich unterstrichen.

Um zu klären, ob der Effekt von IBB₇ die Vermittlung eines kooperativen Bindungsmechanismus oder die Auslösung eines Konformationsschalters ist, wurde nun ein präinkubierter Komplex aus Imp β und IBB₇ einem Titrationsexperiment unterzogen. Überraschenderweise wird die Affinität von Imp β zu H1 durch die Bindung von IBB₇ an Imp β nicht stimuliert (Abb. 25 A), sondern sogar leicht erniedrigt ($K_D = 408$ nM). Darüber hinaus kann eine nicht-physiologische Komplexbildung aus drei Imp β /IBB₇-Komplexen und einem H1-Molekül beobachtet werden ($N = 0.33$). Damit kann Kooperativität als Affinitätsstimulans ausgeschlossen werden, da hierfür beide Importine eine Affinitätssteigerung erfahren müßten.

Da also eine Erhöhung der Affinität von Imp β zu H1 durch die Dimerisierung mit Imp7 nicht beobachtet werden konnte, wurde nun untersucht, welche Effekte die Dimerisierung auf Imp7 hat. Hierfür wurde das Imp β -Fragment Imp β ₁₋₃₉₆ als Bindungspartner von Imp7 gewählt, da diese Mutante einerseits eine ausreichend hohe Affinität zu Imp7 hat (vgl. 3.1.5.1, Abb. 23), andererseits aber in vorangegangenen Interaktionsstudien keine physiologisch relevante Bindung an H1 zeigte (vgl. 3.1.3.1, Abb. 18). Daher sollte diese Mutante das geeignete Konstrukt für das Studium des Imp β -abhängigen H1-Bindungsverhaltens von Imp7 sein. Als Referenz wurde zunächst die Bindungsisotherme von H1 und Imp β ₁₋₃₉₆ bestimmt (Abb. 25 B). Gemäß den Befunden aus den qualitativen Interaktionsstudien erwies sich Imp β ₁₋₃₉₆ als Bindungspartner von H1, wenngleich auch mit niedriger Affinität bei einem K_D -Wert von etwa 660 nM (Imp β in voller Länge: 336 nM, Abb. 24) und, wie erwartet, nicht-physiologischer Stöchiometrie von 4:1 ($N = 0,25$). Das heißt, daß einerseits vier Moleküle Imp β ₁₋₃₉₆ an ein Molekül H1 binden, was die Bildung eines Oligomers in den Gelfiltrationsstudien (vgl. 3.1.3.1) bestätigt. Folglich müssen auch die Enthalpie- und Entropiewerte durch vier geteilt werden, um näherungsweise den Beitrag eines einzelnen Moleküls Imp β ₁₋₃₉₆ zu ermitteln. Die Enthalpieänderung ΔH liegt demnach nur bei etwa -20 kJ/mol. Dies deutet auf einen großen Verlust von Interaktionsflächen für H1 hin (Imp β in voller Länge: -33,4 kJ/mol pro einzelnes Molekül). Andererseits könnte gerade die Stöchiometrie eine Separation von der H1-Bindung durch Imp7 ermöglichen, wenn diese sich von Imp β ₁₋₃₉₆ unterscheidet.

3. Ergebnisse

Dies konnte bei der Titration eines Imp β _1-396/Imp7-Komplexes mit H1 bestätigt werden. Bei diesem Experiment kommt es zu zwei Bindungsereignissen, welche getrennt analysiert wurden (Abb. 25 B). Das Erste repräsentiert die Bindung von Imp β _1-396 an H1, wiederum mit der schon zuvor ermittelten Stöchiometrie von 4:1 ($N = 0,25$). Das zweite Bindungsereignis stellt folglich die Bindung von Imp7 an H1 dar. Die Stöchiometrie dieser Bindung ist 1:1 ($N = 1$), folglich konnte also das H1-Bindungsverhalten von Imp7 im Imp β /Imp7-Heterodimer simuliert werden.

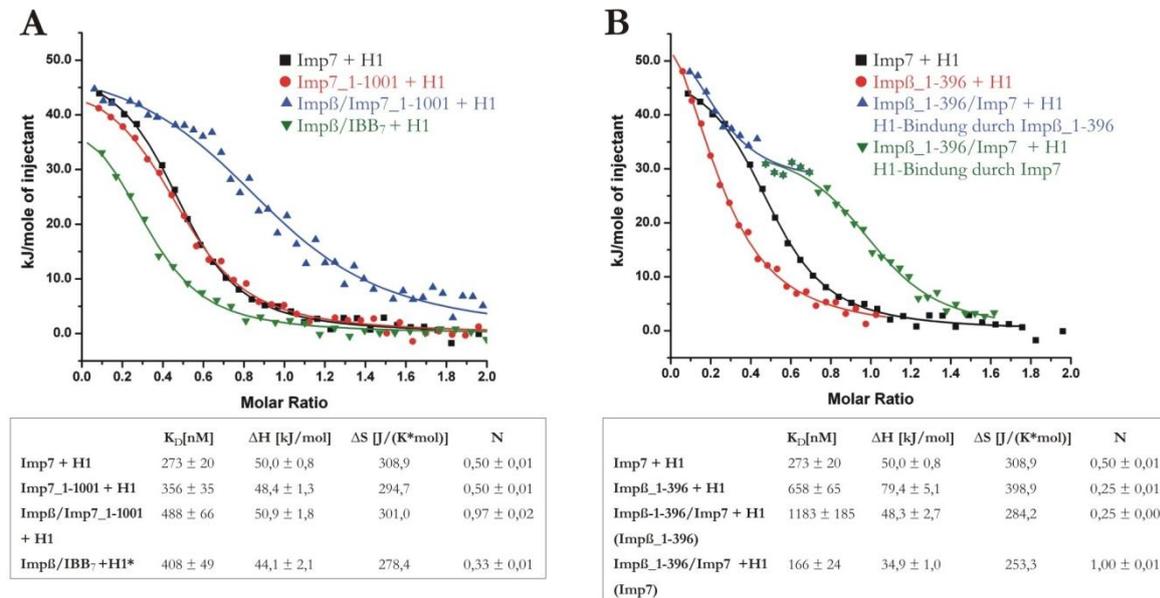


Abb. 25: Thermodynamische Analyse der Steigerung der Affinität von Imp β /Imp7 zu H1.

(A) Die Titration von Imp7_1-1001 mit H1 resultiert in einer Isotherme, welche mit Imp7 in voller Länge vergleichbar ist. Eine Präinkubation dieses Fragments mit Imp β und anschließender Titration zeigt keinen Affinitätsanstieg beider Proteine zu H1 ($K_D = 488$ nM). IBB₇ ist hierfür also essentiell. Ein stimulierender Effekt von IBB₇ auf Imp β kann allerdings nicht festgestellt werden, die Affinität wird nicht erhöht ($K_D = 408$ nM). Dagegen bildet sich hier ein nicht-physiologischer Komplex mit ungewöhnlicher 3:1-Stöchiometrie (markiert durch ein Sternchen). (B) Die Affinität von Imp7 zu H1 wird durch die Bindung an Imp β erhöht. Imp β _1-396, welches selbst nur schwach mit H1 in einer 4:1-Stöchiometrie ($N = 0,25$) interagiert, stimuliert deutlich die Affinität von Imp7, wenn es mit Imp7 vor der Titration mit H1 inkubiert wird. Dabei treten zwei separate Bindungsereignisse auf: Das erste Bindungsereignis (blaue Ausgleichskurve) stellt die Bindung von Imp β _1-396 an H1 dar ($N = 0,25$), das zweite (grüne Ausgleichskurve) die Bindung von Imp7 an H1 ($N = 1$). Die Stöchiometrie der Imp7/H1-Bindung zeigt, daß Imp7 im Komplex mit Imp β _1-396 die gleiche Rolle übernimmt wie im Imp β /Imp7-Heterodimer (N ist hier ebenfalls 1, Abb. 24).

Bemerkenswerterweise wird die Affinität von Imp7 zu H1 durch die vorangegangene Bindung an Imp β _1-396 signifikant erhöht. Der K_D -Wert liegt nun bei 166 nM (Abb. 25 B), im Vergleich zu Imp7/H1 ohne Imp β ($K_D = 273$ nM, Abb. 24) eine deutliche Steigerung. Die erniedrigte Bindungsentropie deutet darauf hin, daß naturgemäß weniger Salzionen durch Imp7 alleine als durch Imp β /Imp7 von der H1-Oberfläche freigesetzt werden. Die Bindungsenthalpie von etwa -35 kJ/mol ist geringfügig höher als erwartet. Aufgrund der ermittelten Bindungsenthalpien von (Imp7)₂/H1 (50 kJ/mol), (Imp β)₂/H1 (66,7 kJ/mol) und Imp β /Imp7/H1 (~59 kJ/mol, Abb. 24), war eine etwas niedrigere Bindungsenthalpie von etwa 25-30 kJ/mol vermutet worden. Wahrscheinlich ist dies die Folge geringer Beiträge von Imp β _1-396 zur Bindungsenthalpie.

Die Schlußfolgerungen bezüglich der Bindungsenthalpie und -entropie sind in diesem Falle zwingend, da das Imp β -Fragment Imp β _1-396 bereits zuvor gesättigt worden war ($N = 0,25$) und

3. Ergebnisse

damit seine Energiebeiträge als gering eingeschätzt werden können. Dies ist insbesondere der Fall, wenn Imp β _1-396 im Moment der Imp7-Bindung an H1 neue Interaktionen mit H1 ausbildet, da dann die Dissoziationsenergien der ersten Bindung ebenfalls in Betracht gezogen werden müssen.

Aus den angeführten Experimenten folgt, daß die Stimulation der Affinität von Imp β /Imp7 zu H1 auf der Aktivierung von Imp7 nach der Imp β -Bindung beruht, daß diese Aktivierung durch IBB₇ vermittelt wird und schließlich, daß die Aktivierung von Imp7 allosterischer Natur ist.

3.1.6 Thermodynamische Implikationen auf die Dissoziation des H1-Importkomplexes durch RanGTP

Nachdem nun im Detail auf die Bildung des H1-Importkomplexes eingegangen worden ist, soll im Folgenden die Dissoziation dieses Komplexes näher betrachtet werden. Wie bereits ausgeführt (1.2), wurde postuliert, daß der ternäre H1-Importkomplex nach der Translokation durch den NPC am nuclear basket gebunden bleibt und von diesem durch die Bindung von RanGTP an Imp β dissoziiert. Als Dissoziationsprodukte wurden Imp β /RanGTP und Imp7/H1 vermutet (Bäuerle et al., 2002; Jäkel et al., 1999).

Zur Aufklärung des Dissoziationsprozesses sollten zunächst über Gelfiltrationsanalysen (2.2.3.12) die Dissoziationsprodukte eines vorinkubierten H1-Importkomplexes aus Imp β , Imp7 und H1 nach der Zugabe von RanGTP identifiziert werden. In diesen Experimenten wurde Imp7 mit N-terminaler (His)₁₀-Sequenz verwendet, welches nicht an RanGTP bindet (Abb.26 A). Außerdem wurde ein nicht hydrolysierbares Analogon von RanGTP, RanGDPNP, benutzt, um eine dauerhafte Bindung von Ran an Imp β zu erlauben. Als Überraschung erwies sich in diesen Experimenten die Beobachtung, daß RanGDPNP das Imp β /Imp7-Heterodimer nicht dissoziiert, sondern lediglich H1 freisetzt (Abb. 26 B). Die Dissoziationsprodukte nach RanGDPNP-Zugabe in diesen Experimenten waren also RanGDPNP/Imp β /Imp7 und H1.

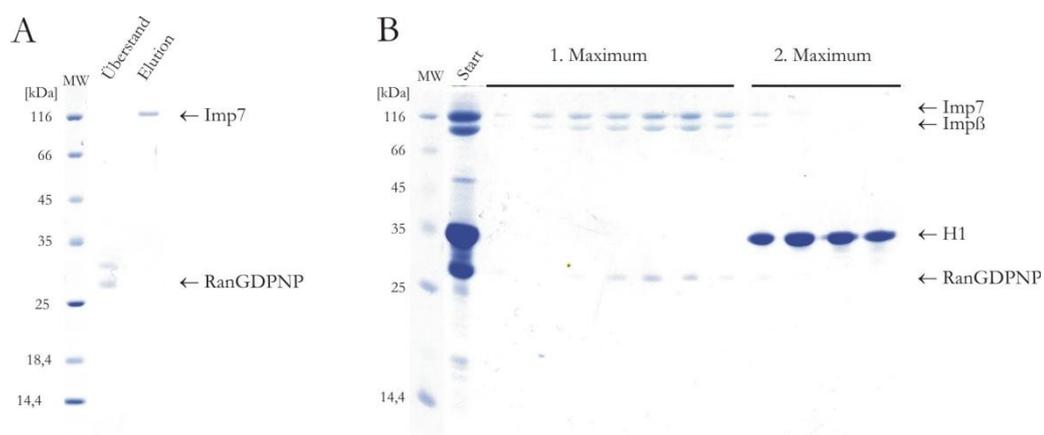


Abb. 26: Qualitative Analyse der Dissoziation des H1-Importkomplexes durch RanGDPNP.

(A) In *pull-down*-Experimenten mit Ni-NTA-Sepharose bindet RanGDPNP nicht an (His)₁₀-Imp7. Gezeigt ist der durch Zentrifugation geklärte Überstand nach Zugabe von RanGDPNP zu immobilisiertem Imp7 (Überstand) sowie die Elutionsfraktion. (B) SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung der Fraktionen einer analytischen Gelfiltration. Dabei wurde das präparierte Imp β /Imp7-Heterodimer zunächst mit einem 4:1 Überschuß H1 und anschließend mit einem 4:1-Überschuß RanGDPNP inkubiert. Das erste Absorptionsmaximum wird durch einen RanGDPNP/Imp β /Imp7-Komplex verursacht, das zweite durch freigesetztes H1. Die Molekulargewichte der Markerproteine (MW) sind angegeben.

3. Ergebnisse

Eine weitere Gelfiltrationsstudie konnte die Bildung eines RanGDPNP/Imp β /Imp7-Trimers deutlich belegen (Abb. 27). Offensichtlich ist also eine gleichzeitige Bindung von Imp7 und RanGTP an Imp β nicht nur möglich, sondern auch in den eingesetzten Konzentrationen von 6 μ M (RanGDPNP/Imp β) und 4 μ M (Imp7) stabil.

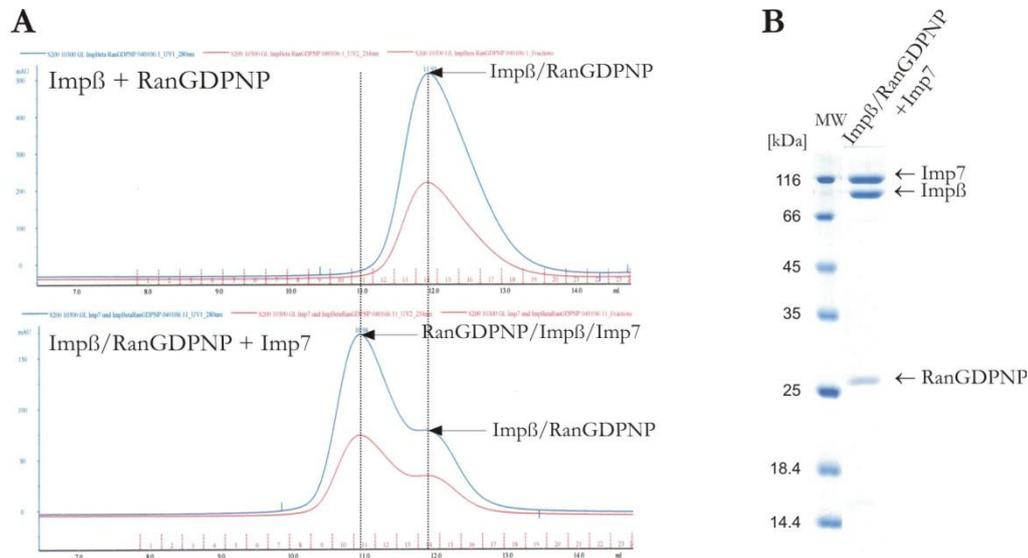
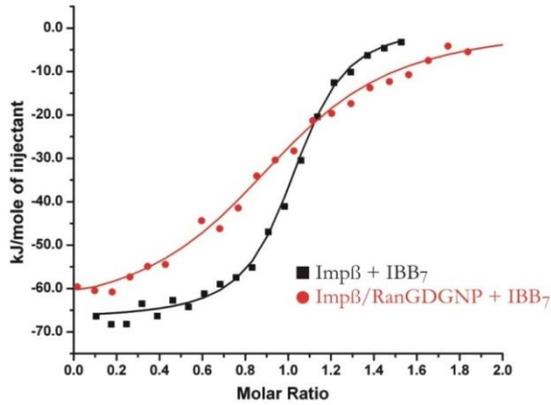


Abb. 27: Präparation des RanGDPNP/Imp β /Imp7-Komplexes über analytische Gelfiltration.

(A) Imp β (12 nmol) wurde mit RanGDPNP (16 nmol) bei 20 °C für 15 min inkubiert und anschließend über eine analytische Gelfiltration präpariert (oberes Chromatogramm). Anschließend wurden 3 nmol des präparierten RanGDPNP/Imp β -Komplexes mit 2 nmol Imp7 bei 20 °C für 15 min inkubiert und über die analytische Gelfiltration aufgetrennt (unteres Chromatogramm). Die Bildung eines ternären Komplexes wird im unteren Chromatogramm aufgrund der Verschiebung des Migrationsverhaltens deutlich (blau: Absorption bei $\lambda = 280$ nm, rot: Absorption bei $\lambda = 254$ nm). (B) Die SDS-PAGE der Fraktion des Absorptionsmaximums mit anschließender Coomassie-Färbung bestätigt die Bildung eines ternären RanGDPNP/Imp β /Imp7-Komplexes. Die Molekulargewichte der Markerproteine (MW) sind angegeben.

Infolgedessen wurde über ITC untersucht, ob, und wenn ja, in welchem Konzentrationsbereich RanGTP überhaupt in der Lage ist, das Imp β /Imp7-Heterodimer zu dissoziieren. Dabei wurden die Bindungskonstanten von Imp β und IBB $_7$ in An- und in Abwesenheit von RanGDPNP gemessen (Abb. 28). In diesen Experimenten ergab sich, daß ein vorher gebildeter Imp β /RanGDPNP-Komplex in einem Konzentrationsbereich mit Imp7 interagiert ($K_D = 505$ nM), welcher noch deutlich unterhalb der zellulären Imp7-Konzentration liegt ($c_{\text{Imp7}} = 3$ μ M, Jäkel & Görlich, 1998). Allerdings ist die Affinität von Imp β zu Imp7 nach RanGTP-Bindung um den Faktor 7 deutlich reduziert. Die Bindungsenthalpien von Imp β /IBB $_7$ und RanGDPNP/Imp β /IBB $_7$ sind nahezu identisch. Dies deutet darauf hin, daß die Bindungsoberfläche für IBB $_7$ durch die RanGTP-Bindung an Imp β nicht eingeschränkt ist. Die Bindungsentropie dagegen fällt signifikant von $\Delta S = -89,6$ für Imp β /IBB $_7$ auf $\Delta S = -177,1$ J/(K \cdot mol) für RanGDPNP/Imp β /IBB $_7$. Daraus folgt, daß die Bildung des ternären Komplexes aus RanGTP, Imp β und IBB $_7$ energetisch deutlich ungünstiger ist ($\Delta G = -14,2$ kJ/mol) als die Dimerisierung von Imp β und IBB $_7$ in Abwesenheit von RanGTP ($\Delta G = -40,2$ kJ/mol). Eine fundierte Erklärung für dieses Phänomen muß jedoch vorerst ausbleiben.

3. Ergebnisse



	K_D [nM]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/(K*mol)]	N
Imp β + IBB $_7$	71 \pm 7	-66,9 \pm 0,6	-89,6	1,01 \pm 0,01
Imp β /RanGDPNP + IBB $_7$	505 \pm 61	-67,0 \pm 1,5	-177,1	0,87 \pm 0,02

Abb. 28: Thermodynamische Analyse der Dissoziation von Imp β /Imp7 durch RanGDPNP.

Imp β /RanGDPNP bindet immer noch mit einer physiologisch relevanten Affinität an Imp7, wenngleich auch die Affinität zur IBB-Domäne von Imp7 (IBB $_7$) nach der Bindung von Imp β an RanGDPNP um den Faktor 7 reduziert ist, der K_D -Wert steigt von 71 nM auf über 500 nM. Während dabei die Enthalpieänderungen identisch sind (-66,9 und -67,0 kJ/mol), unterscheiden sich die Änderungen in der Bindungsentropie deutlich mit -89,6 kJ/mol für Imp β /IBB $_7$ und -177,1 kJ/mol für RanGDPNP/Imp β /IBB $_7$.

3.1.7 Die Funktion von RanGTP im *in-vitro*-Kernimport von H1

Nachdem gezeigt werden konnte, daß RanGTP einen Imp β /Imp7-Komplex nur dann dissoziieren kann, wenn Imp7 in einem Konzentrationsbereich von (zwischen etwa 70 und 500 nM, vgl. 3.1.6) vorliegt, welcher unterhalb der zellulären Imp7-Konzentration von 3 μ M liegt, sollte durch *in-vitro*-Kernimportexperimente untersucht werden, ob die Dissoziation des Imp β /Imp7-Heterodimers durch RanGTP für den H1-Kernimport essentiell ist. In früheren Studien wurde demonstriert, daß die Bildung eines Imp β /Imp7-Heterodimers für den H1-Kernimport absolut notwendig ist (Bäuerle et al., 2002; Jäkel et al., 1999). Ob ein solches Dimer aber im Prozeß des H1-Imports auch tatsächlich nach der Translokation durch den NPC dissoziiert oder aber als Heterodimer persistiert, konnte bislang nicht gezeigt werden.

Diese Fragestellung wurde mit *in-vitro*-Kernimportexperimenten angegangen. Dabei wurden Imp β - und Imp7-Fragmente benutzt, welche zwar die Bindung an den jeweils anderen Transportrezeptor und an das Substrat H1 erlauben, nicht aber an RanGTP. Dabei wurden sie in den Transportexperimenten mit dem jeweiligen komplementären Importrezeptor so kombiniert, daß immer nur einem Rezeptor die Ran-Bindungsstelle fehlte. Die verwendete Deletionsmutante von Imp β war Imp β ₁₂₇₋₆₄₁, welches nur eine unvollständige Ran-Bindungsstelle (Lee et al., 2005; Vetter et al., 1999), dafür aber alle anderen für den H1-Import nötigen Teile aufweist, also die Bindungsstellen für Imp7 (3.1.2.1), H1 (3.1.3.1) und die Nucleoporine des NPC (Liu & Stewart, 2005). Als Imp7-Vertreter, welcher eine Bindungsdefizienz für Ran aufweist, während er mit allen anderen Komponenten interagieren kann, wurde Imp7₅₉₈₋₁₀₃₈ gewählt (Abb. 29).

Die *in-vitro*-Kernimportexperimente zeigten, daß auch in hohen Rezeptorkonzentrationen der H1-Import durch Imp7 und Imp β ₁₂₇₋₆₄₁ nicht rekonstituiert werden kann (Abb. 29, Ansätze 1 und 2). Da bekannt ist, daß Nup153 der letzte Bindungspartner von Imp β vor seiner Freisetzung in das Karyoplasma ist (Ball & Ullman, 2005; Fahrenkrog et al., 2002), und diese Freisetzung RanGTP-abhängig ist, könnte dies an einer Blockierung der Kernpore nach dem ersten Importzyklus liegen.

3. Ergebnisse

Bevor der H1-Import durch Imp β /Imp7_598-1038 besprochen wird, soll dieses Phänomen näher untersucht werden.

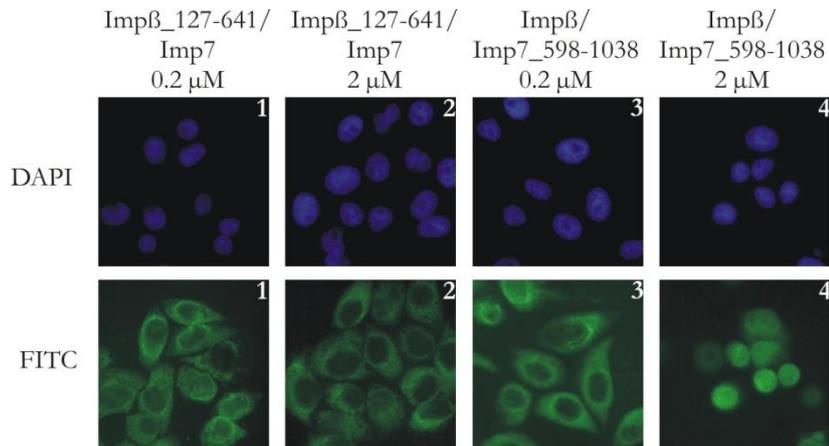


Abb. 29: in-vitro-Kernimport von H1 in Abhängigkeit von RanGTP.

Während der H1-Kernimport durch Imp β _127-641/Imp7 nicht rekonstituiert werden kann (Ansätze 1 und 2), kann ein effizienter H1-Kernimport mit steigenden Konzentrationen von Imp β /Imp7_598-1038 erreicht werden. Als Positivkontrolle diente Reticulocystenlysat (retic). Die Rezeptorkonzentrationen sind wie angegeben. Mit dem DAPI-Filter ist das Chromatin im Nucleus zu erkennen, mit dem FITC-Kanal die Lokalisation des Importsubstrats.

Um die Blockierung der NPCs durch Imp β _127-641 zu verifizieren, wurde die konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie herangezogen, um Äquatorialaufnahmen der Nuclei machen zu können. Dabei offenbarte sich eine auffällige Färbung der Kernhülle (Abb. 30). Obgleich eine präzise Lokalisation des Fluoreszenzsignals nicht möglich ist, deutet die ringförmige Färbung der Kernhülle auf eine Blockierung der NPCs hin. Folglich ist die Bindung von RanGTP an Imp β und die damit einhergehende Dissoziation des Nup153/Imp β /Imp7/H1-Komplexes unverzichtbar für die Termination des H1-Kernimports.

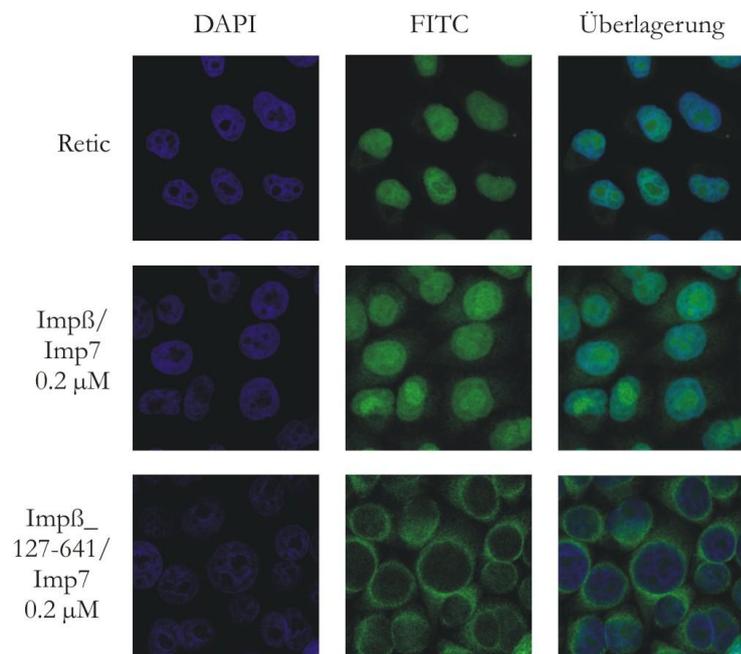


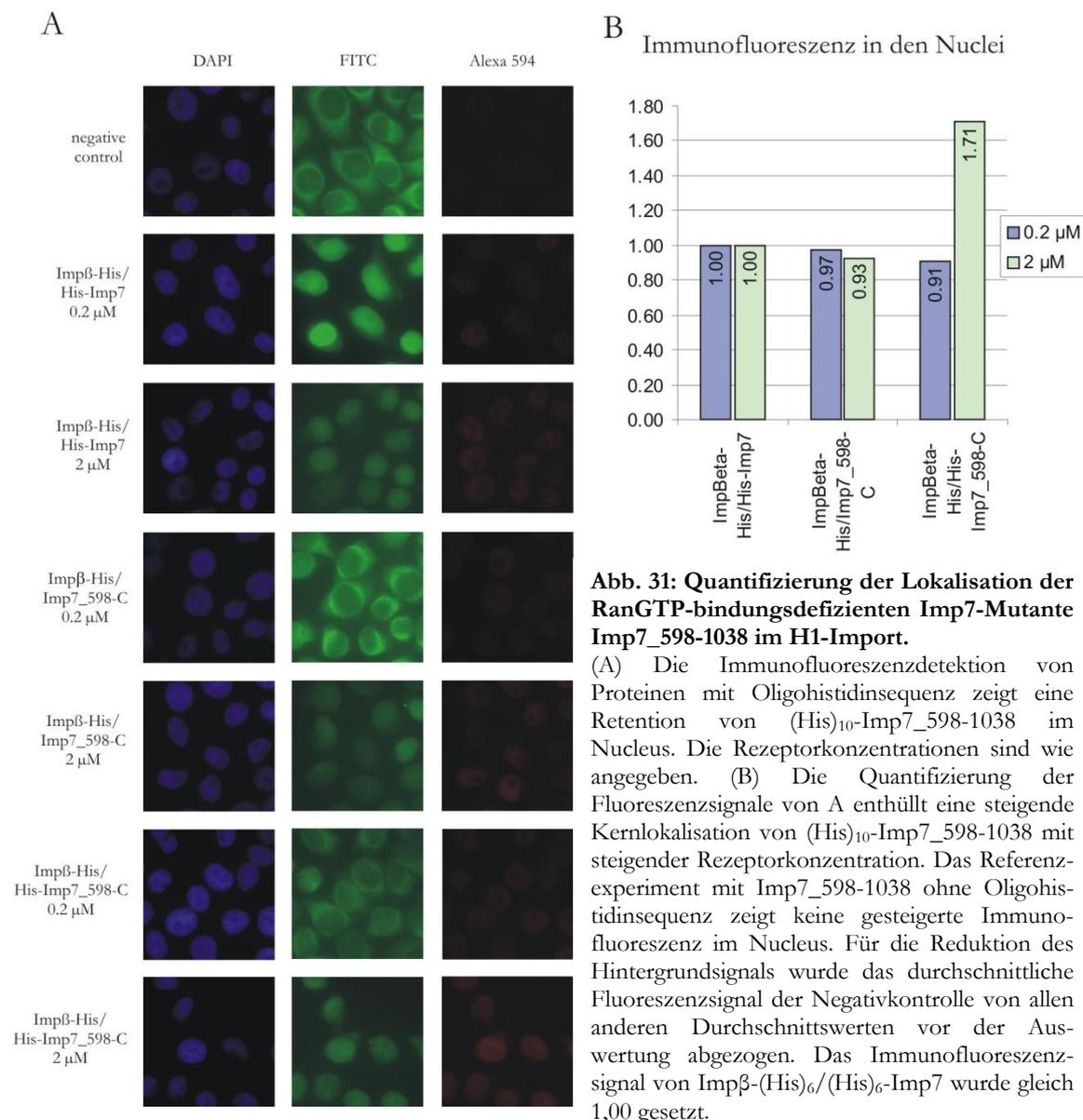
Abb. 30: Konfokale Laser-Scanning Mikroskopie des H1-Imports.

Aufnahmen mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop nach *in-vitro*-Kernimportexperimenten. Das Chromatin im Nucleus über den DAPI-Kanal visualisiert, das Importsubstrat H1 über den FITC-Kanal. Die Überlagerung zeigt, ob eine Co-Lokalisation stattfindet. Beim Einsatz von Imp β /Imp7 ist die Lokalisation von H1 eindeutig im Nucleus auszumachen. Beide Färbungen überlagern teilweise deutlich. Wird hingegen Imp β _127-641/Imp7 im Transportexperiment eingesetzt, so zeigt sich im Äquatorialschnitt des Nucleus eine prominente Färbung der Kernhülle, eine Co-Lokalisation tritt nicht auf. Die Rezeptorkonzentrationen sind wie angegeben.

3. Ergebnisse

Es soll nun wieder auf das H1-*in-vitro*-Kernimportexperiment mit Imp β und Imp7_598-1038 eingegangen werden (Abb. 29). Hier war die H1-Importkompetenz bei niedrigen Rezeptorkonzentrationen, wie auch mit Imp β _127-641/Imp7, gleichermaßen verloren (Abb. 29, Ansatz 3). Da Imp7_598-1038 keine Ran-Bindungsstelle mehr aufweist und folglich aus dem Nucleus nicht mehr exportiert werden kann (Bäuerle et al., 2002; Jäkel et al., 1999; Jäkel et al., 1998), könnte dieses Phänomen durch die Retention von Imp7_598-1038 im Nucleus verursacht sein. Damit wäre der verfügbare Rezeptorvorrat schnell erschöpft. Da eine Steigerung der Konzentration diese Kompetenz allerdings wiederherstellen konnte (Abb. 29, Ansatz 4), könnte dem nun eine Kompensation der Retention von Imp7_598-1038 im Nucleus durch einen Überschuß der Transportrezeptoren zugrunde liegen.

Um dies zu klären, wurde für die weiterführende Analyse eine mikroskopische Immunofluoreszenzdetektion mit anti-His-Antikörpern durchgeführt (vgl. 2.2.6), welche die intrazelluläre Lokalisation von (His)₁₀-Imp7_598-1038 zeigen sollte. Dabei konnte die Akkumulation von Imp7_598-1038 im Nucleus nachgewiesen werden (Abb. 31 A).



3. Ergebnisse

Nach Abzug des Hintergrundsignals der Negativkontrolle von den Durchschnittswerten der Rekonstitutionsexperimente (vgl. Tab. 1 im Anhang) belegen die bereinigten Werte, daß Imp7₅₉₈₋₁₀₃₈ eine ausgeprägte Retention im Nucleus erfährt. Dies wird besonders durch das außergewöhnlich hohe Fluoreszenzsignal im Nucleus beim Einsatz von 2 µM Impβ-(His)₆/(His)₁₀-Imp7₅₉₈₋₁₀₃₈ verdeutlicht, welches mehr als 1,7-mal so hoch ist wie jenes von 2 µM Impβ-(His)₆/(His)₆-Imp7 (Abb. 31 B).

Im Gegensatz dazu ist in keinem anderen Experiment, einschließlich der für den α-His-Antikörper unauffälligen Referenz mit Impβ-(His)₆/Imp7₅₉₈₋₁₀₃₈, ein vergleichbarer Fluoreszenzanstieg im Nucleus zu verzeichnen. Folglich wird Imp7₅₉₈₋₁₀₃₈ im Nucleus effizient zurückgehalten. Daher ist zu erklären, warum die Erhöhung der Konzentration von (His)₁₀-Imp7₅₉₈₋₁₀₃₈ zwar die Immunfluoreszenz im Nucleus steigert, aber gleichzeitig beim H1-Import die eigene Retention im Nucleus kompensieren kann. Dem widerspricht jedoch der Befund der thermodynamischen Charakterisierung der Dissoziation von Impβ/Imp7, da hier die kritische Imp7-Konzentration von etwa 500 nM deutlich unter der Konzentration liegt, welche in den eben angeführten *in-vitro*-Kernimportexperimenten eingesetzt wurde (hier bis 2 µM). Dem ist allerdings der Einfluß von nucleären Bindungspartnern von Imp7 entgegenzustellen, welcher bislang noch nicht in Betracht gezogen worden ist. Daher ist die frei verfügbare Menge an Imp7 im Nucleus als deutlich geringer einzuschätzen und liegt damit im RanGTP-sensitiven Bereich.

Daraus folgt, daß im Nucleus das Impβ/Imp-Heterodimer durch RanGTP dissoziiert werden muß, da sonst keine Retention von Imp7₅₉₈₋₁₀₃₈ im Nucleus detektierbar wäre. Weiterhin folgt, daß für diese Dissoziation die Bindung von RanGTP an Impβ verantwortlich ist, zumindest solange die Konzentration an ungebundenem Imp7 in den ermittelten Bereichen zwischen 70 und 500 nM liegt. Damit kann abschließend die Schlußfolgerung gezogen werden, daß die RanGTP-Bindung an Imp7 erlässlich ist, während die RanGTP-Bindung an Impβ auf der karyoplasmatischen Seite des NPC unter den genannten Voraussetzungen für den H1-Import notwendig ist. Hiermit konnten frühere Postulate diesbezüglich experimentell zumindest teilweise bestätigt werden (Jäkel et al., 1999).

3.2 Co-Kristallisationsexperimente mit Importin β , Importin7 und H1

Um die strukturellen Ursachen der allosterischen Aktivierung von Imp7 durch Imp β vor der Bindung an H1 zu ergründen, wurden gereinigtes Imp β (2.2.4.1), Imp7 (2.2.4.2 und 2.2.4.3), der über Gelfiltration präparierte Komplex aus Imp β und Imp7 sowie der ebenfalls über Gelfiltration präparierte ternäre Imp β /Imp7/H1.2-Komplex (2.2.3.7) in alle verfügbaren Kristallisationsscreens eingesetzt (2.1.9 und 2.2.8.1). Dabei wurden Proteinkonzentrationen von 3 bis 12 mg/ml getestet. Da weder bei 20 °C, noch bei 10 oder 4 °C eine Kristallisation zu beobachten war, wurden anschließend die verfügbaren Deletionskonstrukte von Imp β , Imp7 und H1.11L in Kristallisationsexperimenten verwendet. Alle getesteten Kombinationen sind im Folgenden aufgeführt:

Imp β _127-876

Imp β _127-641

Imp7_598-1038

Imp β /Imp7_598-1038

Imp β /Imp7_1002-1038

Imp β _127-876/Imp7_1002-1038

Imp β _127-641/Imp7_1002-1038

Imp β _127-876/Imp7/H1.2

Imp β _1-641/Imp7_598-1038/H1.11L

Imp β _127-876/Imp7_598-1038/H1.11L

Imp β _127-641/Imp7_598-1038/H1.11L

Imp β _127-641/Imp7_598-1038/H1.11L_39-225

In diesen Experimenten konnte ebenfalls keine Kristallisation erzielt werden, mit einer Ausnahme: Imp7_598-1038 ließ sich bei 10 °C in folgender Bedingung kristallisieren:

Kristallisationsbedingung für Imp7_598-1038

0,9-1,0 M NaCitrat pH 5,5

2 % (v/v) Isopropanol

1,5 % (v/v) Ethanol

8 mg/ml Protein

Diese Kristalle (Abb. 32) reagierten sehr empfindlich auf physische Krafteinwirkung, zum Beispiel bei der Entnahme der Kristalle aus dem Kristallisationstropfen mithilfe einer Nylon-Schleife. Dies deutet auf einen sehr hohen Solvensgehalt der Kristalle hin. Darüber hinaus waren sie extrem temperaturempfindlich und ließen sich nur bei 10 °C oder in flüssigem Stickstoff lagern. Leider

3. Ergebnisse

konnten mit diesen Kristallen keine Röntgenbeugungsdaten aufgenommen werden, da ihre Beugungskraft trotz ihrer Größe von 200 x 100 x 100 µm zu schwach war. Färbungsexperimente mit IzIt-Färbelösung (Hampton Research, USA) zur Identifizierung von Proteinkristallen konnten jedoch belegen, daß die Kristalle aus Protein aufgebaut sind und nicht etwa aus Salz.

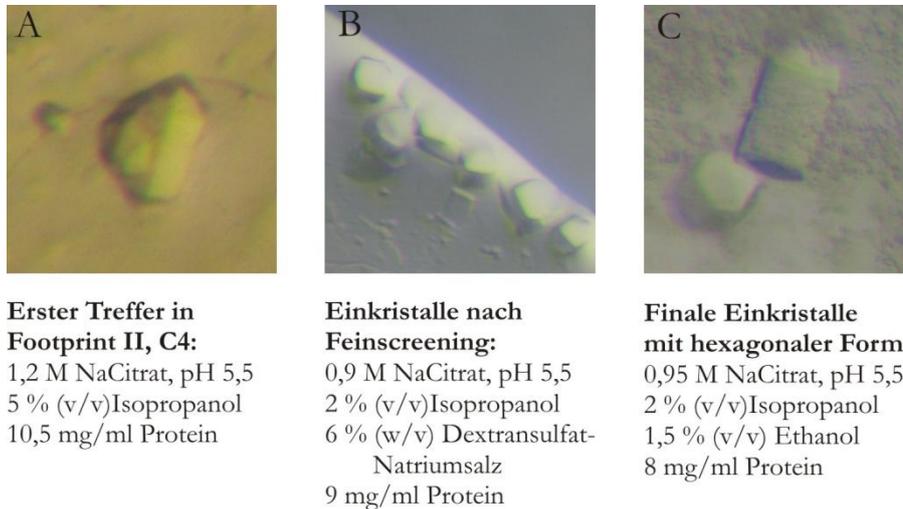


Abb. 32: Kristallisation von Imp7_598-1038.

(A) Ein erstes erfolgreiches Kristallisationsexperiment konnte im Footprint-Screen erreicht werden. Diese verwachsenen Kristalle sind allerdings keine Einkristalle. (B) Einkristalle, welche durch eine Optimierung der Kristallisationsbedingung gewonnen werden konnten. (C) Die weitere Optimierung erbrachte das Wachstum von Einkristallen mit hexagonaler Grundfläche.

Die Ursache ist vermutlich der sehr hohe Solvensgehalt der Kristalle. Eine schrittweise Austrocknung im Kristallisationstropfen erbrachte keine Verbesserung, die Anwendung eines sogenannten *Free Mounting Systems* mit kontrollierter Austrocknung im Röntgenstrahl steht allerdings noch aus und könnte die Strukturaufklärung ermöglichen.

3.3 Strukturbestimmung und -analyse von Importin β im Komplex mit der Importin β -Bindungsdomäne von Snurportin1

Wie eingangs bereits ausgeführt (vgl. 1.1 – 1.4), ist Imp β ein außergewöhnlich variabler Kernimportrezeptor, und zwar sowohl in funktioneller als auch in struktureller Hinsicht. So agiert Imp β nicht nur im Einzelrezeptortransport (ribosomale Proteine, Jäkel & Görlich, 1998) und im Rezeptor-Adapter-Transport von cNLS-Substraten (beleuchtet in Pemberton & Paschal, 2005), sondern auch als Co-Rezeptor im H1-Import. Diese Funktion konnte bereits ausführlich charakterisiert werden (3.1). Eine der erstaunlichsten Eigenschaften von Imp β aber ist seine RanGTP-unabhängige Dissoziation vom NPC während des Imports von U snRNPs (vgl. 1.3, Huber et al., 2002). Es konnte gezeigt werden, daß diese besondere Eigenschaft durch die IBB-Domäne des Adapters Snurportin1 (IBB_{SPN1}) vermittelt wird, die strukturelle Ursache aber blieb im Dunkeln. Die Aufklärung der Komplexstruktur von Imp β und IBB_{SPN1} mittels hochauflösender Röntgenkristallographie war daher von großer Bedeutung.

3.3.1 Präparation und Kristallisation von Komplexen aus Imp β und IBB_{SPN1}

Um eine Röntgenstrukturanalyse von Imp β /IBB_{SPN1} zu ermöglichen, wurden sowohl Imp β in voller Länge und als auch die Imp β -Fragmente Imp β _1-641 und Imp β _127-876 im Komplex mit IBB_{SPN1} (SPN1_1-65) über Gelfiltrationschromatographie (2.2.3.7) präpariert und in Konzentrationen zwischen 7 und 10 mg/ml in die Kristallisationsexperimente eingesetzt (2.2.8.1). In Abb. 33 ist exemplarisch die Präparation von Imp β _127-876/IBB_{SPN1} dargestellt.

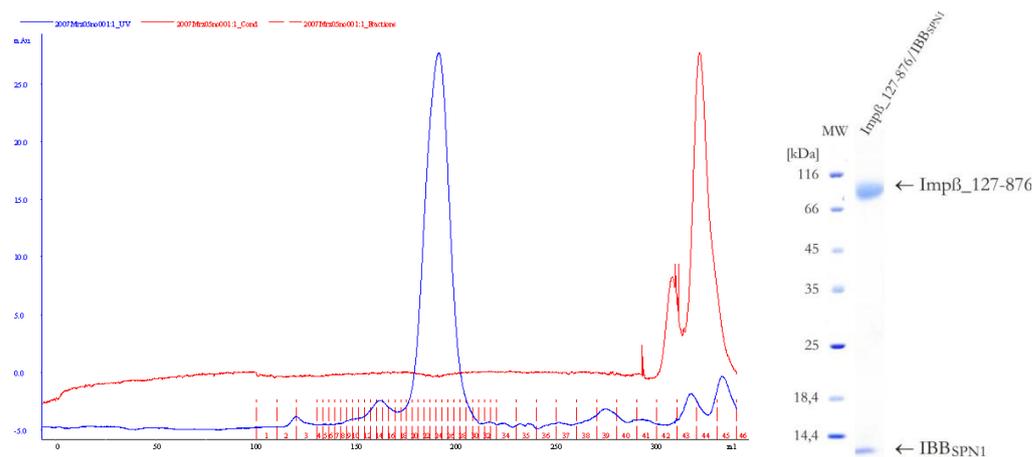


Abb. 33: Präparation des Komplexes Imp β _127-876/IBB_{SPN1}.

Links ist das Chromatogramm der präparativen Gelfiltration dargestellt, der Komplex eluiert in einem ausgeprägten Absorptionsmaximum. Rechts ist die SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung des fertigen Präparates gezeigt. Die Molekulargewichte der Markerproteine (MW) sind angegeben.

3. Ergebnisse

Eine Kristallbildung konnte zunächst mit keinem der verschiedenen Komplexe beobachtet werden. In Kristallisationsexperimenten mit Imp β _127-876/IBB_{SPN1} jedoch konnte schließlich bei 20 °C die initiale Bedingung für eine Kristallisation des Komplexes ermittelt werden. Allerdings wurde zunächst lediglich die Ausbildung einer Phasentrennung mit einigen Sphärolithen beobachtet (Abb. 34 A). Nach einer Änderung der Kristallisationstemperatur von 20 auf 10 °C und einer Optimierung der Bedingung konnten in der Folge Einkristalle gewonnen werden, welche aber nur in einer der drei Raumrichtungen signifikant wuchsen (Abb. 34 B). Darüber hinaus waren die Konzentrationsfenster der einzelnen Komponenten der Kristallisationsbedingung extrem eng. So konnte eine Kristallisation nur in Gegenwart von 0,92-0,96 M AmSO₄ erreicht werden. Der pH-Wert des NaCitrat-Puffers mußte zwischen pH 5,4 und 5,55 liegen. Durch *Streak-Seeding*-Experimente mit einem Katzenschnurrhaar (2.2.8.2) konnte jedoch schließlich ein ausgeprägtes Kristallwachstum in zwei Dimensionen beobachtet werden (Abb. 34 C). Die Kristalle wiesen nun eine Größe von etwa 120 x 35 x 20 μ m auf und waren daher für Röntgenbeugungsexperimente an einem Elektronensynchrotron geeignet.

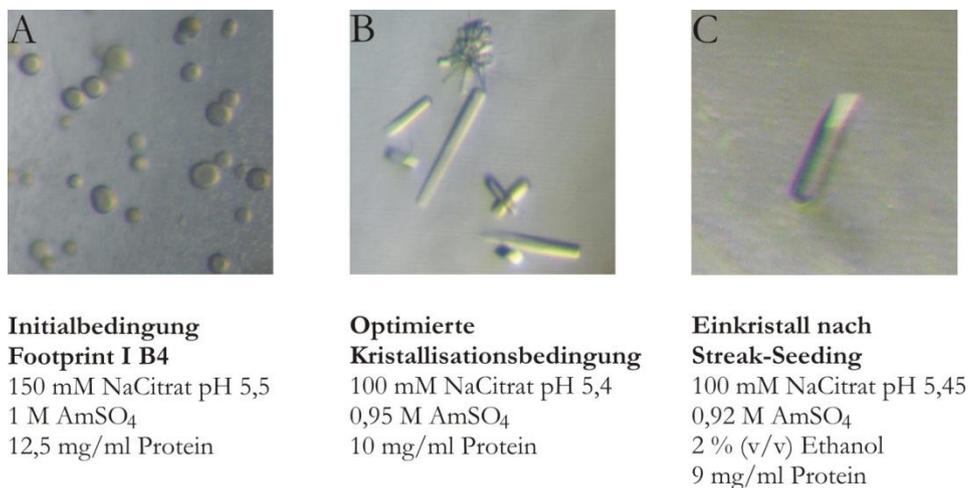


Abb. 34: Co-Kristallisation von Imp β _127-876 und IBB_{SPN1}.

(A) Initialbedingung mit Phasentrennung und Sphärolithen. (B) Einkristalle nach der Optimierung der Initialbedingung, Dimensionen etwa 200 x 15 x 15 μ m. (C) Einkristall nach Streak-Seeding, nun mit einem signifikanten Wachstum in zwei Raumrichtungen, Dimensionen etwa 120 x 35 x 20 μ m.

3.3.2 Datensammlung und -prozessierung

Die Kristalle von Imp β _127-876/IBB_{SPN1}, welche durch Streak-Seeding-Experimente gewonnen werden konnten, wurden zur Datenaufnahme am Berliner Elektronensynchrotron (BESSY) in Cryopuffer überführt. Die Zusammensetzung des Cryopuffers glich der Kristallisationsbedingung, jedoch mit dem Zusatz von 20 % (v/v) Glycerin. So konnte ein nativer Datensatz bei 100 K und einer Wellenlänge von 0,91841 Å aufgenommen werden (2.2.8.3 und 2.2.8.4). Die maximale Auflösung betrug 2,30 Å. Diese mußte aber auf 2,84 Å beschnitten werden, weil die Datenqualität der höheren Auflösung aufgrund sehr hoher R-Faktoren nicht zur Weiterprozessierung geeignet war. Dennoch stellte dies eine deutliche Verbesserung gegenüber der heimischen Drehanode (keine

3. Ergebnisse

Streuung) und dem Deutschen Elektronensynchrotron in Hamburg DESY (4 Å) dar. Dies ist damit zu erklären, daß die Kristalle immer noch sehr klein waren und daher zur Reduktion des Hintergrundsignals eine Minimierung des Strahlendurchmessers erforderten. Eine hierfür ausreichende Fokussierung des Strahlengangs und, damit einhergehend, eine effektive Nutzung des Strahls bei einem Abstand der *slits* von 0,1 mm war nur am BESSY gegeben. Nach Indizierung und Datenreduktion mit XDS, XSCALE und XPREP konnte dem gemessenen Kristall eindeutig die orthorhombische Raumgruppe P2₁2₁2₁ zugeordnet werden. Um die Anzahl der Moleküle pro asymmetrischer Einheit abschätzen zu können, wurde der Matthews-Koeffizient berechnet, welcher in der Proteinkristallographie typischerweise zwischen 1,7 und 3,0 Å³/Da liegt. Die einzig sinnvolle Lösung bei einem Solvensgehalt von etwa 50 % war gegeben, wenn die asymmetrische Einheit ein kristallographisches Monomer enthält, in diesem Falle also das Heterodimer. Die Datenstatistiken sind in Tab. 2 wiedergegeben.

Tab. 2: Statistik der Datensammlung des nativen Datensatzes von Impβ₁₂₇₋₈₇₆/IBB_{SPN1}

	<i>Nativer Datensatz</i>
Wellenlänge (Å)	0.91841
Zelldimensionen (Å)	a=64.22, b=79.07, c= 208.46
Winkel	α=β=γ=90°
Raumgruppe	P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Auflösungsbereich (Å)	38.82-2.84 (2.92-2.84)
Zahl der Reflexe (N)	124446
Durchschnittliches I/σ	9.18 (2.55)
Vollständigkeit (%)	99.8 (100.0)
Redundanz	4.82 (4.92)
R _{merge} (%)	19.2 (62.6)
R _{PIM} (%) ¹	12.0 (42.1)

$$R_{merge} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I_i(hkl) - \langle I_i(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} \sum_i \langle I_i(hkl) \rangle},$$

mit der Summe \sum_i über alle separaten Messungen des eindeutigen Reflexes hkl.

¹ wie in XPREP implementiert (Sheldrick, 2005).

Die Phasenbestimmung zur Berechnung der Strukturfaktoren und einer ersten Elektronendichtekarte erfolgte über molekularen Ersatz.

3.3.3 Phasenbestimmung über molekularen Ersatz

Zur Bestimmung der Phaseninformation durch molekularen Ersatz (vgl. 2.2.8.5) wurden die Koordinaten von Impβ aus der Kristallstruktur von Impβ im Komplex mit IBB_x (Cingolani et al., 1999) als Suchmodell herangezogen. Dabei wurden analog zum hier kristallisierten Fragment die

3. Ergebnisse

Koordinateninformationen auf den Bereich von AS 127-876 beschränkt. Da zunächst mit der vollständigen Struktur keine sinnvolle Lösung gefunden werden konnte, wurden nun virtuelle Fragmente des Suchmodells erzeugt. Zu diesem Zweck wurden Fragmentpaare durch Teilen des Originalmoleküls nach ganzen HEAT-*repeats* generiert und in PHASER als getrennte Suchmodelle eingelesen. Auch auf diese Weise konnte zunächst keine Lösung bestimmt werden, da *ab initio* die Zahl erlaubter Kollisionen in PHASER gleich null gesetzt ist. Nachdem diese Zahl auf 7 erhöht worden war, konnte mit dem Fragmentpaar Imp β _127-489/Imp β _490-876 eine Lösung ermittelt werden, die die Berechnung der ersten Elektronendichtekarte erlaubte. Nach der ersten Verfeinerung (vgl. 2.2.8.6) zeigte sich, daß Imp β _127-489 nicht mit demjenigen Partnerfragment der eigenen Einheitszelle die von Imp β bekannte Superhelix bildete, sondern mit dem Fragment der Nachbarzelle. Nach der Korrektur dieses Fehlers wurde erkennbar, daß im Bereich der virtuellen Schnittstelle eine Fehlpositionierung dreier α -Helices vorlag, welche die in PHASER identifizierten Kollisionen verursachte. Nach dem Löschen dieser Bereiche und einer erneuten Verfeinerung konnte nun die korrekte Lage dieser Helices ermittelt werden. Zusätzlich tauchte nun die Dichte einer α -Helix auf, welche in der konkaven Kavität von Imp β positioniert war, die Elektronendichte von IBB_{SPN1}.

3.3.4 Modellbau und Strukturverfeinerung

Der Modellbau erfolgte in COOT (Emsley & Cowtan, 2004), wie in Abschnitt 2.2.8.6 angegeben. Die Strukturverfeinerung wurde mit dem CCP4-Softwarepaket durchgeführt (Collaborative Computational Project No. 4, 1994; vgl. 2.2.8.6). Die Zahl der Verfeinerungszyklen in REFMAC5 wurde so eingestellt, daß der kristallographische und der freie R-Faktor jeweils konvergierten und dabei gleichzeitig maximal um 5 % auseinanderlagen. Während zu Beginn des Modellbaus gerade die Seitenketten der neu einzusetzenden Aminosäuren häufig schlecht definiert waren, so steigerte sich die Genauigkeit der Elektronendichtekarte durch die Phasenverbesserung im fortschreitenden Modellbau zunehmend. Dies wurde durch Löschen der entsprechenden Teile und einer anschließenden Verfeinerung iterativ verifiziert. Mithilfe des Ramachandran-Diagramms wurde überprüft, ob die Bindungswinkel des C α -Rückgrats (φ - und ψ -Winkel) in sterisch erlaubten Bereichen liegen (Abb. 35).

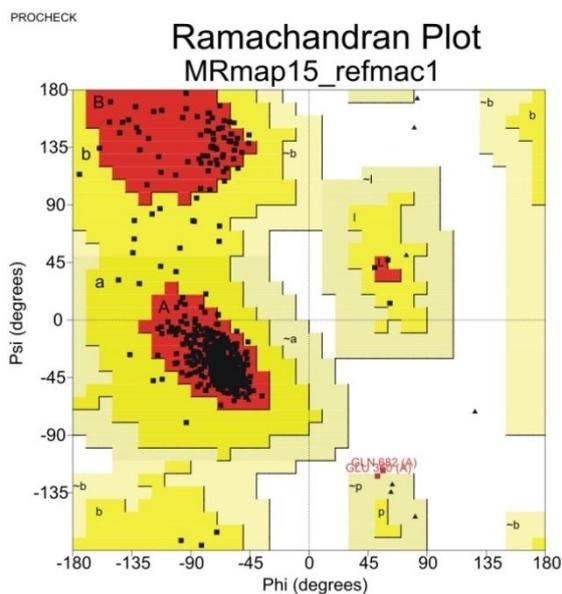


Abb. 35: Ramachandran-Diagramm des verfeinerten Modells von Imp β _127-876/IBB_{SPN1}.

Das Ramachandran-Diagramm wurde mithilfe des Programms PROCHECK erstellt, welches im CCP4-Programmpaket implementiert ist. Bevorzugte Regionen sind in rot dargestellt, zusätzlich erlaubte in gelb, tolerierbare in beige und unerlaubte in weiß. Die Dreiecke stellen Glycine dar. Alle anderen Aminosäuren sind als Quadrate gezeigt. Das Diagramm zeigt, daß nur eine Aminosäure mit seiner Kombination der φ - und ψ -Winkel in einer unerlaubten Region liegt, Gln682. Eine weitere Aminosäure liegt in einer tolerierbaren Region. Alle anderen der insgesamt 815 Aminosäuren liegen in bevorzugten (95,4 %) und in zusätzlich erlaubten Regionen (4,3 %).

3. Ergebnisse

Darüber hinaus wurde auch die korrekte Stereochemie der Seitenketten ständig überprüft. Beim Einbau von Wassermolekülen wurde wegen der Auflösung von nur 2,8 Å konservativ vorgegangen, das heißt nur klar definierte Wassermoleküle wurden in das Modell integriert. Eine Zusammenfassung der Verfeinerungsstatistiken ist in Tab. 3 aufgeführt.

Tab. 3: Verfeinerungsstatistiken der Kristallstruktur von Imp β _127-876/IBB_{SPN1}

Auflösungsbereich (Å)	38.82-2.84
Anzahl der verwendeten Reflexe	24533
Anzahl der Proteinatome	6042
Anzahl der Wassermoleküle	46
R _{cryst} (%)	23.6
R _{free} (%)	28.6
Figure of merit (%)	81.4
Ramachandran-Statistiken	
Bevorzugte Regionen (%)	95.4
Zusätzlich erlaubte Regionen (%)	4.3
Noch tolerierbare Regionen (%)	0.1
Unerlaubte Regionen (%)	0.1
Standardabweichungen vom Idealwert	
Bindungsabstände (Å)	0.006
Bindungswinkel (°)	0.930
Durchschnittlicher B-Faktor (Å ²)	31.508

$$R_{cryst} = \frac{\sum ||F_{obs}| - |F_{calc}||}{\sum F_{obs}}$$

R_{free} wird wie R_{cryst} berechnet, aber summiert über die 5 % Reflexe des Testsatzes.

3.3.5 Beschreibung der Kristallstruktur von Imp β _127-876/IBB_{SPN1}

Die Kristallstruktur von Imp β _127-876 im Komplex mit IBB_{SPN1} zeigt, daß, wie bereits berichtet (Lee et al., 2005; Matsuura & Stewart, 2004; Chook & Blobel, 1999; Cingolani et al., 1999; Vetter et al., 1999), Imp β ein α -helicales Protein ist (Abb. 36). Das kristallisierte Fragment Imp β _127-876 umfaßt 16 der 19 HEAT-*repeats* von Imp β in voller Länge. Ein HEAT-*repeat* besteht dabei aus zwei antiparallelen α -Helices, welche durch eine kurze, flexible Schleife verbunden sind. Jeder einzelne HEAT-*repeat* ist nahezu parallel zur superhelicalen Achse des Moleküls ausgerichtet, und alle HEAT-*repeats* von Imp β sind streng repetitiv organisiert. Zusätzlich ist jeder HEAT-*repeat* immer orthogonal zum Verlauf der Superhelix des gesamten Moleküls orientiert. Daraus folgt, daß immer eine α -Helix der äußeren Umgebung zugewandt (A-Helix) ist und eine immer der inneren Kavität (B-Helix). Auf diese Weise formen die A-Helices die konvexe Außenfläche von Imp β , die B-Helices bilden die konkave Innenfläche (Abb. 36 B). Die Kontakte zwischen den einzelnen HEAT-*repeats* sind

3. Ergebnisse

hauptsächlich hydrophober Natur und bilden so einen hydrophoben Kern entlang der Superhelix (Lee et al., 2005). Die Struktur von Imp β _127-876 kann in zwei definierte Bereiche unterteilt werden, einen N-terminalen Bogen, bestehend aus den HEAT-repeats 4-12A (AS 127-564), und einen C-terminalen Bogen, welcher die HEAT-repeats 12B-19 (AS 577-876) umfaßt. Dieser C-terminale Bogen ist deutlich stärker gekrümmt als der N-terminale (Abb. 36).

Die Imp β -Bindungsdomäne von SPN1 (IBB_{SPN1}) ist an die konkave Innenfläche des C-terminalen Bogens von Imp β gebunden (Abb. 36).

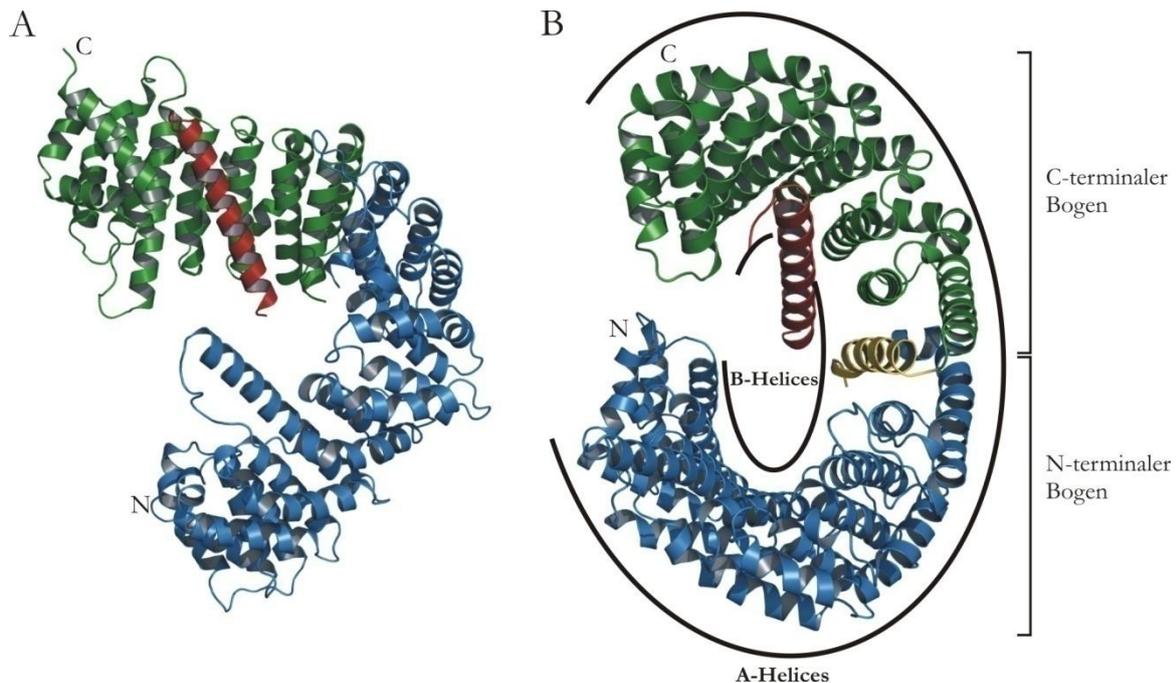


Abb. 36: Kristallstruktur von Imp β _127-876 im Komplex mit IBB_{SPN1}.

(A) Gesamtansicht der Struktur mit Blick in die C-terminale Kavität von Imp β . IBB_{SPN1} ist in rot dargestellt, der C-terminale Bogen von Imp β , welcher an IBB_{SPN1} bindet, ist grün eingefärbt, der N-terminale Bogen, von der Interaktion mit IBB_{SPN1} ausgeschlossen, ist blau. (B) Struktur um 90° gedreht, mit Blick vom C-Terminus aus in Richtung N-Terminus. Farbgebung wie in (A), mit Ausnahme von HEAT 13B (gelb). Diese Helix ist aus der konkaven Innenfläche, welche durch die B-Helices gebildet wird, in die Richtung von IBB_{SPN1} heraus gekippt. Die Außen- und Innenfläche von Imp β , die durch die A- und B-Helices geformt werden, ist mit Ellipsoiden verdeutlicht.

Von IBB_{SPN1} ist bemerkenswerterweise nur der Bereich von Ser37 bis Asp67 in der Elektronendichte klar definiert, der N-Terminus dagegen ist flexibel, wie auch die C-terminale (His)₆-Sequenz. Es ist lediglich zu erahnen, daß die α -helicale Faltung fortgesetzt wird. Der definierte Teil von IBB_{SPN1} liegt vollständig als α -Helix mit einer Länge von 47 Å vor und ist nahezu parallel zur superhelicalen Achse von Imp β orientiert. Dabei ist sie jedoch leicht entlang dem Molekülverlauf von Imp β gekippt. Das N-terminale Ende von IBB_{SPN1} deutet in Richtung der N-terminalen Kavität von Imp β , allerdings deutlich weg von der konkaven Innenfläche, hinein in das Solvens. Um auszuschließen, daß eine Bindung des N-terminalen Teiles von IBB_{SPN1} an Imp β durch eine N-terminale Deletion von IBB_{SPN1} verursacht wurde, wurden die Kristalle gewaschen, aufgelöst und diese Lösung einer N-terminalen Proteinsequenzierung unterzogen. Dabei konnte die Präsenz der vollständigen IBB_{SPN1} im Kristall nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3. Ergebnisse

Der definierte Teil von IBB_{SPN1} ist nahezu vollständig an den Interaktionen mit Imp β beteiligt und baut dabei hauptsächlich Wasserstoffbrückenbindungen (HBBs) und hydrophobe Interaktionen auf. Es finden sich jedoch auch polare Kontakte und einige Salzbrücken. Die Bindungsflächen von Imp β _127-876 und IBB_{SPN1} werden durch 29 verschiedene Interaktionen zusammengehalten. Diese involvieren Aminosäureseitenketten der B-Helices von Imp β im Bereich von Asn578 bis Trp864 und Seitenketten von Gln40 bis Leu65 (IBB_{SPN1}).

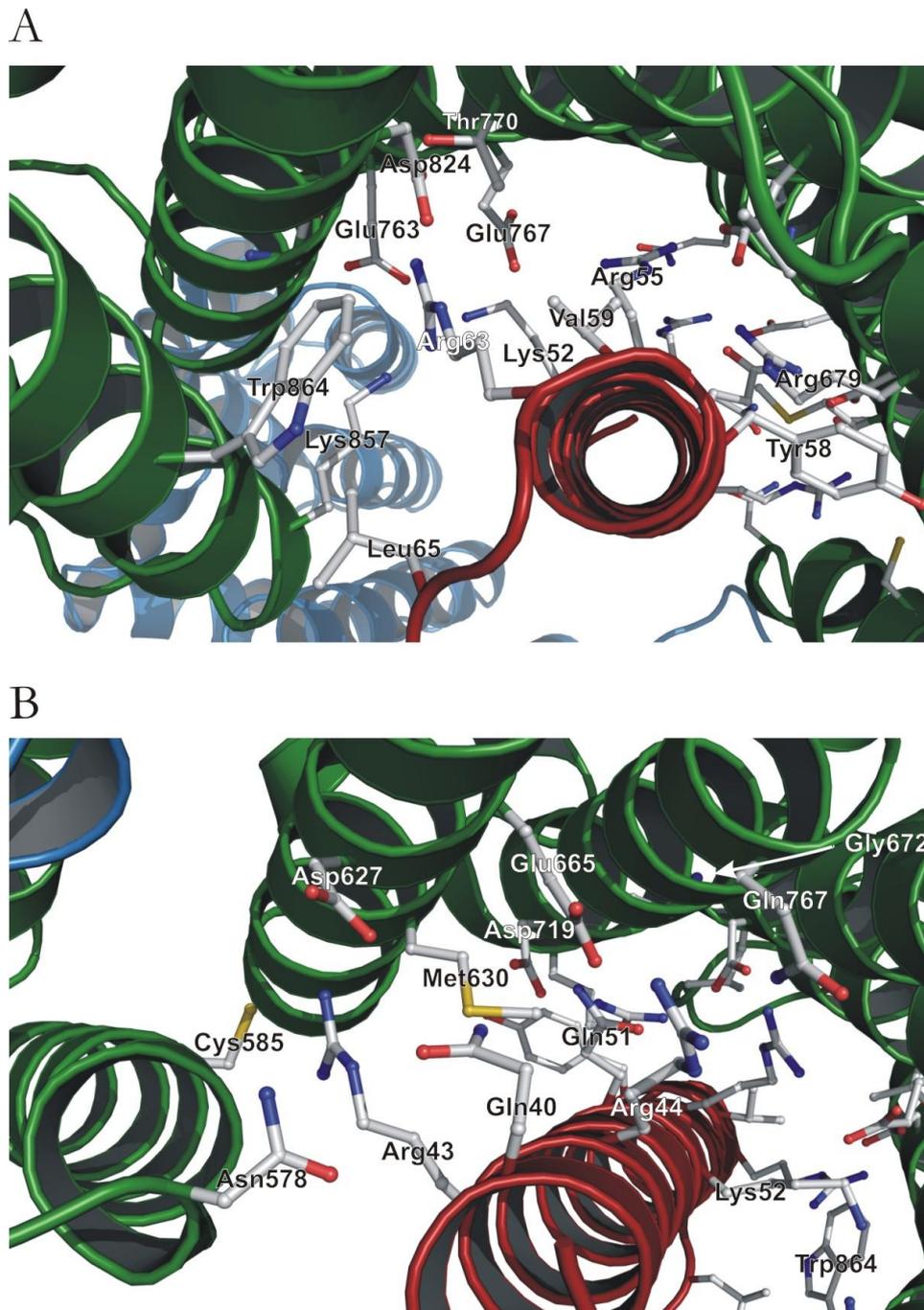


Abb. 37: Interaktionsnetzwerk zwischen Imp β _127-876 und IBB_{SPN1}.

(A) Detailansicht der an der Interaktion beteiligten Aminosäuren mit Blick vom C-Terminus von IBB_{SPN1} aus. Seitenketten und auch Hauptkettenatome, welche in der Bindung zwischen Imp β _127-876 und IBB_{SPN1} involviert sind, sind als Kugel-Stab-Modelle dargestellt. Kohlenstoffatome sind grau, Sauerstoffatome rot, Stickstoffatome blau und Schwefelatome gelb eingefärbt. Die restlichen Polypeptide sind als Cartoon-Modell gezeigt, die Farbgebung ist wie in Abb. 36. (B) Sicht vom N-Terminus von IBB_{SPN1} aus.

3. Ergebnisse

Insgesamt werden 15 Wasserstoffbrücken ausgebildet zwischen 6 Seitenketten von IBB_{SPN1} und 7 Seitenketten von Imp β (Abb. 37 A und B).

Das Wasserstoffbrückennetzwerk zwischen Imp β _127-876 und IBB_{SPN1} ist bisweilen recht komplex, wie Arg43 von IBB_{SPN1} verdeutlicht (Abb. 38A). Es bindet mit seiner Guanidinium-Gruppe sowohl das Schwefelatom von Met630 von Imp β mit einer zweizähligen Wasserstoffbrücke, als auch mit jeweils einer Wasserstoffbrücke die Carboxylgruppe von Asp627 und die Sulfhydrylgruppe von Cys585. Zusätzlich bildet Arg43 eine intramolekulare Wasserstoffbrücke mit Gln40 aus. Es entsteht also ein komplexes, zugleich aber wohldefiniertes Bindungsmuster.

Neben Arg43 gibt es drei weitere Reste von IBB_{SPN1}, welche mehr als eine Wasserstoffbrücke zu Imp β aufbauen. Arg55 bildet zwei Wasserstoffbrücken zu Glu767 von Imp β aus und Arg44 stellt Glu665 zwei Wasserstoffatome zur Verfügung. Arg63 bildet nicht nur zwei parallele Wasserstoffbrücken mit Asp824 (Imp β) und eine weitere mit dem Hauptkettensauerstoff von Gly820 (Imp β) aus, sondern interagiert zusätzlich mit einem Wassermolekül aus der Hydrathülle von Imp β (Abb. 38 B). Arg 63 ist also neben den direkten Kontakten zu Imp β auch in indirekten involviert. Die übrigen Wasserstoffbrücken werden zwischen Gln51 (IBB_{SPN1}) und Gly672 (Imp β) und schließlich zwischen Tyr58 (IBB_{SPN1}) und Arg679 (Imp β) aufgebaut.

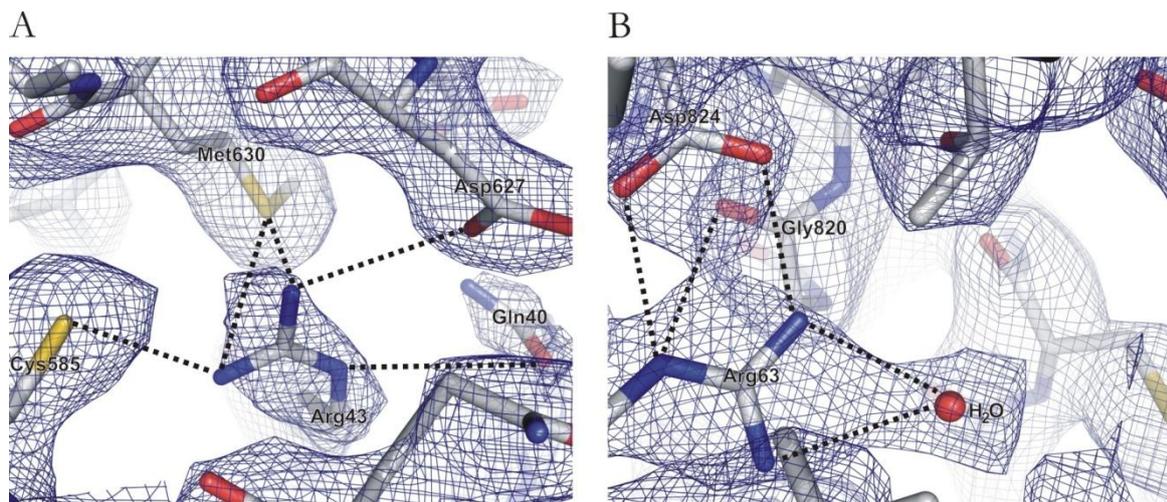


Abb. 38: Elektronendichtedarstellung der Interaktionsnetzwerke zweier Arginine von IBB_{SPN1}. Gepunktete Linien zeigen Wasserstoffbrücken an. (A) Das Wasserstoffbrückennetzwerk mit Arg43 (IBB_{SPN1}) im Zentrum involviert Cys585, Asp627 und Met630 von Imp β . In der Nachbarschaft befindet sich Gln40 (IBB_{SPN1}) und bildet eine schwache, intramolekulare Wasserstoffbrücke aus. (B) Arg63 (IBB_{SPN1}) baut nicht nur zwei parallele Wasserstoffbrücken zu Asp824 (Imp β) und eine weitere zu Gly820 (Imp β) auf, sondern etabliert darüber hinaus Wasserstoffbrücken zum Sauerstoff eines Wassermoleküls in der Hydrathülle von Imp β .

Außer den angeführten Wasserstoffbrücken tragen noch 5 Salzbrücken hauptsächlich zur Bindungsenergie zwischen IBB_{SPN1} und Imp β bei. Auch hier können ein- und zweizählige Interaktionen beobachtet werden, wie die zweizählige Salzbrücke zwischen Arg55 (IBB_{SPN1}) und Asp719 (Imp β) und die einzählige Salzbrücke zwischen Lys52 (IBB_{SPN1}) und Glu763 (Imp β) demonstrieren (Abb. 39 A und B).

3. Ergebnisse

Daneben bestehen noch einige schwache, in der Summe aber signifikante, polare Kontakte zwischen Gln40 (IBB_{SPN1}) und Asn578, Glu626 und Asp627 (Imp β , Abb. 39 C).

Schließlich können noch 6 hydrophobe Interaktionen beobachtet werden, welche in zwei Fällen von denselben Seitenketten aufgebaut sind, welche auch Wasserstoffbrücken ausbilden. Ein bemerkenswertes Beispiel ist Met630 (Imp β), welches an IBB_{SPN1} über eine Wasserstoffbrücke zwischen seinem Schwefelatom und der Guanidiniumgruppe von Arg43 gebunden ist (Ab. 38 A) und zugleich eine hydrophobe Interaktion zwischen seiner terminalen Methylgruppe und dem γ -Kohlenstoff von Arg44 aufbaut (Abb. 39 D). Diese Mischung aus hydrophoben Kontakten und Wasserstoffbrücken ist sogar noch ausgeprägter bei der Interaktion zwischen Tyr58 (IBB_{SPN1}) und Arg679 (Imp β) zu beobachten (Abb. 39 E). Beide Seitenketten stehen über eine Wasserstoffbrücke zwischen der Hydroxylgruppe von Tyr58 und dem Carbonylsauerstoff von Arg679 in engem Kontakt zueinander. Gleichzeitig gehen sie eine hydrophobe Interaktion ein, welche zwischen dem aromatischen Ring von Tyr58 und dem β -Kohlenstoff von Arg679 besteht.

Auf diese Weise wird ein dicht gewobenes Netzwerk von Interaktionen zwischen Imp β und IBB_{SPN1} erzeugt.

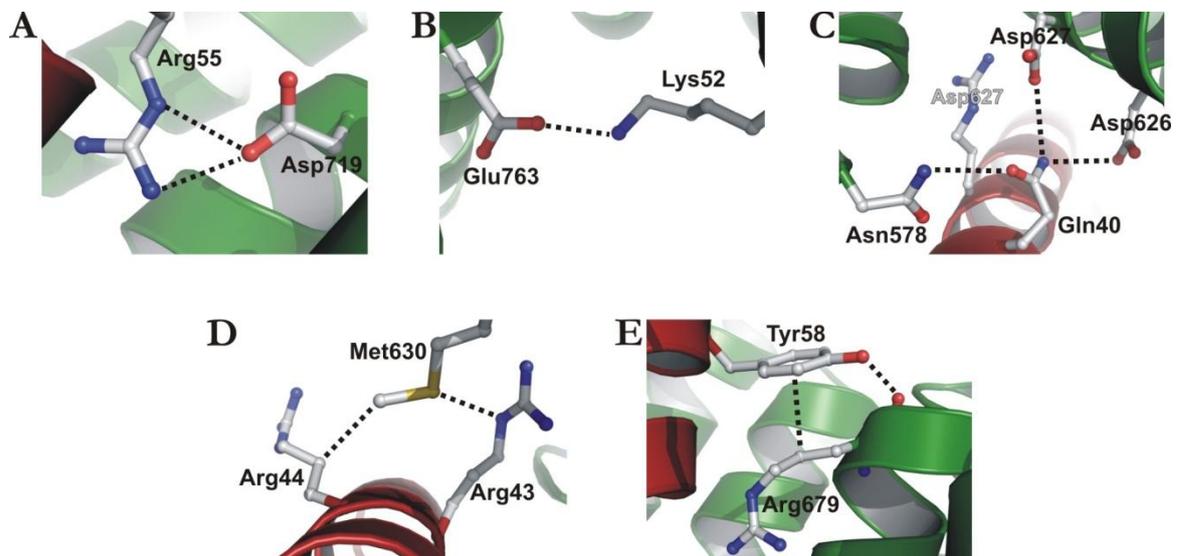


Abb. 39: Detailaufnahmen weiterer Interaktionen zwischen Imp β und IBB_{SPN1}.

Die beteiligten Aminosäureseitenketten sind als Kugel-Stab-Modell dargestellt. Interaktionen sind mit gepunkteten Linien verdeutlicht. (A-B) Salzbrücken zwischen Imp β und IBB_{SPN1}. (A) Asp719 (Imp β) bildet eine zweizählige Salzbrücke zu Arg55 (IBB_{SPN1}) aus. (B) Einfache Salzbrücke zwischen Glu763 (Imp β) und Lys52 (IBB_{SPN1}). (C) Schwache, polare Kontakte zwischen Gln40 (IBB_{SPN1}) und Asn578, Asp626 und Asp627 (Imp β) koordinieren die Kopfgruppe von Gln40. (D) Met630 (Imp β) baut gleichzeitig eine Wasserstoffbrücke zu Arg43 (IBB_{SPN1}) und eine hydrophobe Interaktion zu Arg44 (Imp β) auf. (E) Tyr58 (IBB_{SPN1}) geht eine Wasserstoffbrückenbindung zum Carbonylsauerstoff von Arg679 (Imp β) ein und etabliert eine zusätzliche hydrophobe Interaktion mit der Seitenkette von Arg679.

Verläßt man die Ebene der einzelnen Interaktionen und kehrt zum Arrangement der HEAT-*repeats* von Imp β zurück, so werden die Auswirkungen der Interaktionen mit IBB_{SPN1} auf die Faltung von Imp β deutlich.

So fällt auf, daß im Gegensatz zur gewöhnlichen Faltung von HEAT-*repeats* die erste Helix des C-terminalen Bogens, HEAT 13B, aus der von den B-Helices gebildeten konkaven Innenfläche in

3. Ergebnisse

Richtung der IBB-Domäne heraustritt und so die Beteiligung von HEAT 12B an der Interaktion ausschließt. Dies hat einen maximalen Abstand von 8 Å zwischen dem N-Terminus dieser Helix (Asn578) und der restlichen Oberfläche von Imp β zur Folge. Es ist bemerkenswert, daß ein großer Teil der Schleife, welche HEAT 13A und HEAT 13B miteinander verbindet, in der Elektronendichtekarte nicht ausreichend definiert ist. Dies ist ein deutlicher Indikator für eine hohe, strukturelle Flexibilität. Daher liegt hier wahrscheinlich ein molekulares Gelenk vor, welches die ausgeprägte Bewegung von HEAT 13B ermöglicht.

Zusammenfassend kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß IBB_{SPN1} den C-terminalen Bogen von Imp β aufgrund der vielfältigen Interaktionen mit den innen gelegenen B-Helices in einer geschlossenen Konformation fixiert. Im Gegensatz dazu liegt der N-terminale Bogen in einer entspannten und offenen Konformation vor. Tatsächlich kann keinerlei Interaktion von IBB_{SPN1} mit diesem Teil von Imp β beobachtet werden. Dies ist insofern höchst erstaunlich, als in dieser Region die saure Schleife von Imp β liegt (Gln333-Asn343, vgl. 1.4), welche neben allosterischen Mechanismen als Hauptgrund für die RanGTP-vermittelte Dissoziation von Imp β /Imp α angesehen wird (Lee et al., 2005; Cingolani et al., 1999; Vetter et al., 1999). Eine Interaktion von IBB_{SPN1} mit dieser sauren Schleife kann in der hier vorgestellten Struktur jedoch ausgeschlossen werden. Dies steht im deutlichen Gegensatz zur Kristallstruktur von Imp β /IBB α (Cingolani et al., 1999). Daher sollen im Folgenden die Unterschiede zwischen den Strukturen von Imp β /IBB α und Imp β /IBB_{SPN1} und auch ihre Auswirkungen erörtert werden.

3.3.6 Struktureller Vergleich zwischen Imp β /IBB_{SPN1} und Imp β /IBB α

Im Vergleich der Kristallstrukturen von Imp β ₁₂₇₋₈₇₆/IBB_{SPN1} und Imp β /IBB α offenbaren sich signifikante Unterschiede zwischen beiden Strukturen (Abb. 40). Die Ausdehnung von Imp β ₁₂₇₋₈₇₆ im Komplex mit IBB_{SPN1} (107 Å) bzw. des gleichen Fragmentes im Komplex mit IBB α (93 Å), gemessen zwischen Asn141 am N-Terminus und Ala876 am C-Terminus, unterscheidet sich um 14 Å. Dies äußert sich auch in der Standardabweichung aller Atompositionen von 8,07 Å.

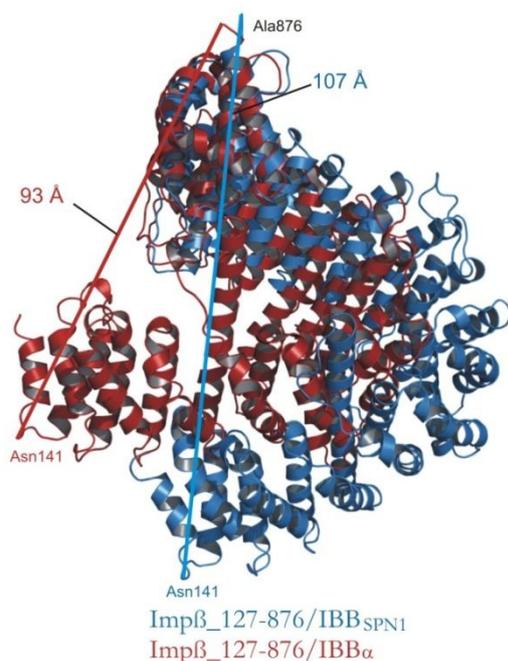


Abb. 40: Strukturvergleich zwischen Imp β /IBB_{SPN1} und Imp β /IBB α .

Die Überlagerung erfolgte nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate. Es ist jeweils nur das Fragment Imp β ₁₂₇₋₈₇₆ dargestellt. Die Einfärbung der Moleküle ist, wie unter der Abbildung angegeben. Die Überlagerung der C-Termini beider Imp β -Moleküle zeigt einen deutlichen Unterschied in der relativen Orientierung des N-terminalen Bogens. Während Imp β im Komplex mit IBB α die Konformation einer gespannten Feder einnimmt, so ist es im Komplex mit IBB_{SPN1} relaxiert. Dies äußert sich in einem Zuwachs der Ausdehnung des Moleküls und damit der Länge der superhelicalen Achse. Die maximale Ausdehnung beider Moleküle wurde jeweils zwischen Asn141 am N-Terminus und Ala876 am C-Terminus bestimmt und ist entsprechend angegeben.

3. Ergebnisse

Gemäß dem bereits zuvor gezeigten Rechner-gestützten Sequenzvergleich zwischen IBB_α und IBB_{SPN1} (vgl. 1.6; Cingolani et al., 1999) wurde angenommen, daß beide IBB-Domänen hoch homolog seien und daher auf die gleiche Weise an Imp β binden müßten (Cingolani et al., 1999). Werden nun diejenigen Seitenketten von Imp β betrachtet, welche mit beiden IBB-Domänen interagieren, so zeigt sich, daß in der Tat 11 Reste von Imp β von beiden IBB-Domänen gleichermaßen gebunden werden (Abb. 41). Vier dieser Reste werden auch tatsächlich von Seitenketten beider IBB-Domänen gebunden, welche im angesprochenen Sequenzvergleich überlagern. Diese Seitenketten finden sich exklusiv im C-terminalen Teil der IBB-Domänen, beginnend mit Arg39 (IBB_α) beziehungsweise Gln51 von IBB_{SPN1}.

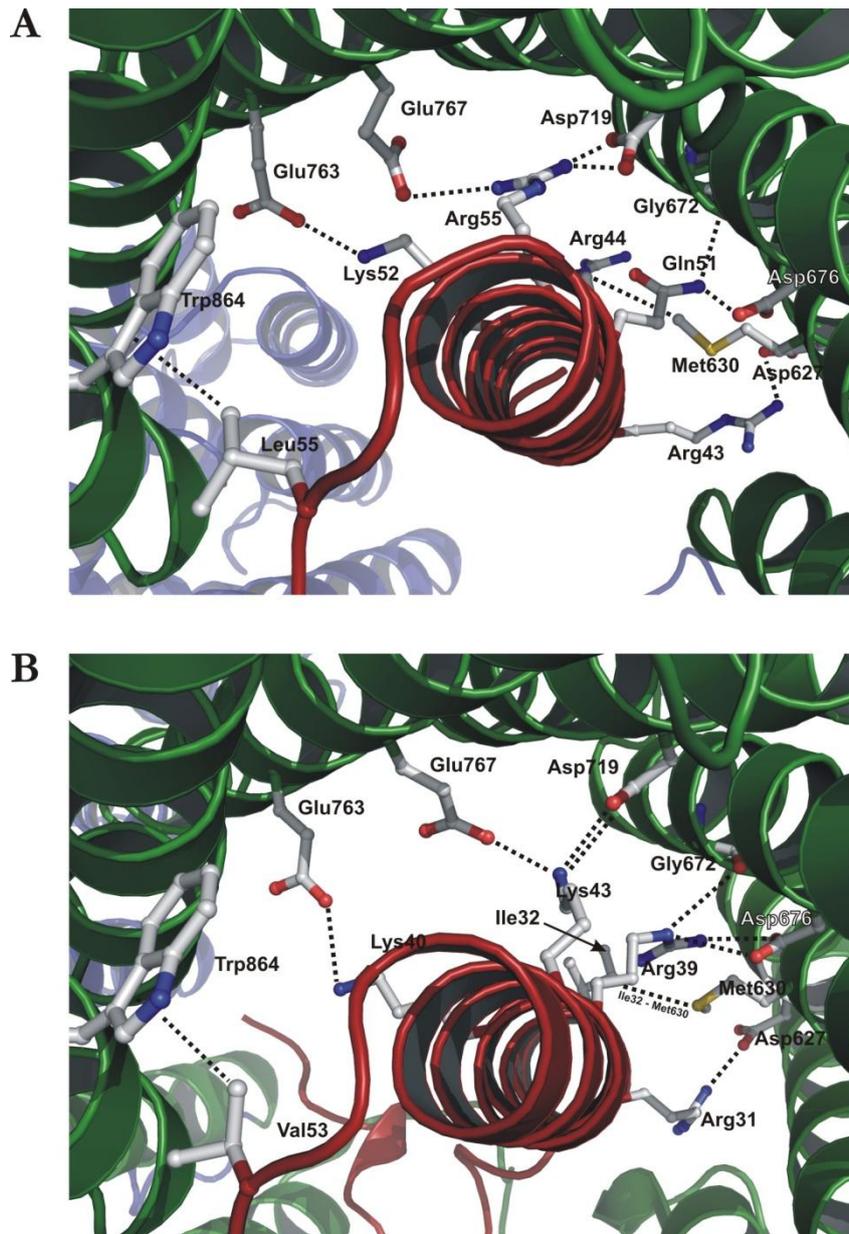


Abb. 41: Darstellung der konservierten Interaktionen zwischen Imp β und den IBB-Domänen von SPN1 und Imp α .

Es sind jeweils diejenigen Interaktionen mit punktierten Linien gezeigt, welche in Bezug auf Funktion, Qualität der Bindungspartner und auf ihre relative Lage zwischen beiden Komplexen konserviert sind. Die involvierten Aminosäureseitenketten sind als Kugel-Stab-Modelle dargestellt, die restlichen Polypeptide im Cartoon-Modus. (A) Konservierte Interaktionen zwischen Imp β und IBB_{SPN1}. (B) Konservierte Interaktionen zwischen Imp β und IBB α . Die konservierte hydrophobe Interaktion zwischen Met630 (Imp β) und Ile32 (IBB α) ist teilweise verdeckt.

3. Ergebnisse

Basierend auf den strukturellen Informationen beider Komplexstrukturen wurden folglich alle vergleichbaren Interaktionen ausgewertet, um einen Struktur-basierten Sequenzvergleich zu ermöglichen (Tab. 4).

Tab. 4: Auswertung vergleichbarer Interaktionen von Imp β /IBB α und Imp β /IBB_{SPN1}

Seitenketten von Imp β , welche mit beiden IBB-Domänen interagieren	Involvierte Seitenketten von IBB _{SPN1} (Interaktionstyp)	Involvierte Seitenketten von IBB _{SPN1} (Interaktionstyp)
Asp627	Arg43 (Salzbrücke)	Arg31 (Salzbrücke) Arg28 (Salzbrücke)
Met630	Arg44 (hydrophob) Arg43 (HBB)	Ile32 (hydrophob)
Gly672	Gln51 (HBB)	Arg39 (HBB)
Asp676	Gln51 (HBB)	Arg39 (Salzbrücke)
Asp719	Arg55 (Salzbrücke)	Lys43 (Salzbrücke)
Leu722	Val59 (hydrophob)	Arg50 (hydrophob)
Glu763	Lys52 (Salzbrücke)	Lys40 (Salzbrücke)
Glu767	Arg55 (Salzbrücke)	Lys43 (Salzbrücke)
Thr770	Val59 (hydrophob)	Gln52 (HBB)
Asp824	Arg63 (Salzbrücke)	Arg49 (Salzbrücke)
Trp864	Leu65 (hydrophob)	Val53 (hydrophob) Arg51 (hydrophob)

Aminosäuren, welche in der Struktur konserviert sind, sind grün dargestellt, solche, die den gleichen Interaktionstyp teilen, aber aufgrund ihrer räumlichen Lage nicht konserviert sind, sind blau, die anderen sind schwarz.

Anhand der in Tab. 4 aufgeführten Daten konnte schließlich der Struktur-basierte Sequenzvergleich der IBB-Domänen von Imp α und SPN1 erstellt werden (Abb. 42). Wie sich dort zeigt, überlagern konservierte Aminosäuren in den N-terminalen Teilen jenseits von Asn39 (IBB α) und Gln51 (IBB_{SPN1}) nicht. Der Grund ist eine Lücke von drei Aminosäuren in der Sequenz von IBB_{SPN1} im Rechner-gestützten Sequenzvergleich. Diese Lücke verursacht eine Rasterverschiebung in Richtung des N-Terminus.

Rechner-gestützter Sequenzvergleich

```
IBB $\alpha$  aa1-54 -----MSTNENANTPAARLHRFKN-KGKDSTEMRRRREVNVELRAKDDQLMK-RRNLS
IBBSPN1 aa1-67 MEELSQLASSFSVSQDLNSTAAPHPRLSQYKSKYSSLEQSEARRR---LLELQSKLDYVNHARRAE
```

Strukturbasierter Sequenzvergleich

```
IBB $\alpha$  aa1-54 -----MSTNENANTPAARLHRFKNKGKDSTEMRRRREVNVELRAKDDQLMKRRNLS
IBBSPN1 aa1-67 MEELSQLASSFSVSQDLNSTAAPHPRLSQYKSKYSSLEQSEARRLLELQSKLDYVNHARRAE
```

Abb. 42: Gegenüberstellung eines Homologie-basierten Sequenzvergleichs zwischen IBB α und IBB_{SPN1} und einem auf der Strukturanalyse basierenden Sequenzvergleich.

Grüne Kästchen zeigen eine volle Konservierung an. Rote Kästchen markieren diejenigen Aminosäuren von IBB α , welche mit der sauren Schleife von Imp β interagieren. Auf die gleiche Weise sind die entsprechenden Aminosäuren von IBB_{SPN1} markiert.

3. Ergebnisse

Die inkorrekte Rasterverschiebung im Rechner-gestützten Homologie-Sequenzvergleich wird besonders bei der Betrachtung von Arg43 und Arg44 (IBB_{SPN1}) sowie Arg31 und Ile32 (IBB_α) deutlich. Diese Aminosäurepaare sind an identischen Interaktionen mit denselben Seitenketten von Impβ beteiligt, überlagern im berechneten Homologievergleich allerdings nicht. Bei einer Überlagerung im Struktur-basierten Sequenzvergleich offenbart sich hingegen eine lückenlose und konstante Verschiebung von 12 Aminosäuren zwischen IBB_α und IBB_{SPN1}. Tatsächlich hat die hier ermittelte Verschiebung der Sequenzen von IBB_α und IBB_{SPN1} einen beachtlichen Effekt auf den Vergleich der N-Termini beider IBB-Domänen (Abb. 42). Diejenigen Aminosäuren von IBB_{SPN1}, für welche eine Interaktion mit der sauren Schleife von Impβ vorhergesagt worden war, erfahren im Struktur-basierten Sequenzvergleich eine Verschiebung um zwei Sequenzpositionen.

Darüber hinaus ist die α -Helix HEAT 12B von Impβ in der Interaktion mit IBB_{SPN1} im Gegensatz zu Impβ/IBB_α nicht involviert. Vielmehr wird ihr Zugang zu IBB_{SPN1} durch das Heraustreten der Helix HEAT 13B aus der konkaven Innenfläche von Impβ blockiert. Dies ist eine weitere, gewichtige Ursache für das Ausbleiben jedweder Beteiligung des N-terminalen Bogens an der Bindung von IBB_{SPN1}. Im Gegensatz dazu bildet IBB_α mit beiden Bögen von Impβ und besonders mit der sauren Schleife im N-terminalen Bogen vielfältige Interaktionen aus. Während also IBB_α die saure Schleife fixiert und so die geschlossene Konformation von Impβ bewahrt, tut dies IBB_{SPN1} nicht.

Damit ist der zuvor im Detail diskutierte Effekt beider IBB-Domänen auf die gesamte Faltung von Impβ evident.

3.3.7 Thermodynamische Analyse der Faltungsvariabilität von Impβ

Es wurde postuliert, daß die gespannte Konformation von Impβ nach der Bindung an ein Substrat, wie sie im Komplex mit IBB_α beobachtet wurde, von einem deutlichen Entropieverlust begleitet wird (Conti et al., 2006; Matsuura & Stewart, 2004). Verglichen mit dieser Interaktion sollte demnach dieser Entropieverlust deutlich geringer ausfallen, wenn Impβ an IBB_{SPN1} bindet, da hier eine geöffnete Konformation vorliegt. Die Freiheitsgrade der Molekülschwingung sind hier also weniger eingeschränkt.

Um diese Hypothese zu verifizieren, wurden sowohl die Interaktion von Impβ mit IBB_{SPN1} als auch die von Impβ mit IBB_α mittels ITC thermodynamisch charakterisiert. Zu diesem Zweck wurden durch Titrationsexperimente (2.2.7) zunächst die Bindungsisothermen von Impβ/IBB_{SPN1} und Impβ₁₂₇₋₈₇₆/IBB_{SPN1} ermittelt. So sollten einerseits die Bindungsparameter der Interaktion zwischen Impβ und IBB_{SPN1} festgestellt werden, andererseits sollte auf diese Weise gezeigt werden, daß das kristallisierte Fragment Impβ₁₂₇₋₈₇₆ die vollständige Bindungsstelle für IBB_{SPN1} umfaßt.

Die Bindungsisothermen beider Titrationsexperimente zeigen, daß in Bezug auf die spezifische Bindung an IBB_{SPN1} kein Unterschied zwischen der Deletionsmutante und Impβ in voller Länge besteht (Abb. 43 A). Die Bindungskonstanten sind nahezu identisch. Beide Proteine binden an IBB_{SPN1} mit vergleichbarer Affinität mit K_D -Werten zwischen 79 nM (Impβ) und 83 nM (Impβ₁₂₇₋₈₇₆). Die Bindungsenthalpien von etwa -43 kJ/mol und die Bindungsentropien von etwa -7 bis -10 J/(K*mol) sind ebenfalls fast identisch. Daraus folgt die volle Funktionalität des kristallisierten Fragmentes.

3. Ergebnisse

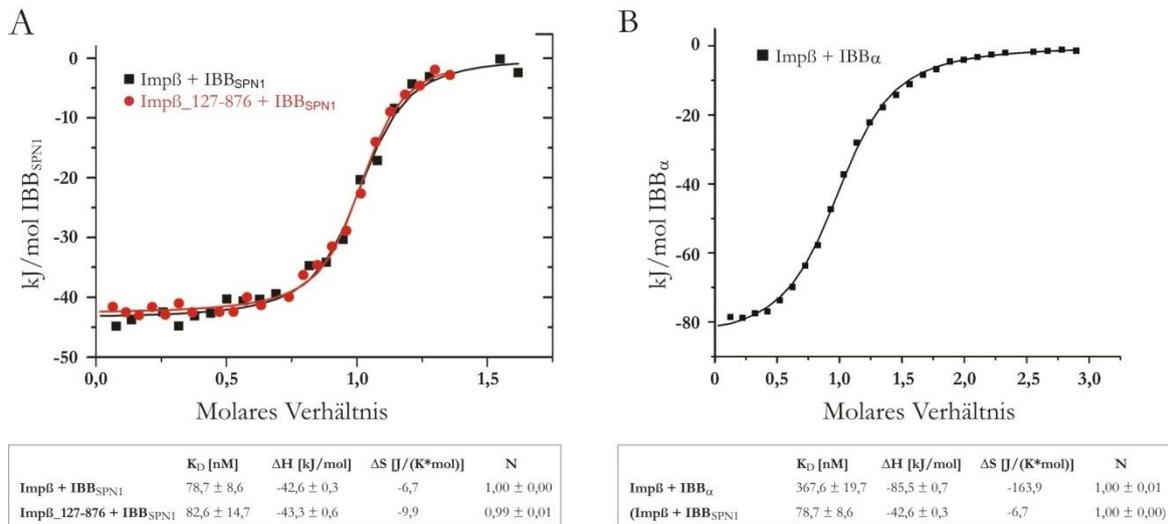


Abb. 43: ITC-Analyse der Interaktion zwischen Impβ und den IBB-Domänen von SPN1 und Impα.

(A) Die Interaktion zwischen Impβ und IBB_{SPN1} ist stark enthalpiegetrieben mit nur marginalen Änderungen der Entropie. Bei dieser Interaktion zeigt das kristallisierte Fragment Impβ_127-876 keine Unterschiede zu Impβ in voller Länge. (B) Die Dissoziationskonstante von Impβ/IBB_α ist mit 367,6 nM deutlich höher als die von Impβ/IBB_{SPN1}. Auch die Bindungsenthalpie ist wesentlich größer. Der signifikante Entropieverlust kompensiert allerdings einen großen Teil der freiwerdenden Wärmeenergie.

Aus der Beziehung zwischen Enthalpie, Entropie und freier Energie folgt:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -42,6 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} + 298 \text{ K} \times 6,7 \frac{\text{J}}{\text{K} \times \text{mol}} = -40,6 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

Demnach ist die Bindung von Impβ an IBB_{SPN1} stark enthalpiegetrieben, die Entropie kompensiert lediglich etwa 5 % der freigesetzten Wärmeenergie.

Die Bindung von Impβ an IBB_α steht im krassen Gegensatz dazu, denn hier kann ein deutlicher Entropieverlust von etwa -164 J/(K*mol) bei der Bindung festgestellt werden. Werden die ermittelten Bindungskonstanten von Impβ/IBB_α in die Gleichung der Gibbs'schen freien Energie eingesetzt, so folgt:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -85,5 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}} + 298 \text{ K} \times 163,9 \frac{\text{J}}{\text{K} \times \text{mol}} = -36,7 \frac{\text{kJ}}{\text{mol}}$$

Obwohl auch diese Interaktion also enthalpiegetrieben ist, so ist doch eine ausgeprägte Enthalpie-Entropie-Kompensation von fast 60 % zu beobachten. Obwohl die Enthalpie bei der Bindung von Impβ an IBB_α um mehr als das Doppelte sinkt als bei der Bindung an IBB_{SPN1}, ist die Kompensation durch den Entropieverlust so groß, daß das Energieniveau von Impβ/IBB_α tatsächlich höher ist als jenes von Impβ/IBB_{SPN1}.

Diese Ergebnisse belegen die Hypothese, daß Konformationsänderungen mit Entropieänderungen einhergehen, und so können also zwei Schlußfolgerungen an dieser Stelle gezogen werden: Erstens ist in Bezug auf die Bindung von IBB_{SPN1} das kristallisierte Impβ-Fragment mit Impβ in voller Länge in jeder Hinsicht vergleichbar (Abb. 43 A), und zweitens äußern sich die Faltungsunterschiede von Impβ je nach gebundener IBB-Domäne in Unterschieden der thermodynamischen Charakteristika und insbesondere der Bindungsentropie.

3. Ergebnisse

Da jedoch die Faltung von Imp β im Komplex mit IBB_{SPN1} an die Faltung seines Orthologes aus *S. cerevisiae*, Kap95p, im Komplex mit RanGDPNP erinnert, wurden schließlich diese beiden Strukturen miteinander verglichen.

3.3.9 Strukturvergleich von Imp β _127-876/IBB_{SPN1} mit Kap95p/RanGDPNP

Der Strukturvergleich von Imp β _127-876/IBB_{SPN1} und Kap95p/RanGDPNP offenbart eine ausgeprägte Ähnlichkeit der Faltung von Imp β beziehungsweise Kap95p in beiden Komplexen (Abb. 45). Dies wird durch die Tatsache gestützt, daß die Standardabweichung aller Atome in vergleichbaren Bereichen lediglich 2,86 Å beträgt, obwohl beide Proteine nur Orthologe sind und sich daher in ihrer Aminosäuresequenz unterscheiden. Dies drückt sich auch in einer nahezu identischen räumlichen Ausdehnung aus. Sie beträgt für Imp β _127-876/IBB_{SPN1} 107 Å, gemessen von Asn141 bis Ala876 (vgl. 3.3.6), und 106 Å für Kap95p/RanGDPNP im vergleichbaren Bereich zwischen Gln146 und Leu861.

Dem entspricht auch die Beobachtung, daß die Gestalten beider Proteine sich ebenso gleichen. In beiden Fällen wird eine offene S-förmige Faltung angenommen. Im Komplex mit IBB α hingegen ist Imp β stark gekrümmt (Abb. 40).

Es ist bemerkenswert, daß sich diese Unterschiede nicht auf die Weite auswirken, die in der Ebene entsteht, welche zur superhelicalen Achse von Imp β orthogonal ist. Die Unterschiede reichen von 74,5 Å (Kap95p/RanGDPNP) bis 77,4 Å (Imp β /IBB_{SPN1}) und sind also minimal.

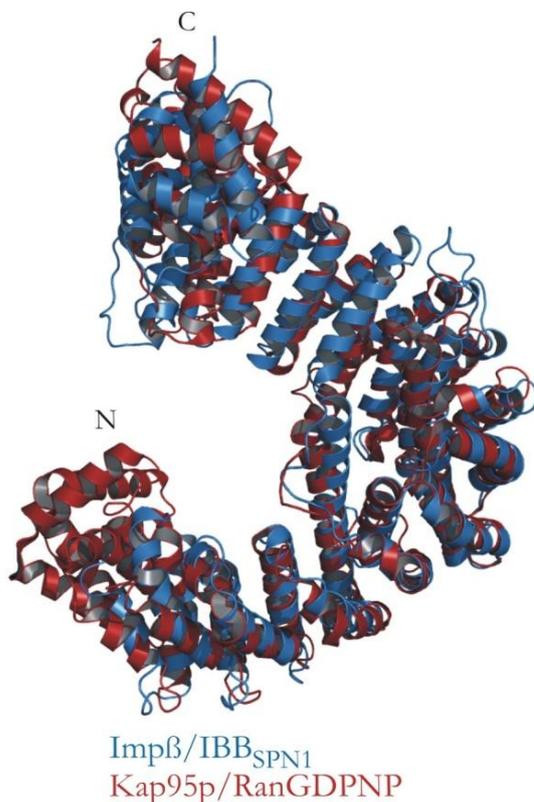


Abb. 45: Strukturvergleich von Imp β _127-876/IBB_{SPN1} und Kap95p/RanGDPNP.

Die Überlagerung erfolgte nach der Methode der kleinsten Fehlerquadrate. Es ist jeweils nur das Importin dargestellt. Die Faltung von Imp β im Komplex mit IBB_{SPN1} ist nahezu deckungsgleich mit derjenigen, welche es im Komplex mit RanGDPNP eingeht. Die Überlagerung zeigt eine fast identische Konformation beider Proteine, lediglich die Position einzelner HEAT-*repeats* direkt am C-Terminus ist teilweise leicht unterschiedlich. Für die Berechnung der Abweichung der einzelnen Atompositionen wurde Kap95p auf einen mit Imp β _127-876 vergleichbaren Bereich beschnitten. Die Standardabweichung der Atompositionen beträgt 2,86 Å. Die Einfärbung der Proteine ist, wie unter der Abbildung angegeben.

3. Ergebnisse

Aus den angeführten, rein morphologischen Vergleichen mit anderen Kristallstrukturen von Imp β (vgl. 3.3.6 und 3.3.8) ist eine große geometrische Ähnlichkeit allein zu Kap95p/RanGDPNP auszumachen. In beiden Komplexen ist die Konformation von Imp β weit geöffnet. RanGTP erreicht dies, indem es beide Bögen von Imp β in der offenen Faltung fixiert, IBB_{SPN1} dagegen, indem es mit dem N-terminalen Bogen überhaupt nicht interagiert und ihm so erlaubt, die energetisch günstigste Konformation einzunehmen. Dies ist diejenige mit der geringsten Spannung, also die offene. Dies wird auch durch die hohe Entropie des Imp β /IBB_{SPN1}-Komplexes belegt (vgl. 3.3.7). Wenngleich also die Ursache für die geöffnete Konformation in beiden Komplexen unterschiedlich ist, so ist der Effekt auf die Faltung von Imp β doch der gleiche. Die Mimikry des RanGTP-gebundenen Zustandes könnte Imp β /IBB_{SPN1} folglich die freie Dissoziation vom NPC ermöglichen.

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurden offene Fragestellungen zweier verschiedener Themengebiete im Kontext des Imp β -abhängigen Kernimports angegangen. Einerseits sollte der Kernimport von H1 Linker Histonen durch Imp β /Imp7 insbesondere in Hinblick auf die Bildung und Dissoziation des H1-Importkomplexes aus Imp β , Imp7 und H1 eingehender charakterisiert werden. Andererseits sollte eine Erklärung für die Ran-GTP unabhängige Freisetzung von U snRNP-Importkomplexen aus Imp β , SPN1 und U snRNPs von der Kernpore formuliert werden. Die experimentellen Ansätze zur Untersuchung beider Kernimportwege waren allerdings unterschiedlich.

Da im Verlauf der vorliegenden Arbeit eine Co-Kristallisation des H1-Importkomplexes nicht gelang, wurden die Charakteristika des H1-Kernimports mit klassischen, biochemischen Methoden und isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) ermittelt (3.1). Dabei konnten mithilfe zahlreicher Deletionsmutanten zum einen die Bindungsstellen von Imp β und Imp7 für verschiedene H1-Subtypen identifiziert werden; zum anderen zeigte sich dabei, daß diese Bindungsstellen für alle getesteten H1-Subtypen identisch sind (3.1.3). Durch die thermodynamische Analyse der H1-Importkomplexbildung konnte weiterhin nachgewiesen werden, daß die hochaffine Interaktion des Imp β /Imp7-Heterodimers mit H1 nicht auf Kooperativität, sondern auf einer allosterischen Aktivierung von Imp7 durch Imp β beruht (3.1.5). Darüber hinaus belegen die vorgestellten Ergebnisse, daß das Imp β /Imp7-Heterodimer nicht durch eine kompetitive Bindung von RanGTP an Imp β dissoziiert wird, sondern daß die Dissoziation des Heterodimers nur in einem relativ engen Konzentrationsbereich von Imp7 erfolgt (3.1.6). Die Notwendigkeit der RanGTP-Bindung an Imp β für die Termination des H1-Kernimports konnte allerdings unterstrichen werden (3.1.7).

Im Focus des zweiten Teils der Arbeit stand ein Kernimportweg, welcher mit dem H1-Kernimport verwandt ist, und dennoch signifikante Unterschiede aufweist: Der Kernimport von spleißosomalen Untereinheiten, den U snRNPs, durch Imp β /SPN1. Auch hier ist Imp β am Transport beteiligt, im Gegensatz zum H1-Kernimport und vor allem auch zum cNLS-Import durch Imp β /Imp α ist die Freisetzung dieses Importkomplexes vom NPC allerdings in diesem Falle unabhängig von der RanGTP-Bindung an Imp β (Huber et al., 2002). Dieses Phänomen wurde kristallographisch durch die Co-Kristallisation eines Imp β -Fragmentes mit der IBB-Domäne von SPN1 und die anschließende Strukturbestimmung dieses Komplexes untersucht (3.3). Bei der Analyse der Struktur von Imp β ₁₂₇₋₈₇₆/IBB_{SPN1} offenbarte sich eine Konformation von Imp β , welche mit keinem der bekannten Imp β /Substrat-Komplexe vergleichbar ist (3.3.6 und 3.3.8). Dies trifft besonders auf den Imp β /IBB α -Komplex zu. Hier zeigen sich große Unterschiede in der Konformation von Imp β im Vergleich mit der Kristallstruktur von Imp β /IBB_{SPN1}. Ein thermodynamischer Vergleich von Imp β /IBB_{SPN1} und Imp β /IBB α mittels ITC konnte schließlich einen Zusammenhang zwischen der Konformation von Imp β und seiner Entropie eindeutig belegen (3.3.7). Auf diese Weise konnte nachgewiesen werden, daß der Imp β /IBB α -Komplex auf einem höheren Energieniveau steht als Imp β /IBB_{SPN1}. Bei weiteren Strukturvergleichen wurde schließlich festgestellt, daß die Konformation von Imp β im Komplex mit IBB_{SPN1} nahezu identisch ist mit der Konformation von Imp β im RanGTP-gebundenen Zustand (3.3.9).

4.1 Thermodynamik des H1-Kernimports

Im Kernimport von H1 Linker Histonen sind die Assoziation des H1-Importkomplexes im Cytoplasma und seine Dissoziation auf der karyoplasmatischen Seite des NPC zentrale Ereignisse. Aus diesem Grunde wurden hier diese beiden Schritte thermodynamisch analysiert. Diese Analyse sollte eine energetische Charakterisierung der Substratbindung und der abschließenden Substratfreisetzung ermöglichen. Dabei sollte auch ergründet werden, warum es Importinen wie Imp β und Imp7 möglich ist, in verschiedenen Importwegen als aktive Transporter zu agieren und dabei auf die jeweiligen Erfordernisse der entsprechenden Substrate zu adaptieren.

4.1.1 Kartierung der Bindungsstellen im H1-Importkomplex

Für die thermodynamische Analyse der H1-Importkomplexbildung war es notwendig, zunächst die gegenseitigen Bindungsstellen der einzelnen Komponenten dieses Komplexes zu identifizieren. Zu diesem Zweck wurde eine Vielzahl von Deletionsfragmenten sowohl von Imp β als auch von Imp7 generiert. Dabei stellte sich das Fehlen einer Kristallstruktur von Imp7 als nachteilig heraus, da die Deletionen so nur aufgrund von Sekundärstrukturvorhersagen geplant werden konnten. Damit ist wohl zu begründen, warum die Mehrzahl der klonierten Fragmente sich nicht in der nötigen Ausbeute und Reinheit gewinnen ließen (vgl. 3.1.1.2 und Abb. A1 im Anhang).

Da für die Konstruktion von Imp β -Fragmenten die Strukturinformation einer bereits existenten Kristallstruktur des Vollängenproteins genutzt werden konnte, wurden mit Imp7 vergleichbare Schwierigkeiten bei der Reinigung der klonierten Imp β -Fragmente nicht beobachtet, die meisten ließen sich gut präparieren (vgl. 3.1.1.1). Dies unterstreicht die Wichtigkeit einer genauen Kenntnis der dreidimensionalen Struktur eines Proteins bei der Planung von Deletions- und auch Punktmutanten. Die schließlich präparierten Fragmente beider Importine reichten jedoch trotz der aufgeführten Schwierigkeiten für die geplanten Kartierungsexperimente aus.

In der Folge konnten die gegenseitigen Bindungsstellen in *pull-down*-Experimenten und Interaktionsstudien mittels Gelfiltrationschromatographie ermittelt werden. Dabei konnten nicht nur die bereits bekannten Bindungsstellen von Imp β für Imp7 und H1⁰ (Jäkel et al., 1999) sowie die Bindungsstelle von Imp7 für Imp β (Bäuerle et al., 2002) verifiziert werden, sondern auch die Bindungsstellen beider Importine für verschiedene H1-Subtypen identifiziert werden (vgl. 3.1.2 und 3.1.3). Die Tatsache, daß sowohl auf Imp β als auch auf Imp7 die Bindungsstellen für verschiedene H1-Subtypen untereinander identisch sind, deutet einen allgemeinen H1-Importweg an. Die Beteiligung der sauren Schleifen von Imp7 (AS 882-912 und AS 927-957) und Imp β (Schleife zwischen HEAT 8A und B, AS 333-343) an der H1-Bindung ist in diesem Zusammenhang ein gewichtiges Argument für die cytosolische Chaperonaktivität beider Importine neben ihrer Funktion als Transportrezeptoren.

Bei der Kartierung der Bindungsstellen konnte interessanterweise ein signifikanter Unterschied in der räumlichen Organisation der jeweiligen Bindungsstellen auf Imp β und Imp7 festgestellt werden. Während auf Imp β die Bindungsstellen für Imp7, H1 und RanGTP ineinander verschachtelt sind und in ihrer aufsteigenden Größe an Matroschka-Puppen erinnern, so sind hingegen die Bindungsstellen auf Imp7 strikt seriell angelegt (vgl. Abb. 20). Diese im Fall von Imp7 zunächst auf die Primärstruktur beschränkte Aussage läßt sich auf die Tertiärstruktur des Proteins übertragen, da

Imp7 als Protein der Imp β -Superfamilie aus aufeinanderfolgenden HEAT-*repeats* zusammengesetzt ist und höchstwahrscheinlich wie Imp β als Superhelix vorliegt. Daraus kann also die Schlußfolgerung gezogen werden, daß auf der Ebene ganzer HEAT-*repeats* die Aminosäuresequenz in ihrer Abfolge auch der tatsächlichen, räumlichen Anordnung in der Proteinstruktur entspricht.

Daher wurde zunächst angenommen, daß der postulierte Affinitätsanstieg zu H1 nach der Heterodimerisierung von Imp β und Imp7 (Bäuerle et al., 2002; Jäkel et al., 1999) durch eine Konformationsänderung von Imp β verursacht sein könnte.

4.1.2 Thermodynamik der H1-Importkomplexbildung

Um dies zu verifizieren, wurden in der ITC-Analyse zuerst die energetischen Charakteristika der Heterodimerisierung von Imp β und IBB₇ erfaßt. Die Experimente zeigten, daß dieser Prozeß enthalpiegetrieben ist (3.1.5.1). Daneben konnte ein deutlicher Entropieverlust bei der Bindung beobachtet werden. Wie später für Imp β /IBB _{α} demonstriert werden konnte (3.3.7), könnte ein solcher Entropieverlust mit einer Konformationsänderung von Imp β korrelieren, und zwar mit der Einnahme einer gedrungenen und geschlossenen Konformation. Dies deutet auf die Speicherung von Lageenergie hin, wie sie auch in einer aufgezogenen Feder beobachtet werden kann. Man könnte also auch von einer Federspannung von Imp β sprechen. Die Verknüpfung der Entropie mit der Konformation von Imp β ist bereits früher postuliert worden, allerdings ohne experimentellen Befund (Conti et al., 2006; Matsuura & Stewart, 2004).

Diese Hypothese wird bei der Betrachtung der H1-Bindung durch Imp β /Imp7 umso bedeutsamer, da diese Interaktion entropiegetrieben ist (3.1.5.2). Warum aber ist eine solche Entropiesteigerung für die H1-Bindung überhaupt erforderlich? Zur Beantwortung dieser Frage ist es hilfreich, sich vor Augen zu halten, daß Linker Histone stark geladene Moleküle sind (Jäkel et al., 2001). So beträgt die Nettoladung von H1⁰ beispielsweise +58. Als Konsequenz daraus ergibt sich die Bindung großer Mengen an Salzionen auf der Oberfläche. Bei der Bindung der stark negativ geladenen Importine werden diese Salzionen freigesetzt. Dies äußert sich augenblicklich in einem Anstieg der Entropie des Systems. An dieser Stelle könnte die Freisetzung eines Teiles der potentiellen Energie in Imp β in Form von Entropie unterstützend wirken. Der Schluß liegt also nahe, daß die enthalpisch ungünstige Bindung von Imp β /Imp7 an H1 durch die Freisetzung der in Imp β gespeicherten Entropie in einen ausgeglicheneren Prozeß umgewandelt wird. Ob dies jedoch tatsächlich der Fall ist, oder ob die Entropiespeicherung in Imp β vielmehr für die RanGTP-vermittelte Dissoziation des H1-Importkomplexes benötigt wird, muß vorerst unklar bleiben. Wurde jedoch dieser Speicherzustand von Imp β durch Komplexbildung mit IBB₇ induziert, so konnte eine begünstigte Bindung an H1 nicht festgestellt werden (vgl. 3.1.5.3 und Abb. 25 A). Eine Speicherung bis zur Bindung von RanGTP an Imp β ist daher wahrscheinlich. Vermutlich also wird die potentielle Energie von Imp β erst später freigesetzt. Mit Sicherheit aber begünstigt die Ladungskompensation auf der H1-Oberfläche durch die Importine thermodynamisch die Bindung, da sie als Voraussetzung für die Freisetzung der Salzionen und damit für den Entropiegewinn angesehen werden kann. Der in der ITC beobachtete Affinitätsanstieg von Imp β /Imp7 nach der Heterodimerisierung konnte damit aber nicht schlüssig erklärt werden. Es konnte lediglich ausgeschlossen werden, daß Imp β durch die Bindung an Imp7 eine gesteigerte Affinität zu H1 aufweist.

Wie sich daher wenig überraschend in der thermodynamischen Charakterisierung der Bildung des H1-Importkomplexes zeigte, ist nicht Imp β das aktivierte Protein, sondern Imp7 (vgl. 3.1.5.3).

4. Diskussion

Aufgrund der räumlichen Trennung der IBB-Domäne (1008-1038) von Imp7 und seiner H1-Bindungsstelle (665-1001) muß diese Aktivierung außerdem allosterischer Natur sein und geht wahrscheinlich mit einer Konformationsänderung einher. Die Substraterkennung durch Imp7 könnte in diesem Fall also mit einem sogenannten *induced-fit*-Mechanismus erfolgen. Ein solcher Mechanismus konnte schon für mehrere Proteine der Imp β -Superfamilie gezeigt werden (beleuchtet in Conti et al., 2006).

Daher ist es wahrscheinlich, daß Imp7 nach der Heterodimerisierung mit Imp β strukturelle Veränderungen eingeht, welche diesen *induced-fit*-Mechanismus der H1-Bindung erlauben. Es wäre demnach naheliegend, daß sich eine solche strukturelle Änderung in Änderungen der Molekürentropie äußert. In einem ITC-Experiment, in welchem Imp7 mit Imp β titriert wurde, ist dies im Vergleich mit Imp β /IBB₇ jedoch nicht unmittelbar zu erfassen (Abb. 46).

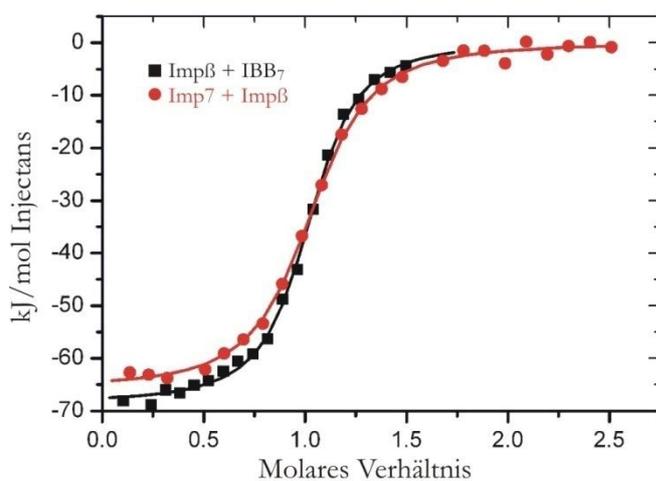


Abb. 46: ITC-Analyse der Bindung von Imp β an IBB₇ und Imp7 in voller Länge.

Die Konstanten der Bindung von Imp β an Imp7 unterscheiden sich nicht signifikant von denen der Bindung von Imp β an die IBB-Domäne von Imp7, mit der Ausnahme, daß das kurze Fragment IBB₇ mit höherer Affinität bindet. Die übrigen Parameter gleichen sich im Rahmen des Fehlers. Insbesondere die Entropieänderungen unterscheiden sich nur sehr marginal mit $\Delta S = -92,8 \text{ J}/(\text{K}\cdot\text{mol})$ für Imp β /IBB₇ und $\Delta S = -91,1 \text{ J}/(\text{K}\cdot\text{mol})$ für Imp β /Imp7.

	K_D [nM]	ΔH [kJ/mol]	ΔS [J/(K*mol)]	N
Imp β + IBB ₇	$70,9 \pm 5,2$	$-68,4 \pm 0,5$	-92,8	$1,00 \pm 0,00$
Imp7 + Imp β	$178,6 \pm 13,0$	$-65,7 \pm 0,5$	-91,1	$1,00 \pm 0,01$

Vielmehr sind bis auf einen Unterschied in der Affinität, welche für Imp7 in voller Länge geringer ist, die Bindungskonstanten in beiden Experimenten identisch. Allerdings läßt sich damit eine Änderung des Entropiestatus von Imp7 auch nicht ausschließen, da in der ITC nur die Gesamtentropie des Systems gemessen werden kann. Eine direkte Rückführung einer Entropieänderung auf die Konformationsänderung eines Moleküls ist daher nur in Verbindung mit strukturellen Informationen zulässig. Andererseits verdeutlicht besonders die geringere Affinität von Imp β zu Imp7 im Vergleich mit dem kurzen Fragment IBB₇, daß Affinitätsänderungen nicht notwendigerweise mit Änderungen der Bindungsenthalpien oder -entropien korrelieren müssen. Dies ist bei der Betrachtung der allosterischen Aktivierung von Imp7 durch Imp β von besonderer Wichtigkeit, da hier ebenfalls trotz deutlich erhöhter Affinität keine signifikanten Änderungen der anderen Parameter zu beobachten waren (vgl. 3.1.5.3). Die Lage der Bindungsenthalpie und -entropie von Imp β /Imp7/H1 im arithmetischen Mittel von (Imp β)₂/H1 und (Imp7)₂/H1 unterstützt diese Argumentation (vgl. 3.1.5.2 und Abb. 24).

Eine Konformationsänderung von Imp7 nach der Heterodimerisierung mit Imp β kann also argumentativ nicht entkräftet werden, im Gegenteil: Eine ausgeprägte strukturelle Flexibilität konnte

4. Diskussion

bisher für mehrere Mitglieder der Imp β -Superfamilie demonstriert werden (Fukuhara et al., 2004). In dieser Studie wurde über *small angle X-Ray scattering* (SAXS) die Flexibilität einiger Karyopherine in Lösung visualisiert (Abb. 47). Ursächlich ist wahrscheinlich ein weiteres Mal die einzigartige Periodizität der HEAT-*repeats*, welchen untereinander aufgrund der dazwischen liegenden Verbindungsschleifen immer etwas Beweglichkeit erlaubt ist. Allerdings ist in dieser Studie die Struktur von Imp β /RanGTP in Lösung irrtümlich nicht in voller Länge bestimmt worden, da als Modell die Struktur des N-terminalen Bogens (AS 1-462) im Komplex mit RanGTP (Vetter et al., 1999) verwendet worden war.

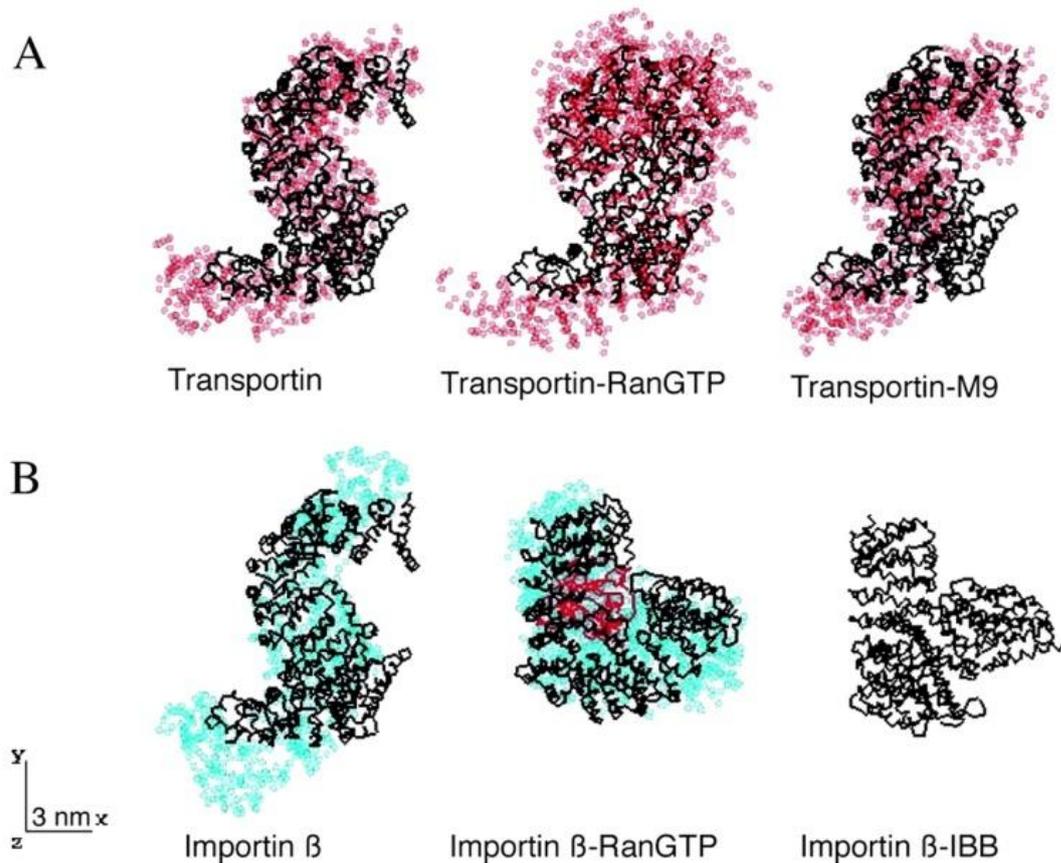


Abb. 47: Konformationen von Transportin (Trn1) und Imp β in ungebundenem, Ran-GTP-gebundenem und substratgebundenem Zustand.

(A) Trn1. SAXS-*ab-initio*-Rekonstruktionen von ungebundenem (links), Ran-GTP-gebundenem (Mitte) und M9-gebundenem Transportin (rechts) sind in rot dargestellt und zeigen alle eine ähnliche Gestalt. In der Mitte ist in schwarz die Kristallstruktur von Ran-GTP-Transportin darüber gelegt, links und rechts jeweils die Kristallstruktur von ungebundenem Transportin. (B) Imp β . SAXS-*ab-initio*-Modelle von ungebundenem (links) und Ran-GTP-gebundenem (Mitte) Imp β sind in grün dargestellt. Die korrespondierenden Kristallstrukturen sind jeweils in schwarz darüber gelegt. Rechts ist die Kristallstruktur von Imp β -IBB α (IBB α = Importin- β -bindende Domäne von Imp α) als Referenz abgebildet. Der Vergleich von freiem Imp β mit der Kristallstruktur von Imp β /IBB α (Cingolani et al., 1999) verdeutlicht einen großen Unterschied in der jeweiligen Konformation von Imp β . Der in der Studie von Fukuhara et al. gezogene Vergleich mit der Kristallstruktur von Imp β _1-462/RGDPNP (Mitte unten, Vetter et al., 1999) ist allerdings nicht zulässig, da in der angegebenen Kristallstruktur nur der N-Terminus von Imp β vorhanden ist und damit ein Konformationsvergleich nicht möglich ist. Weiterhin sind in dieser Abbildung wesentlich mehr HEAT-*repeats* dargestellt, als tatsächlich kristallisiert wurden. Die gezeigte Kristallstruktur existiert also nicht. Interessanterweise ist die Referenzstruktur von Imp β /IBB α (rechts) in einer Orientierung abgebildet, welche eine Ähnlichkeit zu Imp β _1-462/RanGDPNP (Mitte) implizieren soll, obwohl später gezeigt werden konnte, daß sie deutliche Unterschiede aufweisen (Lee et al., 2005). Abb. entnommen aus Fukuhara et al., *J. Biol. Chem.*, 2004.

Weiterhin wurde kürzlich in einer vergleichenden Analyse von dreidimensionalen Strukturen von HEAT-*repeat*-Proteinen die Hypothese geäußert, daß jene Proteine ihre strukturelle Flexibilität nutzen könnten, um die nötigen Energien der Komplexierung mit Substraten und auch der Dissoziation auszugleichen (Conti et al., 2006). Die Autoren nahmen an, daß eine Verformung dieser Proteine durch eine *induced-fit*-Substratbindung Lageenergie wie bei einer gespannten Feder generieren könnte. Diese Lageenergie könnte später dazu genutzt werden, die Dissoziation solcher Komplexe durch eine relativ kleine Energiemenge zu ermöglichen, wie sie die Hydrolyse von RanGTP bereitstellt. Dazu soll später bei der Diskussion der Kristallstruktur von Imp β _127-876 im Komplex mit IBB_{SPN1} mehr gesagt werden.

Zusammenfassend bieten die hier vorgestellten Ergebnisse eine erste experimentelle Basis für die zuvor geäußerten Hypothesen, da sie die Speicherung von Lageenergie in der Form von Entropie im Imp β /Imp7-Heterodimer experimentell belegen konnten. Darüber hinaus implizieren die Ergebnisse eine allgemeine Strategie von Karyopherinen der Imp β -Familie, energetische Barrieren bei der Bindung anspruchsvoller Substrate wie H1 durch Dimerisierung zu überwinden: Da ein Dimer eine große Fläche anbietet, welche komplementär zum negativ geladenen Substrat ist, wird eine massive Freisetzung von Salzionen von der Substratoberfläche ermöglicht. Der resultierende Entropiegewinn senkt schließlich die Energiebarriere so dramatisch ab, daß die Bindung energetisch überhaupt erst möglich wird (vgl. 3.1.5.2).

4.1.3 Die Dissoziation des H1-Importkomplexes durch RanGTP

In einem Vergleich der Bindungsmodi verschiedener Substrate wie dem mit dem Parathyroid-Hormon verwandten Protein PTHrP oder Imp α an Imp β fällt eine besondere Eigenschaft von Imp β ins Auge: Es ist in der Lage, die Bindungsstellen seiner Interaktionspartner zur Ausbildung von Sekundärstrukturelementen zu zwingen, welche im Imp β -freien Zustand nicht vorhanden sind. So bildet ein Teil des N-Terminus von PTHrP bei der Bindung an Imp β einen β -Strang aus (Cingolani et al., 2002), die IBB-Domäne von Imp α nimmt bei der Bindung dagegen die Konformation einer α -Helix an (Cingolani et al., 1999). Die IBB-Domäne von Imp α hat darüber hinaus vor der Bindung an Imp β eine autinhibitorische Funktion. Diese Eigenschaft von IBB α wurde auch bei IBB₇ vermutet, damit könnte der Konformationsschalter von Imp7 erklärt werden. Dies konnte jedoch später ausgeschlossen werden, da Imp7 ohne diese Domäne im Einzelrezeptorimport von rpL23a voll aktiv ist (Bäuerle et al., 2002). Diese Ergebnisse konnten in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden (vgl. 3.1.4). Die thermodynamischen Daten unterstützen diese Experimente und konnten eine Autinhibition auch im H1-Import ausschließen (vgl. 3.1.5.3).

Daraus wird die einzigartige Stellung von IBB₇ innerhalb der bislang identifizierten IBBs ersichtlich. Ihre Funktion scheint allein in der Übertragung der Aktivierung durch Imp β auf das restliche Imp7-Molekül vor der H1-Bindung zu liegen. Diese Vermutung wird durch das Fehlen jeglicher Ähnlichkeit zu anderen IBB-Domänen bestärkt (Abb. 48).

4. Diskussion

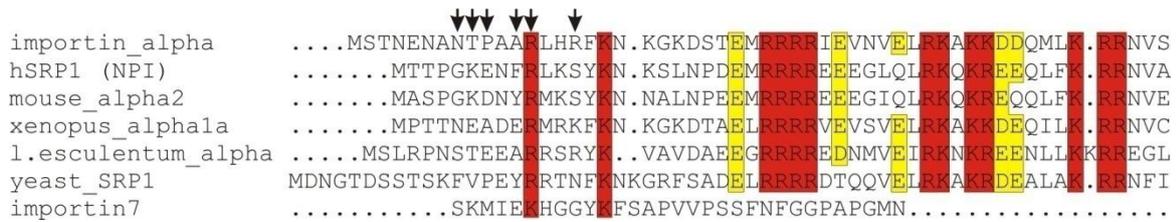


Abb. 48: Homologievergleich verschiedener IBB-Domänen.

Während die meisten IBB-Domänen hohe Ähnlichkeiten aufweisen, gilt dies nicht für die IBB-Domäne von Imp7. Lediglich zwei Lysine und eine aromatische Aminosäure, das Tyrosin vor dem zweiten, markierten Lysin sind konserviert. Der übrige Bereich von IBB7 zeigt keine Ähnlichkeit mit anderen IBB-Domänen. Konservierte, basische Reste sind rot hinterlegt, konservierte, saure Reste sind gelb. Pfeile markieren diejenigen Aminosäuren von Imp α , welche mit der sauren Schleife von Imp β interagieren. Modifiziert nach Cingolani et al., *Nature*, 1999.

Ein direkter Homologievergleich zeigt, daß gerade in jener Region von IBB7, welche mit der sauren Schleife von Imp β interagieren könnte, nur ein Lysin konserviert scheint, alle anderen Aminosäuren unterscheiden sich deutlich. Jenseits dieses Bereiches gibt es keinerlei Übereinstimmungen mehr. Tatsächlich finden sich hier, ganz im Gegensatz zu IBB α , keinerlei geladene und nur sehr wenige polare Seitenketten. Dies legt eine Interaktion mit Imp β nahe, welche sich fundamental von derjenigen von IBB α und Imp β unterscheidet.

Vermutlich ist es genau diese Andersartigkeit von IBB7, welche eine gleichzeitige Bindung von Imp7 und RanGTP an Imp β ermöglicht, wenngleich auch die Affinität reduziert ist (vgl. 3.1.6). Dies widerlegt die Annahme, daß die Bindung von RanGTP und Imp7 an Imp β sich gegenseitig in Analogie zu Imp α ausschließen (Bäuerle et al., 2002; Jäkel et al. 1999, Jäkel & Görlich, 1998).

Allerdings legen die Entropieunterschiede zwischen Imp β /IBB7 und RanGTP/Imp β /IBB7 (vgl. 3.1.6) strukturelle Änderungen des Imp β /IBB7-Komplexes in Anwesenheit von RanGTP nahe. Da RanGTP Imp β in einer geöffneten Konformation der Superhelix fixiert, könnte mit der Bindung von RanGTP/Imp β an IBB7 eine Erweiterung der Freiheitsgrade der gegeneinander beweglichen Teile von Imp β einhergehen (vgl. 1.4). Es darf in diesem Zusammenhang jedoch nicht vergessen werden, daß das Energieniveau dieses Komplexes deutlich höher liegt als in Abwesenheit von RanGTP (3.1.6), seine Bildung also energetisch ungünstiger ist. Außerdem muß die Konzentration an freiem Imp7 deutlich über 0,5 μ M liegen, um die Bildung des ternären Komplexes zu ermöglichen, bei niedrigeren Konzentrationen ist RanGTP in der Tat in der Lage, daß Imp β /Imp7-Heterodimer zu dissoziieren. Eine erschöpfende Erklärung hierfür kann wohl nur eine Kristallstruktur erbringen.

Es kann jedoch festgestellt werden, daß der vorgeschlagene kompetitive Verdrängungsmechanismus für die Imp7-Freisetzung, wie er für Imp β /Imp α formuliert wurde (Cingolani et al., 1999), in diesem Falle nicht zutreffen kann. Dagegen deuten die hier vorgestellten Ergebnisse eher in die Richtung einer allosterischen Regulation, da nach der Bindung von RanGTP an Imp β offenbar keine Interaktionsflächen für Imp7 verloren gehen, sie sind lediglich etwas schwerer zugänglich (3.1.6, Abb. 28). Ein klares Indiz hierfür ist die unveränderte Bindungsenthalpie von je etwa -70 kJ/mol.

Diese Vermutung ist in Übereinstimmung mit neueren Erkenntnissen, welche aus der Analyse der Kristallstruktur von Kap95p, einem Imp β -Ortholog aus *S. cerevisiae*, und dem nicht-hydrolysierbaren RanGTP-Analogon RanGDPNP gewonnen wurden (Lee et al., 2005). Dort wurde ebenfalls ein allosterischer Mechanismus der Imp α -Freisetzung postuliert. Die Autoren vermuteten einen Mechanismus an, in welchem die initiale Bindung von RanGTP an den N-Terminus von Imp β den N-Terminus von IBB α zunächst kompetitiv verdrängt. Dies zieht eine Konformationsänderung von

4. Diskussion

Imp β nach sich. In der Folge öffnet sich die Interaktionsfläche zwischen Imp β und Imp α wie ein Reißverschluß, und Imp α wird schließlich allosterisch freigesetzt (Abb. 49).

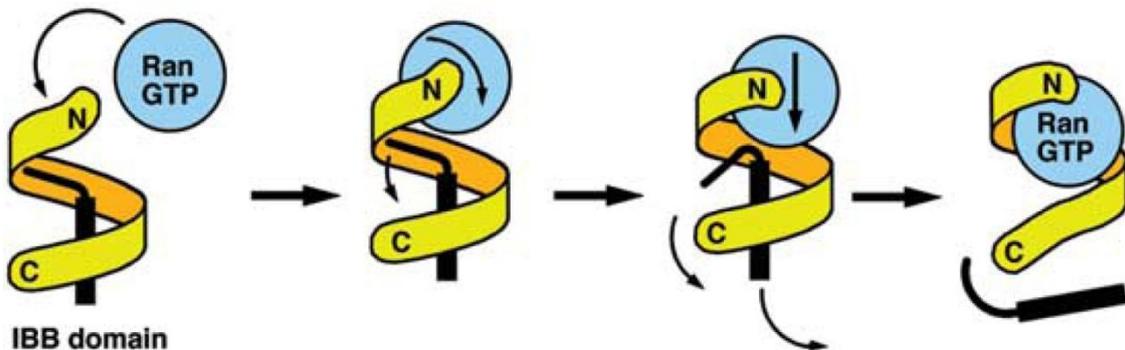


Abb. 49: Möglicher allosterischer Mechanismus der Imp α -Freisetzung von Kap95p durch RanGTP.

Kap95p ist in gelb dargestellt, RanGTP in blau, IBB α in schwarz. Ein ungefalteter, L-förmiger Teil von IBB α bindet an die HEAT-repeats 7-11 von Kap95p, das α -helicale Segment bindet an die HEAT-repeats 12-19. RanGTP bindet zunächst an den N-Terminus von Kap95p und verdrängt nun kompetitiv den ungefalteten Teil von IBB α von der sauren Schleife von Kap95p. Die folgende Bindung von RanGTP an den C-terminalen Bogen von Kap95p erweitert nun die Öffnung des Bogens. Dadurch kommt es zu einer Verschiebung der Seitenketten, welche mit IBB α interagieren. Der IBB-Domäne stehen nun die nötigen, komplementären Seitenketten nicht mehr zur Verfügung, sie wird freigesetzt. Entnommen aus Lee et al., *Nature*, 2005.

Im Kontext der Chaperonaktivität von Imp β und Imp7 wird die RanGTP-vermittelte Dissoziation des ternären Imp β /Imp7/H1-Importkomplex nach der Passage der Kernpore umso bedeutsamer, denn nicht nur Imp β , sondern auch Imp7 kann RanGTP mit hoher Affinität (~ 15 nM) binden (Görlich et al., 1997). Daher drängt sich die Frage auf, ob nach der RanGTP-vermittelten Dissoziation des H1-Importkomplexes in Imp β /RanGTP und Imp7/H1 dieser mögliche Imp7/H1-Komplex ebenfalls noch am *nuclear basket* dissoziiert wird. Die reduzierte Affinität von Imp7 zu H1 in Abwesenheit von Imp β (vgl. 3.1.5.2) unterstützt eine solche Annahme. In diesem Falle aber könnte keines der Importine als karyoplasmatisches Chaperon für H1 dienen. Stattdessen wären weitere Chaperone im Nucleus erforderlich, um eine sichere Passage des Histons zum Chromatin zu gewährleisten. Und in der Tat konnten bislang einige Histon-Chaperone identifiziert werden, welche besonders während der Transkription eine wichtige Rolle in der Abschirmung der Histone übernehmen (ausführlich erörtert in Tyler, 2002). Der RanGTP-vermittelten H1-Freisetzung von Imp7 widerspricht allerdings der Befund, daß auch die Ran-bindungsdefekte Deletionsmutante Imp7₅₉₈₋₁₀₃₈ einen effizienten H1-Import vermitteln kann (vgl. 3.1.7). Vermutlich also wird die H1-Freisetzung von Imp7 nicht durch die Interaktion mit RanGTP ausgelöst, sondern durch ein karyoplasmatisches Histon-Chaperon. Wie in *in-vitro*-Kernimportexperimenten mit anschließender Immunofluoreszenzfärbung gezeigt werden konnte, ist also die Funktion von RanGTP in Bezug auf Imp7 im H1-Import wahrscheinlich auf die Gewährleistung des Wiedereintritts von Imp7 in das Cytoplasma beschränkt (vgl. 3.1.7 und Abb. 31).

4.1.4 Schlußfolgerungen

Wie ausführlich dargestellt wurde, konnten also wichtige Erkenntnisse über die Mechanismen des H1-Imports gewonnen werden. Sie sind zusammenfassend in Abb. 50 dargestellt.

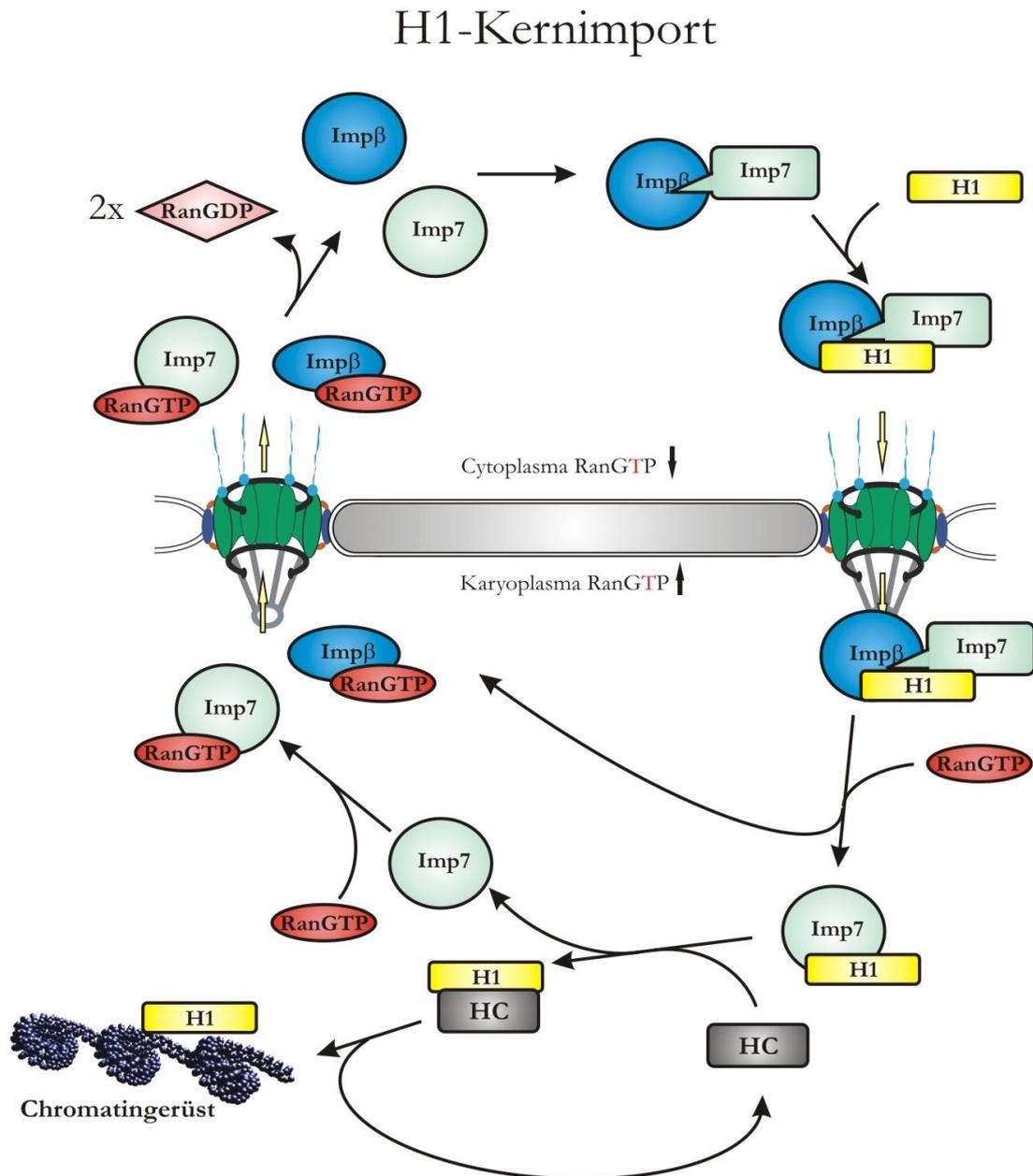


Abb. 50: Modell des Kernimports von H1 Linker Histonen.

Der H1-Kernimport beginnt mit der Heterodimerisierung von Imp β und Imp7. Dabei wird Imp7 für die H1-Bindung allosterisch aktiviert. Nach der Bindung von H1 transloziert der ternäre Importkomplex durch den NPC. Am nuclear basket folgt die RanGTP-vermittelte Dissoziation des Komplexes in Imp β /RanGTP und Imp7/H1. Imp7 wird dabei allosterisch von Imp β verdrängt und verliert seinen Aktivierungsstatus. Anschließend wird H1 von Imp7 an ein Histon-Chaperon (HC) übergeben, welches H1 zum Chromatin transportiert. Damit Imp7 in das Cytoplasma zurückkehren kann, muß RanGTP an Imp7 binden. Beide Importine kehren im Ran-gebundenen Zustand in das Cytoplasma zurück und stehen damit für einen neuen Importzyklus zur Verfügung.

4. Diskussion

Der Kernimport von Linker Histonen wird in seinen zwei wichtigsten Schritten allosterisch reguliert, nämlich in der Substraterkennung durch das Imp β /Imp7-Heterodimer und in der Dissoziation des ternären H1-Importkomplexes nach der Passage der Kernpore durch RanGTP.

Darüber hinaus offenbaren sich insbesondere bei der Substraterkennung thermodynamische Gründe für das Erfordernis eines Importrezeptordimers, denn nur die gemeinsame, komplementär zu H1 geladene Bindungsfläche von Imp β /Imp7 kann die Entropiesteigerung gewährleisten, welche für die H1-Bindung nötig ist. In diesem Sinne wandelt das Imp β /Imp7-Heterodimer die H1-Bindung von einem thermodynamisch unmöglichen in einen energetisch günstigen Prozeß um. Damit kann auch erklärt werden, wann beide Importine auch im Einzelrezeptorimport, z. B. von kleinen, ribosomalen Proteinen, aktiv sein können, nämlich immer dann, wenn die Bindungsfläche eines einzelnen Importins für den Entropieantrieb der Substratbindung ausreichend ist.

4.2 Strukturelle Basis für die RanGTP-unabhängige Freisetzung von U snRNP-Importkomplexen von der Kernpore

Der große Unterschied von U snRNP-Importkomplexen im Vergleich mit anderen Imp β -abhängigen Kernimportwegen, wie zum Beispiel dem cNLS-Import oder dem in dieser Arbeit bereits analysierten H1-Import, besteht in der RanGTP-Unabhängigkeit der Freisetzung vom *nuclear basket*. Wie bereits dargelegt wurde (1.3) wird diese besondere Eigenschaft durch die Interaktion von Imp β mit der IBB-Domäne von SPN1 (IBB_{SPN1}) vermittelt. Eine strukturelle Erklärung konnte dafür allerdings bislang nicht geliefert werden. Daher war die Strukturbestimmung des Komplexes aus Imp β und IBB_{SPN1} auf atomarer Ebene über die Röntgenkristallographie ein weiteres, wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit. In Kombination mit der Analyse des H1-Imports sollten so tiefere Erkenntnisse über die Energetik des Imp β -abhängigen Kernimports erarbeitet werden.

4.2.1 Kristallisation und Strukturbestimmung von Imp β im Komplex mit IBB_{SPN1}

Die Kristallisation von Imp β im Komplex mit IBB_{SPN1} (SPN1_1-65) war in großem Maße abhängig von der Wahl des richtigen Imp β -Deletionskonstruktes. Als geeignet zeigte sich alleine Imp β _127-876, andere Fragmente und auch Imp β in voller Länge ließen sich nicht kristallisieren (vgl. 3.3.1).

Da zu Beginn jedoch lediglich Sphärolithe des Komplexes aus Imp β _127-876 und IBB_{SPN1} gewonnen werden konnten, mußte die Kristallisationsbedingung so optimiert werden, daß Einkristalle wachsen konnten. Dabei erwies sich die Änderung der Kristallisationstemperatur von 20 °C auf 10 °C als unabdingbar. Obwohl nun Einkristalle mit hoher Reproduzierbarkeit präpariert werden konnten, wurde ein für die Datensammlung ausreichendes Kristallwachstum allerdings nur in einer der drei Raumdimensionen erreicht. Erst nach *Streak-Seeding*-Experimenten konnte dieses auf zwei Dimensionen erweitert werden. Dennoch waren die Kristalle immer noch so klein, daß eine hoch aufgelöste Datensammlung allein an der hoch-fokussierten Strahlenquelle am BESSY möglich war, denn nur dort konnte das Hintergrundsignal auf das nötige Maß minimiert werden (vgl. 3.3.2).

Der schließlich gesammelte Datensatz zeigte zwar R-Faktoren, welche bereits bei relativ niedrigen Auflösungen hoch waren, mit einem R_{merge} von 19,2 % (vgl. 3.3.2). Dies ist jedoch zu einem großen Teil der hohen Redundanz des Datensatzes von fast 5 und der geringen Intensität aller Reflexe im Verhältnis zum Hintergrund mit einem I/σ -Wert von 9,2 geschuldet (vgl. 3.3.2), da eine wachsende Zahl separater Messungen eines einzelnen eindeutigen, aber schwachen Reflexes die Abweichung jeder einzelnen dieser Messungen vom Mittelwert aller Messungen, also den R_{merge} , zwangsläufig erhöht. Daher war es nicht überraschend, daß sich nach der Phasenbestimmung über molekularen Ersatz herausstellte, daß die Datenqualität trotz des hohen R_{merge} ausreichend war, um die Analyse der Kristallstruktur auf atomarer Ebene zu ermöglichen (vgl. 3.3.3).

Beim Modellbau stellte sich heraus, daß durch eine Rasterverschiebung genau im Stop-Codon des Gens für Imp β _127-876 die Sequenz für einige zusätzliche Aminosäuren bis zum Erreichen des nächsten vektoreigenen Stop-Codons transkribiert wurde. Die daraus resultierenden, zusätzlichen Aminosäuren sind direkt in Kristallkontakten involviert (Abb. 51). Dieser Klonierungsfehler war bemerkenswerterweise also eine Voraussetzung für die Kristallisation.

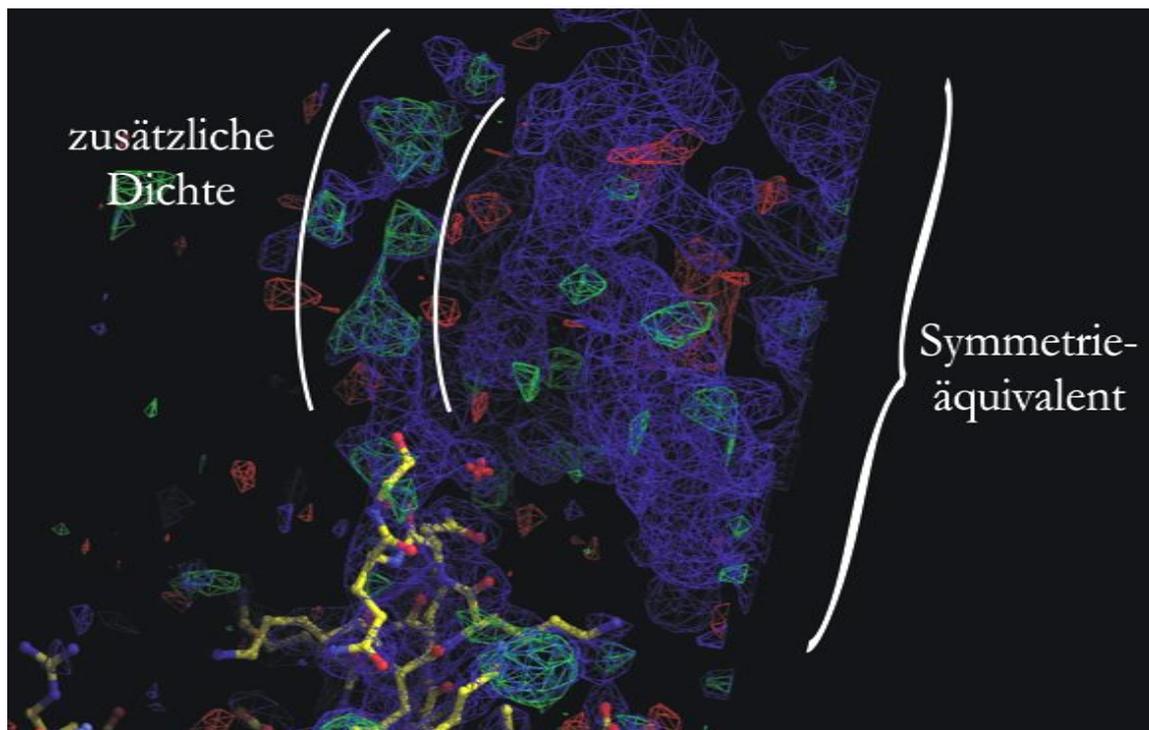


Abb. 51: Elektronendichte am C-Terminus von Imp β _127-876.

Die verfeinerte $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichte ist blau dargestellt ($\sigma = 1.1$), in grün (positiv) und rot (negativ) ist die $F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Dichte gezeigt ($\sigma = 2,6$). Das Modell von Imp β _127-876 ist im Kugel-Stab-Modus dargestellt, die Atome sind in gelb (Kohlenstoff), rot (Sauerstoff) und blau (Stickstoff) eingefärbt. An den C-Terminus von Imp β _127-876 schließt sich weitere Dichte an, welche sich in einem Bogen an das Symmetrieäquivalent legt.

Obwohl von Imp β _127-876 der größte Teil in das Modell integriert werden konnte, so gilt dies aufgrund ihrer hohen Flexibilität nicht für die Schleife zwischen HEAT 13A und 13B (AS 565-576) und die N-terminale Hälfte der IBB-Domäne von SPN1 (AS 1-36, vgl. 3.3.5). Die Ursachen werden im Folgenden noch im Detail diskutiert werden.

4.2.2 Vergleichende Analyse der Struktur von Imp β _127-876/IBB_{SPN1} mit anderen Imp β -Strukturen

Die Analyse der hier vorgestellten Kristallstruktur von Imp β _127-876/IBB_{SPN1} konnte deutliche Unterschiede zu Imp β /IBB α in Bezug auf die Konformation von Imp β aufzeigen. Im Komplex mit IBB_{SPN1} nimmt Imp β eine offene, S-förmige Konformation ein (vgl. 3.3.5), welche sich von der kompakten und gedrungenen Form von Imp β im Komplex mit IBB α deutlich unterscheidet (vgl. 3.3.6). Die Ursache ist die fehlende Interaktion von IBB_{SPN1} mit dem N-terminalen Bogen von Imp β und insbesondere mit der sauren Schleife zwischen HEAT 8A und 8B (AS 333-343), welche dagegen von entscheidender Bedeutung für eine stabile Interaktion mit IBB α ist (Cingolani et al., 1999). Eine Erklärung für diesen Bindungsmodus von IBB_{SPN1} an Imp β könnte das Heraustreten von HEAT 13B aus der konkaven Innenfläche von Imp β sein (vgl. 3.3.5 und Abb. 36 B). Diese Bewegung wird durch die ausgeprägte Flexibilität der Schleife ermöglicht, welche HEAT 13B mit HEAT 13A verbindet. Die α -Helix HEAT 13B ist zudem die letzte in Richtung des N-Terminus von Imp β , welche noch mit

4. Diskussion

IBB_{SPN1} interagiert. Mit ihrer Bewegung in Richtung IBB_{SPN1} blockiert sie den Zugang von IBB_{SPN1} zu benachbarten N-terminalen Helices von Imp β . Im Komplex mit IBB α verbleibt HEAT 13B dagegen im Verbund mit den benachbarten Helices und ermöglicht auf diese Weise weitere Interaktionen des α -helicalen Abschnitts von IBB α mit HEAT 12B.

Durch die Konformationsänderung von HEAT 13B ist die Distanz zwischen der letzten Aminosäure von IBB_{SPN1}, welche noch eine Interaktion mit Imp β eingeht, Gln40, und der sauren Schleife von Imp β deutlich größer als die Distanz zwischen der sauren Schleife und der letzten gebundenen Aminosäure des α -helicalen Teils von IBB α , nämlich Arg31 (Cingolani et al., 1999). Damit wird auch die Entfernung derjenigen Aminosäuren von IBB_{SPN1} zur sauren Schleife erweitert, welche dem Rechner-gestützten Homologievergleich von IBB_{SPN1} und IBB α zufolge an diese Schleife binden müssten: Die letzte Aminosäure in Richtung des C-Terminus von IBB α , die noch mit der sauren Schleife (genauer Asp340) interagiert, ist Lys20. Der aus dem Strukturvergleich von Imp β /IBB α und Imp β _127-876/IBB_{SPN1} ermittelte Homologievergleich beider IBB-Domänen (Abb. 42) zeigt, daß die mit Lys20 von IBB α korrespondierende Aminosäure von IBB_{SPN1} Lys32 ist.

Diese Aminosäure aber ist ungeordnet und in der Elektronendichte nicht definiert (Abb. 52). Die erste Aminosäure von IBB_{SPN1}, welche tatsächlich sichtbar ist, ist Ser37, welches jedoch in einer Entfernung von 22 Å zu Asp340 von Imp β liegt. Diese Distanz wäre durch die vier zwischen Lys32 und Ser37 liegenden Aminosäuren gerade noch zu überbrücken, dafür müssten diese aber als ausgestreckte Schleife vorliegen. In der Elektronendichte ist aber vielmehr zu erahnen, daß die helicale Faltung von IBB_{SPN1} sich zumindest noch für zwei weitere Aminosäuren nach Ser37 fortsetzt (nicht gezeigt). Damit ist die Überbrückung der Entfernung zu Asp340 unmöglich. Darüber hinaus ist in der Nachbarschaft der Carboxylatgruppe von Asp340 keine Elektronendichte auszumachen, welche nicht durch Seitenketten von Imp β verursacht wäre. Daraus kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß Lys32 von IBB_{SPN1} zwar in Bezug auf die Aminosäuresequenz konserviert sein könnte, mit Sicherheit aber nicht in Bezug auf seine Funktion.

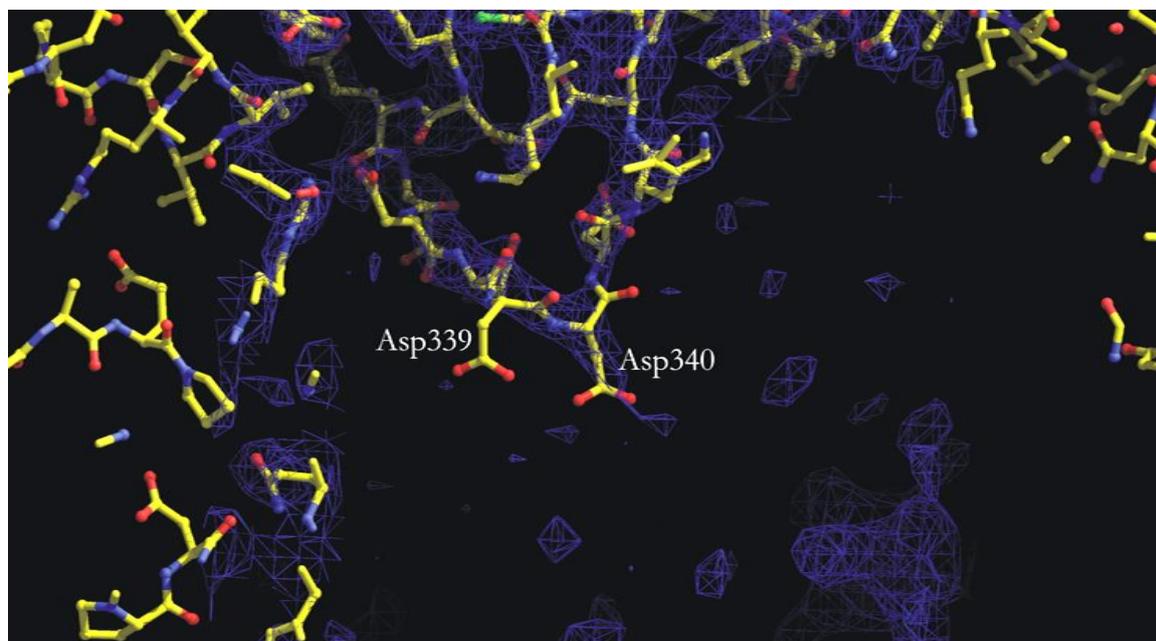


Abb. 52: Elektronendichte um die saure Schleife von Imp β _127-876.

Die verfeinerte $2F_{\text{obs}} - F_{\text{calc}}$ Elektronendichte ist in blau dargestellt ($\sigma = 0.9$) mit einer Kantenlänge der Elektronendichtekarte von 30 Å. Das Modell von Imp β _127-876 ist im Kugel-Stab-Modus gezeigt, die Atome sind in gelb (Kohlenstoff), rot (Sauerstoff), blau (Stickstoff) und grün (Schwefel) eingefärbt. In der Nähe der Carboxylatgruppen von Asp339 und Asp340 ist keine weitere Elektronendichte auszumachen, die Seitenkette von Asp339 selbst ist in der Elektronendichte nicht mehr definiert.

4. Diskussion

Neben dem Hervortreten von HEAT 13B könnte die Rasterverschiebung von zwei Aminosäuren zwischen den N-Termini von IBB_{α} und IBB_{SPN1} (Abb. 42) ein weiterer Grund für das Ausbleiben einer Bindung von IBB_{SPN1} an den N-terminalen Bogen von Imp β sein. Dies wird deutlich, wenn man sich vor Augen hält, welche Konsequenz das Entfernen von zwei Aminosäuren aus einer α -Helix auf die Lage der nachfolgenden Seitenketten hat: Sie würden alle um 180° um die Achse der Helix rotiert werden. Wenn also IBB_{SPN1} durchgängig als α -Helix vorliegt, dann kämen die N-terminalen Seitenketten von IBB_{SPN1} , welche mit der sauren Schleife von Imp β interagieren könnten, in genau entgegengesetzter Position zu liegen und zeigten folglich von der sauren Schleife weg, hinein in das Solvens.

Dies führt zur Frage, woran der N-terminale Bogen von Imp β im Komplex mit SPN1 sonst binden könnte. Da bekannt ist, daß ein effizienter Kernimport von U snRNPs zwei unabhängige Importsignale benötigt (Massenet et al., 2002; Narayanan et al., 2002), könnte der N-terminale Bogen also als Bindungsstelle für jenes zweite Importsignal des RNP dienen, möglicherweise für den Sm-Ring. Diese Hypothese muß jedoch in weiteren Studien überprüft werden.

In der Summe folgt aus dem Gesagten, daß sich die Strukturen von Imp β / IBB_{α} und Imp β / IBB_{SPN1} signifikant in der jeweiligen Konformation von Imp β unterscheiden, und dies obwohl die Interaktionen beider IBB-Domänen mit dem C-terminalen Bogen von Imp β so ähnlich sind.

Tatsächlich belegt der Vergleich mit anderen Imp β -Strukturen, daß die größte Ähnlichkeit von Imp β im Komplex mit IBB_{SPN1} nicht mit anderen Imp β -Substrat- oder Imp β -Adapter-Komplexen besteht, sondern überraschenderweise mit Kap95p/RanGTP (vgl. 3.3.6 – 3.3.9). Es mutet daher ironisch an, daß die Phasenbestimmung des Komplexes in der vorliegenden Arbeit ausgerechnet mit derjenigen Imp β -Struktur erfolgreich war (Imp β / IBB_{α}), welche sich am deutlichsten von der hier vorgestellten unterscheidet (vgl. 3.3.3). Die Konformationen von Imp β in den Strukturen von Imp β / IBB_{SPN1} und Kap95p/RanGTP sind dagegen fast deckungsgleich (vgl. 3.3.9). Dies legt den Schluß nahe, daß hierin die Ursache für die RanGTP-Unabhängigkeit in der Freisetzung von U snRNP-Importkomplexen vom *nuclear basket* liegt. Genauer gesagt imitiert Imp β im Komplex mit SPN1 also bereits den RanGTP-gebundenen Zustand, und ist daher wahrscheinlich von einer Interaktion mit dem üblichen, finalen Bindungspartner am *nuclear basket*, Nup153, ausgeschlossen. Dies steht im deutlichen Gegensatz zur Struktur von Imp β im Komplex mit IBB_{α} (Cingolani et al., 1999).

Betrachtet man die RanGTP-Unabhängigkeit von Imp β /SPN1 im Gegensatz zu Imp β /Imp α nicht nur strukturell, sondern auch aus einem thermodynamischen Blickwinkel, so wird bedeutsam, daß Imp β in einem Fall Lageenergie speichern kann, im anderen nicht: Wenn man nämlich im Blick behält, welchen Effekt die Speicherung von Lageenergie und also auch ihr Fehlen haben kann. Die Speicherung von Lageenergie in Imp β / IBB_{α} in Form eines Entropieverlustes (vgl. 3.3.7) könnte zwei Ereignisse bei der RanGTP-Bindung an Imp β ermöglichen. Sie würde nicht nur die Dissoziation von Imp β und IBB_{α} nach sich ziehen, sondern könnte gleichzeitig auch durch die Freisetzung der Lageenergie die Dissoziation von Nup153 bewirken. Fehlt die gespeicherte Lageenergie, wie im Falle von Imp β /SPN1, dann wäre dieser zweifache Effekt energetisch ungünstig. Da RanGTP in der Tat den U snRNP-Importkomplex dissoziieren kann, müßte demnach also die Freisetzung vom *nuclear basket* Ran-unabhängig sein, da sonst das System in einem energetisch Stillstand gefangen wäre. Anders gesagt: Falls Imp β /SPN1 von selbst vom *nuclear basket* dissoziieren kann, ist die vorherige Speicherung von Lageenergie schlicht unnötig. Dies wird durch die Tatsache gestützt, daß das Energieniveau von Imp β / IBB_{α} höher ist, also auch noch mehr Arbeit verrichten kann, als jenes von Imp β / IBB_{SPN1} (vgl. 3.3.7, Abb. 43). Die RanGTP-Unabhängigkeit der Freisetzung von Imp β /SPN1 vom *nuclear basket* ist also folglich nicht nur strukturell, sondern auch thermodynamisch begünstigt.

4.2.3 Schlußfolgerungen

Aus den dargestellten Ergebnissen läßt sich schließen, daß Imp β seine Faltungsvariabilität bis zum Erschöpfen nutzt, um einen eigentlich energieabhängigen Prozeß in einen unabhängigen umzuwandeln. Dadurch wird die Frage aufgeworfen, welchen Zweck diese besondere Eigenschaft von Imp β im U snRNP-Kernimport hat. Es ist verführerisch, anzunehmen, daß es sinnvoll ist, einen so außerordentlich wichtigen Prozeß wie den Kernimport von Untereinheiten für das Spleißen von prä-mRNAs unabhängig vom Energiehaushalt der Zelle zu gestalten. Dem sind jedoch zwei Dinge entgegenzuhalten: Erstens wird beim Spleißen in Form von Nucleosidtriphosphaten ein Vielfaches der Energie eines RanGTP-abhängigen Kernimports verbraucht, da die am Spleißen beteiligten RNA-Entwindungsenzyme fast alle von der ATP-Hydrolyse abhängig sind. Damit ist das Spleißen ohnehin ein energetisch teurer Prozeß, bei dem der Verbrauch eines zusätzlichen GTP-Moleküls nicht ins Gewicht fiele. Zweitens wird für den Rücktransport von Imp β ins Cytoplasma wahrscheinlich sehr wohl RanGTP benötigt, es würde also in jedem Fall verbraucht.

Vermutlich liegt der physiologische Sinn vielmehr darin, daß die RanGTP-Unabhängigkeit in der Termination des eigentlichen Kernimports auch die Unabhängigkeit vom RanGTP-Gradienten über die Kernmembran bedeutet. Der Nutzen erschließt sich bei einer Betrachtung des Zellzyklus. Der U snRNP-Import wäre nämlich auch dann möglich, wenn unmittelbar nach der Zellteilung der RanGTP-Gradient über die neu aufgebaute Kernmembran noch nicht wieder hergestellt ist. Das Spleißen wäre also demnach deutlich kürzeren Unterbrechungen unterworfen. Um dies zu belegen, muß allerdings noch eine Fülle von Erkenntnissen gewonnen werden.

Dies betrifft insbesondere die Dissoziation des U snRNP-Importkomplexes im Karyoplasma, denn es dürfen zwei Dinge nicht vergessen werden: Zum einen ist die Bindung von RanGTP an ein Importin nötig, um den unbeabsichtigten Rücktransport der Fracht zu verhindern. Daher muß dies auch sehr rasch geschehen. Zum anderen konnte kürzlich gezeigt werden, daß Imp β im RanGTP-gebundenen Zustand viel schneller in das Hydrogel im Zentralkanal des NPC eintreten kann, als in Abwesenheit von RanGTP (Dr. D. Görlich, persönliche Mitteilung). Da, wie ausführlich dargelegt worden ist, Imp β im Komplex mit SPN1 die Konformation von Imp β /RanGTP imitiert, müßte es also ebenfalls sehr schnell wieder in den Zentralkanal eintreten können. Der Zeitdruck für die Dissoziation des U snRNP-Importkomplexes erhöht sich damit also zusätzlich. Dies wiederum könnte die Existenz karyoplasmatischer Chaperone für das U snRNP erfordern, welche RanGTP bei der Dissoziation des Importkomplexes assistieren und diese zusätzlich beschleunigen. Solche Chaperone könnten in direktem Zusammenhang mit dem weiteren Transport der U snRNPs zu den Cajal bodies stehen (Lemm et al., 2006; Sleeman et al., 2001; Sleeman & Lamond, 1999). Auf diese Weise wäre auch eine gerichtete Weitergabe der U snRNPs an intranucleäre Transportsysteme gewährleistet. Da solche Schlußfolgerungen allerdings noch recht spekulativ sind, können erschöpfende Antworten erst in zukünftigen Studien der Mechanismen des Weitertransports von U snRNPs innerhalb des Nucleus geliefert werden.

4.3 Implikationen auf Modulationsprozesse beim Imp β -abhängigen Kernimport

Die Studien am Kernimport von H1 Linker Histonen durch Imp β /Imp7 und am Kernimport spleißosomaler Untereinheiten durch Imp β /SPN1 haben gezeigt, daß Imp β als Zentrum allosterischer Regulationsprozesse einer der wichtigsten Bausteine in der Gestaltung von Energieerfordernissen von Kernimportprozessen ist. Dies schließt, wie belegt wurde, auch den cNLS-Kernimport durch Imp β /Imp α mit ein. Dabei tritt Imp β nicht nur als Modulator von Co-Rezeptoren (H1-Import) oder Adaptern (cNLS-Import) auf, sondern kann auch selbst reguliert werden, wie durch die IBB-Domäne von SPN1 demonstriert wird. In allen Fällen werden durch diese Modulationen entweder die Substrataffinitäten reguliert oder die thermodynamischen Charakteristika der Kernimportprozesse verändert.

So ermöglicht die Bindung von Imp β an Imp α die Aufhebung der Autinhibition durch IBB α und ist also unverzichtbar für die Substraterkennung durch Imp α . Zusätzlich wird durch die Bindung an Imp α Lageenergie in der Superhelix von Imp β gespeichert, welche nach der Translokation durch den NPC dazu genutzt werden könnte, bei der RanGTP-Bindung neben der Dissoziation des cNLS-Importkomplexes auch die Freisetzung von der Kernpore zu ermöglichen.

Im H1-Kernimport wirkt Imp β als allosterischer Aktivator von Imp7 und erhöht seine Substrataffinität. Darüber hinaus werden durch die Heterodimerisierung die Voraussetzungen für den Entropiegewinn bei der Substratbindung geschaffen. Hier werden also die Energieerfordernisse für die Bildung des H1-Importkomplexes moduliert.

Beim Kernimport von U snRNPs schließlich ermöglicht IBB_{SPN1} Imp β die Einnahme einer Konformation, welche den RanGTP-gebundenen Zustand imitiert und mithin die freie Dissoziation vom NPC erlaubt. Folglich werden in diesem Fall die Energieerfordernisse für die Termination des Kernimports verändert.

Abschließend kann gesagt werden, daß die dargestellten Ergebnisse einen tieferen Einblick in die Thermodynamik und die strukturellen Hintergründe von Imp β -abhängigen Kernimportwegen liefern, insbesondere in Hinblick auf jene Wege, in welchen Imp β mit weiteren Transportproteinen zusammenwirkt. Um dieses Wissen zu erweitern, müssen in zukünftigen Studien auch die thermodynamischen Parameter anderer Kerntransportwege erfaßt werden. So könnte schließlich das komplizierte Netzwerk des nucleocytoplasmatischen Transports mit seinen Energievoraussetzungen und -umsetzungen umfassender verstanden werden.

5. Zusammenfassung

Der aktive Transport von cytoplasmatischen Substraten in den Nucleus wird von Transportrezeptoren vermittelt, welche auch Importine genannt werden. Unter ihnen ist der Kernimportrezeptor Importin β (Imp β) der wohl vielseitigste: Imp β ist sowohl als einzelner Rezeptor aktiv, als auch im Verbund mit anderen Rezeptoren oder Adaptern. Beispiele für letztere sind der Kernimport von Substraten mit klassischem Kernlokalisierungssignal (cNLS-Substrate) gemeinsam mit dem Adapterprotein Importin α (Imp α), der Kernimport von H1 Linker Histonen mithilfe des Co-Rezeptors Importin7 (Imp7) und der Kernimport spleißosomaler Untereinheiten, der U snRNPs, im Verbund mit Snurportin1 (SPN1). Diese außergewöhnliche Variabilität von Imp β stand im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit und ihre Ursachen sollten thermodynamisch und strukturell ergründet werden, mit besonderer Fokussierung auf den H1-Kernimport und den Kernimports von U snRNPs.

Beim Kernimport von H1 Linker Histonen binden zwar sowohl Imp β als auch Imp7 an das Substrat, jedoch nur als Heterodimer können sie die Translokation von H1 durch die Kernpore bewältigen. In dieser Arbeit konnte die H1-Bindungsstelle von Imp7 ermittelt werden, welche zwei saure Bereiche nahe dem C-Terminus umfaßt, die als mögliche Schleifen identifiziert wurden. Die thermodynamische Analyse der Bildung des H1-Importkomplexes aus Imp β , Imp7 und H1 und seiner Dissoziation durch RanGTP mittels isothermer Titrationskalorimetrie (ITC) zeigte, daß beide Prozesse allosterisch reguliert sind. Dabei konnte dargelegt werden, daß die Bildung des Imp β /Imp7-Heterodimers *in vitro* enthalpiegetrieben ist, wohingegen die nachfolgende H1-Bindung an das Heterodimer entropiegetrieben ist. Der erforderliche Entropiegewinn wird dabei durch die Freisetzung von Salzionen von der H1-Oberfläche durch die komplementär zu H1 geladene, gemeinsame Oberfläche von Imp β und Imp7 bereitgestellt. Hieraus ist ersichtlich, daß die Energiebarriere bei der H1-Bindung durch den Einsatz eines Rezeptordimers überwunden wird. Außerdem konnte nachgewiesen werden, daß der H1-Bindung eine allosterische Aktivierung von Imp7 durch Imp β vorausgeht, bei welcher die Imp β -Bindungsdomäne von Imp7 eine Schlüsselrolle spielt.

Im Kernimport von U snRNPs dagegen bedient sich Imp β nicht eines Co-Rezeptors, sondern eines Adapters für das Substrat, nämlich SPN1. Im Gegensatz zu allen anderen bislang untersuchten Imp β -abhängigen Kernimportprozessen bedarf der Imp β /SPN1/U snRNP-Importkomplex für die Freisetzung vom *nuclear basket* nach dem Import jedoch nicht des Schalterproteins RanGTP. Die hier vorgestellte Kristallstruktur von Imp β ₁₂₇₋₈₇₆ im Komplex mit der Imp β -Bindungs-Domäne von SPN1 (IBB_{SPN1}, AS 1-65) offenbart eine weit geöffnete Konformation von Imp β , wie sie einzigartig unter den funktionellen Imp β /Substrat-Komplexen ist. Überraschenderweise gleicht sie vielmehr der Konformation von Imp β /RanGTP. Da die Bindung von RanGTP an Imp β üblicherweise die Freisetzung von Importkomplexen vom *nuclear basket* auslöst, kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß die freie Dissoziation von Imp β /SPN1 vom *nuclear basket* durch die Mimikry des RanGTP-gebundenen Zustands ermöglicht wird. Mittels ITC konnte überdies eine Korrelation zwischen der offenen Konformation von Imp β im Komplex mit IBB_{SPN1} und seiner hohen Molekürentropie belegt werden. Dies steht im Gegensatz zur geschlossenen und daher entropiearmen Konformation von Imp β im Komplex mit Imp α .

Die hier vorgestellten Ergebnisse verdeutlichen also die zentrale Rolle von molekularen Modulationen im Imp β -abhängigen Kernimport und geben neue Einblicke in Strategien, die Energiebarrieren im Kernimport zu überwinden.

6. Summary

Active nuclear transport of cytoplasmic substrates into the nucleus is mediated by transport receptors also termed importins. Among them the nuclear import receptor importin β (Imp β) is presumably the most versatile one: it is not only active as single receptor, but also in cooperation with other receptors or adaptors. As examples for the latter ones shall be named the nuclear import of substrates with classical nuclear localisation signal (cNLS substrates) together with the adaptor protein importin α (Imp α), the nuclear import of H1 linker histones aided by the co-receptor importin7 (Imp7) and finally the nuclear import of spliceosomal subunits, the U snRNPs in cooperation with snurportin1 (SPN1). This extraordinary variability of Imp β was the focus of the work presented here and its basis should be fathomed in both thermodynamical and structural approaches with special attention to H1 nuclear import and the nuclear import of U snRNPs.

In the nuclear import of H1 linker histones both Imp β and Imp7 separately interact with H1, however, only as a dimer they facilitate the translocation through the nuclear pore. In this study the H1 binding site of importin7 could be identified, comprising two extended acidic regions near the C-terminus of importin7, which could be classified to be putative loops. The thermodynamic analysis of the H1 import complex assembly and also its disassembly by RanGTP by means of isothermal titration calorimetry revealed both processes are regulated allosterically. Concomitantly it could be demonstrated that the formation of a receptor heterodimer *in vitro* is an enthalpy-driven process, while subsequent binding of H1 to the heterodimer is entropy-driven. The necessary gain of entropy for H1 binding is provided by the displacement of counter-ions from the H1 surface by the complementarily charged joint binding surface of Imp β and Imp7. From this it can be followed, that by the application of an import receptor dimer the energy-balance of H1 import is evened. Furthermore, it could also be verified that substrate recognition is preceded by an allosteric activation of Imp7 by Imp β , in which the Imp β -binding domain of Imp7 plays a key role.

In the nuclear import of U snRNPs however, Imp β does not avail itself of a co-receptor but an adaptor to the substrate, namely SPN1. In contrast to any other characterised Imp β -dependent nuclear import the Imp β /SPN1/U snRNP complex does not require the switch protein RanGTP for the terminal release from the nuclear basket of the nuclear pore complex (NPC). The crystal structure of Imp β ₁₂₇₋₈₇₆ in complex with the importin β -binding-domain of SPN1 (IBB_{SPN1}, aa 1-65) presented here reveals that Imp β adopts a widely opened conformation, which is unique for a functional Imp β /cargo complex and surprisingly it rather resembles the conformation of the Imp β /RanGTP complex. As binding of RanGTP to Imp β usually triggers the release of import complexes from the NPC, it is proposed that the free dissociation of Imp β /SPN1 from the nuclear basket is allowed by the mimicry of the RanGTP-bound state. Moreover, by means of ITC a correlation between the open conformation of Imp β in complex with IBB_{SPN1} and its high entropy state could be documented. This is in contrast to the closed and thus entropically low-levelled conformation of Imp β in complex with Imp α .

Consequently the results presented here underline the central role of molecular modulation in Imp β -dependent nuclear transport and provide new insights into strategies to overcome energy-barriers in nuclear transport.

7. Abkürzungsverzeichnis

'	Minute
”	Sekunde
A	Absorption
Å	Ångström (1 Å = 0,1 nm)
aa	<i>amino acid</i>
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäuren
AG	Arbeitsgruppe
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
B	Temperaturfaktor [Å^3]
<i>B. taurus</i>	<i>Bos taurus</i>
BESSY	Berliner Elektronenspeicherringgesellschaft für Synchrotronstrahlung
bp	Basenpaare
c	Konzentration
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CBC	<i>Cap Binding Complex</i>
CBP	<i>Cap Binding Protein</i>
CIAP	<i>Calf Intestine Alkaline Phosphatase</i>
cNLS	<i>classical nuclear localisation signal</i>
Crm1	<i>Chromosome region maintenance 1</i>
d	desoxy
ΔG	Gibbs'sche freie Energie
ΔH	Enthalpieänderung
ΔS	Entropieänderung
Da	Dalton (1 Da = 1 g/mol)
ddH ₂ O	Bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ϵ	Molarer Extinktionskoeffizient [$\text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$]
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	N,N,N',N'-Ethyldiamintetraacetat
F_{calc}	Berechnete Strukturaktoren
F_{obs}	Beobachtete Strukturaktoren
<i>G. gallus</i>	<i>Gallus gallus</i>
GDPNP	5'-Guanylimidodiphosphat
GSH	reduziertes Glutathion

7. Abkürzungsverzeichnis

GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
<i>H. sapiens</i>	<i>Homo sapiens</i>
HEAT	Huntingtin-Elongation-Factor-A-Subunit-TOR
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonat
hnRNP	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
IBB	Importin β -Bindung
IBB ₇	IBB-Domäne von Imp7
IBB _{α}	IBB-Domäne von Imp α
IBB _{SPN1}	IBB-Domäne von SPN1
Imp	Importin
IPTG	Isopropyl- β -D-isothiogalactopyranosid
ITC	Isotherme Titrationskalorimetrie
K _A	Assoziationskonstante
K _D	Dissoziationskonstante
Kap	Karyopherin
<i>L. esculentum</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i>
LB	Luria Bertani
M	molar (mol/l)
m ₃ G (= m ^{2,2,7} G)	trimethylierte Guaninbase (zweimal an N2, einmal an N7)
m ⁷ G	monomethylierte Guaninbase (an N7)
MAD	<i>Multiple Anomalous Dispersion</i>
MIR	<i>Multiple Isomorphous Replacement</i>
MR	<i>Molecular Replacement</i>
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MW	<i>Molecular weight marker</i>
NES	<i>Nuclear export signal</i>
NLS	<i>Nuclear localisation signal</i>
NPC	<i>Nuclear pore complex</i>
NTF2	<i>Nuclear transport factor 2</i>
NTP	Nucleosid-3'-Triphosphat
Nup	Nucleoporin
OD	Optische Dichte
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PHAX	<i>Phosphorylated adaptor for RNA export</i>

7. Abkürzungsverzeichnis

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTHrP	<i>Parathyroid-hormone related protein</i>
Ran	<i>Rat sarcoma related nuclear antigen</i>
RanBP	<i>Ran binding protein</i>
RanGAP	<i>Ran GTPase activating protein</i>
RanGEF	<i>Ran guanosine nucleotide exchange factor</i>
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAD	<i>Single Anomalous Dispersion</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SIR	<i>Single Isomorphous Replacement</i>
Sm	Steven Miller
SMN	<i>Survival of motor neuron</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoprotein particle</i>
SPN1	Snurportin1
SREBP2	<i>Sterol regulatory element binding protein-2</i>
T	Temperatur
T _m	Schmelztemperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tgs1	Trimethylguanosinsynthase 1
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
U snRNA	<i>Uridine-rich snRNA</i>
U snRNP	<i>Uridine-rich snRNP</i>
UV	Ultraviolett
V	Volumen
vgl.	vergleiche
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewichtsprozent
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>
xg	Vielfaches der Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
Xpo1	Exportin1

Nicht angegebene Abkürzungen für physikalische Größen und deren Einheiten entsprechen dem SI-System.

8. Literaturverzeichnis

Adam, S. A., Sterne-Marr, R. & Gerace, L. (1991): In vitro nuclear protein import using permeabilized mammalian cells. *Methods Cell Biol.* **35**: 469-482.

Arnold, M., Nath, A., Hauber, J & Kehlenbach, R. H. (2006a): Multiple importins function as nuclear transport receptors for the Rev protein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Biol. Chem.* **281** (30): 20883-20890.

Arnold, M., Nath, A., Wohlwend, D. & Kehlenbach, R. H. (2006b): Transportin is a major nuclear import receptor for c-Fos: a novel mode of cargo-interaction. *J. Biol. Chem.* **281** (9): 5492-5499.

Arts, G. J., Fornerod, M. & Mattaj, I. W. (1998): Identification of a nuclear export receptor for tRNA. *Curr. Biol.* **8** (6): 305-314.

Baake, M., Bäuerle, M., Doenecke, D. & Albig, W. (2001a): Core histones and linker histones are imported into the nucleus by different pathways. *Eur. J. Cell Biol.* **80** (11): 669-677.

Baake, M., Doenecke, D. & Albig, W. (2001b): Characterisation of nuclear localisation signals of the four human core histones. *J. Cell Biochem.* **81** (2): 333-346.

Ball, J. R. & Ullman, K. S. (2005): Versatility at the nuclear pore complex: lessons learned from the nucleoporin Nup153. *Chromosoma* **114** (5): 319-330.

Bäuerle, M., Doenecke, D. & Albig, W. (2002): The requirement of H1 histones for a heterodimeric nuclear import receptor. *J. Biol. Chem.* **277** (36): 32480-32489.

Beck, M., Forster, F., Ecke, M., Plitzko, J. M., Melchior, F., Gerisch, G., Baumeister, W., Medalia, O. (2004): Nuclear pore complex structure and dynamics revealed by cryoelectron tomography. *Science* **306**: 1387-1390.

Beck, M., Lucic, V., Forster, F., Baumeister, W., Medalia, O. (2007): Snapshots of nuclear pore complexes in action captured by cryo-electron tomography. *Nature* **449**: 611-615.

Ben-Efraim, I. & Gerace, L. (2001): Gradient of increasing affinity of importin β for nucleoporins along the pathway of nuclear import. *J. Cell Biol.* **152** (2): 411-417.

Bischoff, F. R. & Ponstingl, H. (1991): Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1. *Nature* **354**: 80-82.

Bischoff, F. R. & Ponstingl, H. (1995): Catalysis of guanine nucleotide exchange of Ran by RCC1 and stimulation of hydrolysis of Ran-bound GTP by Ran-GAP1. *Methods Enzymol.* **257**: 135-144.

Brzozowski, A. M. & Walton, J. (2001): Clear Strategy Screens for macromolecule crystallisation. *J. Appl. Cryst.* **34**: 97-101.

Chi, N. C., Adam, E. A. & Adam, S. A. (1995): Sequence and characterization of cytoplasmic nuclear import factor P97. *J. Cell Biol.* **130**: 265-274.

Chook, Y. & Blobel, G. (2001): Karyopherins and nuclear import. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **11** (6): 703-715.

Chook, Y. M. & Blobel, G. (1999): Structure of the nuclear transport complex karyopherin-beta2-Ran x GppNHp. *Nature* **399**: 230-237.

Cingolani, G., Bednenko, J., Gillespie, M. T. & Gerace, L. (2002): Molecular basis for the recognition of a nonclassical nuclear localization signal by importin beta. *Mol. Cell* **10** (6): 1345-1353.

8. Literaturverzeichnis

- Cingolani, G., Petosa, C., Weis, K. & Müller, C. W. (1999): Structure of importin-beta bound to the IBB-domain of importin-alpha. *Nature* **399**: 221-229.
- Conti, E., Müller, C. W. & Stewart, M. (2006): Karyopherin flexibility in nucleocytoplasmic transport. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **16**: 237-244.
- Cook, A., Bono, F., Jinek, M. & Conti, E. (2007): Structural biology of nucleocytoplasmic transport. *Annu. Rev. Biochem.* **76**: 647-671.
- Cronshaw, J. M., Krutchinsky, A. N., Zhang, W., Chait, B. T. & Matunis, K. J. (2002): Proteomic analysis of the mammalian nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **158**: 915-927.
- Denning, D. P., Patel, S. S., Uversky, V., Fink, A. L. & Rexach, M. (2003): Disorder in the nuclear pore complex: the FG repeat regions of nucleoporins are natively unfolded. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100** (5): 2450-2455.
- Dickmanns, A. & Ficner, R. (2005): Role of the 5'-cap in cap in the biogenesis of spliceosomal snRNPs. *Topics Curr. Genetics* **12**: 179-204.
- Emsley, P. & Cowtan, K. (2004): Coot: model-building tools for molecular graphics. *Acta Cryst. D* **60**: 2126-2132.
- Fahrenkrog, B., Maco, B., Fager, A. M., Koser, J., Sauder, U., Ullmann, K. S. & Aebi, U. (2002): Domain-specific antibodies reveal multiple-site topology of Nup153 within the nuclear pore complex. *J. Struct. Biol.* **140** (1-3): 254-267.
- Fassati, A., Görlich, D., Harrison, I., Zaytseva, L. & Mingot, J. M. (2003): Nuclear import of HIV-1 intracellular reverse transcription complexes is mediated by importin 7. *EMBO J.* **22** (14): 3675-3685.
- Fischer, U., Sumpter, V., Sekine, M., Satoh, T. & Lührmann R (1993): Nucleo-cytoplasmic transport of U snRNPs: definition of a nuclear location signal in the Sm core domain that binds a transport receptor independently of the m3G cap. *EMBO J.* **12**: 573-583.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M., & Mattaj, I. W. (1997): CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell* **90** (6): 1051-1060.
- Freedman, N. D. & Yamamoto, K. R. (2004): Importin 7 and importin alpha/importin beta are nuclear import receptors for the glucocorticoid receptor. *Mol. Biol. Cell* **15** (5): 2276-2286.
- Frey, S. & Görlich, D. (2007): A saturated FG-repeat hydrogel can reproduce the permeability properties of nuclear pore complexes. *Cell* **130** (3): 512-523.
- Frey, S., Richter, R. P. & Görlich, D. (2006): FG-rich repeats of nuclear pore proteins form a three-dimensional meshwork with hydrogel-like properties. *Science* **314** (5800): 815-817.
- Fu, X., Choi, Y. K., Qu, D., Yu, Y., Cheung, N. S. & Qi, R. Z. (2006): Identification of nuclear import mechanisms for the neuronal Cdk5 activator. *J. Biol. Chem.* **281** (51): 39014-39021.
- Fukuda, M., Gotoh, I., Adachi, M., Gotoh, Y. & Nishida, E. (1997): A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. Role of nuclear export signal of MAP kinase kinase. *J. Biol. Chem.* **272** (5): 32642-32648.
- Fukuhara, N., Fernandez, E., Ebert, J., Conti, E. & Svergun, D. (2004): Conformational variability of nucleocytoplasmic transport factors. *J. Biol. Chem.* **279** (3): 2176-2181.
- Furuichi, Y., LaFiandra, A. & Shatkin, A. J. (1977): 5'-Terminal structure and mRNA stability. *Nature* **266**: 235-239.

8. Literaturverzeichnis

- Geyer, M., Assheuer, R., Klebe, C., Kuhlmann, J., Becker, J., Wittinghofer, A. & Kalbitzer, H. R. (1999): Conformational states of the nuclear GTP-binding protein Ran and its complexes with the exchange factor RCC1 and the effector protein RanBP1. *Biochemistry* **38** (35): 11250-11260.
- Gill, S. C. & von Hippel, P. H. (1989): Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182** (2): 319-326.
- Gouet, P., Courcelle, E., Stuart, D. I. & Metoz, F. (1999): ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics* **15** (4): 305-308.
- Görlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F. R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S. & Izaurralde, E. (1997): A novel class of RanGTP binding proteins. *J. Cell Biol.* **138**: 65-80.
- Görlich, D., Panté, N., Kutay, U., Aebi, U. & Bischoff, F. R. (1996): Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import. *EMBO J.* **15**: 5584-5594.
- Guiochon-Mantel, A., Delabre, K., Lescop, P. & Milgrom, E. (1994): Nuclear localization signals also mediate the outward movement of proteins from the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 7179-7183.
- Hamm, J., Darzynkiewicz, E., Tahara, S. M. & Mattaj, I. W. (1990): The trimethylguanosine cap structure of U1 snRNA is a component of a bipartite nuclear targeting signal. *Cell* **62**: 569-577.
- Harreman, M. T., Cohen, P. E., Hodel, M. R., Truscott, G. J., Corbett, A. H. & Hodel, A. E. (2003a): Characterization of the auto-inhibitory sequence within the N-terminal domain of importin alpha. *J. Biol. Chem.* **278**: 21361-21369.
- Harreman, M. T., Hodel, M. R., Fanara, P., Hodel, A. E. & Corbett, A. H. (2003b): The auto-inhibitory function of importin alpha is essential in vivo. *J. Biol. Chem.* **278**: 5854-5863.
- Hernandez, N. (2001). Small nuclear RNA genes: a model system to study fundamental mechanisms of transcription. *J. Biol. Chem.* **276** (29): 26733-26736.
- Huber, J., Cronshagen, U., Kadokura, M., Marshallsay, C., Wada, T., Sekine, M. & Lührmann, R. (1998): Snurportin1, an m3G-cap-specific nuclear import receptor with a novel domain structure. *EMBO J.* **17** (14): 4114-4126.
- Huber, J., Dickmanns, A. & Lührmann, R. (2002): The importin-beta binding domain of snurportin1 is responsible for the Ran- and energy-independent nuclear import of spliceosomal U snRNPs in vitro. *J. Cell Biol.* **156** (3): 467-479.
- Izaurralde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I. W. & Görlich, D. (1997): The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J.* **16**: 6535-6547.
- Jacobs, E. Y., Ogiwara, I. & Weiner, A. M. (2004): Role of the C-terminal domain of RNA polymerase II in U2 snRNA transcription and 3' processing. *Mol. Cell. Biol.* **24** (2): 846-855.
- Jäkel, S., Albig, W., Kutay, U., Bischoff, F. R., Schwamborn, K., Doenecke, D. & Görlich, D. (1999): The importin β /importin 7 heterodimer is a functional nuclear import receptor for histone H1. *EMBO J* **18** (9): 2411-2423.
- Jäkel, S. & Görlich, D. (1998): Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells. *EMBO J.* **17** (15): 4491-4502.
- Jäkel, S., Mingot, J. M., Schwarzmaier, P., Hartmann, E. & Görlich, D. (2001): Importins fulfill a dual function as nuclear import receptors and cytoplasmic chaperones for exposed basic domains. *EMBO J.* **21** (3): 377-386.

8. Literaturverzeichnis

- John, J., Frech, M. & Wittinghofer, A. (1988): Biochemical properties of Ha-ras encoded p21 mutants and mechanism of the autophosphorylation reaction. *J. Biol. Chem.* **263**: 11792-11799.
- Joseph, J. (2006): Ran at a glance. *J. Cell Sci.* **119**: 3481-3484.
- Jullien, D., Görlich, D., Laemmli, U. K. & Adachi, Y. (1999): Nuclear import of RPA in *Xenopus* egg extracts requires a novel protein XRIPalpha but not importin alpha. *EMBO J.* **18** (15): 4348-4358.
- Kahle, J., Baake, M., Doenecke, D. & Albig, W. (2005): Subunits of the heterotrimeric transcription factor NF-Y are imported into the nucleus by distinct pathways involving importin beta and importin 13. *Mol. Cell Biol.* **25** (13): 5339-5354.
- Kalderon, D., Richardson, W. D., Markham, A. F. & Smith, A. E. (1984): Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen. *Nature* **311**: 33-38.
- Kataoka, N., Bachorik, J. L. & Dreyfuss, G. (1999): Transportin-SR, a nuclear import receptor for SR proteins. *J. Cell Biol.* **145** (6): 1145-1152.
- Kiss, T. (2004): Biogenesis of small nuclear RNPs. *J. Cell Sci.* **117**: 5949-5951.
- Klebe, C., Bischoff, F. R., Ponstingl, H. & Wittinghofer, A. (1995): Interaction of the nuclear GTP-binding protein Ran with its regulatory proteins RCC1 and RanGAP1. *Biochemistry* **34** (2): 639-647.
- Kobe, B. (1999): Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 388-397.
- Kunkel, G. R., Maser, R. L., Calvet, J. P. & Pederson, T. (1986): U6 small nuclear RNA is transcribed by RNA polymerase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83** (22): 8575-8579.
- Kutay, U., Bischoff, F. R., Kostka, S., Kraft, R. & Görlich, D. (1997): Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor. *Cell* **90** (6): 1061-1071.
- Kutay, U., Lipowsky, G., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Schwarzmaier, P., Hartmann, E. & Görlich, D. (1998): Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. *Mol. Cell* **1** (3): 359-369.
- Lai, M., Lin, R., Huang, S., Tsai, C. & Tarn, W. (2000): A human importin-beta family protein, Transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins. *J. Biol. Chem.* **275** (11): 7950-7957.
- Lanford, R. E. & Butel, J. S. (1984): Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen. *Cell* **37**: 801-813.
- Lanford, R.E., Kanda, P. & Kennedy, R. C. (1986): Induction of nuclear transport with a synthetic peptide homologous to the SV40 T antigen transport signal. *Cell* **46**: 575-582.
- Laskowski, R. A., Moss, D. S. & Thornton, J. M. (1993): Main-chain bond lengths and bond angles in protein structures. *J. Mol. Biol.* **231** (4): 1049-1067.
- Lee, S. J., Matsuura, Y., Liu, S. M. & Stewart, M. (2005): Structural basis for nuclear import complex dissociation by RanGTP. *Nature* **435**: 693-696.
- Lee, S. J., Sekimoto, T., Yamashita, E., Nagoshi, E., Nakagawa, A., Imamoto, N., Yoshimura, M., Sakai, H., Chong, K. T., Tsukihara, T & Yoneda, Y. (2003): The structure of importin-beta bound to SREBP-2: nuclear import of a transcription factor. *Science* **302**: 1571-1575.
- Lemm, I., Girard, C., Kuhn, A. N., Watkins, N. J., Schneider, M., Bordonné, R. & Lührmann, R. (2006): Ongoing U snRNP biogenesis is required for the integrity of Cajal bodies. *Mol. Biol. Cell* **17** (7): 3221-3231.

8. Literaturverzeichnis

- Lipowsky, G., Bischoff, F., Schwarzmaier, P., Kraft, R., Kostka, S., Hartmann, E., Kutay, U. & Görlich, D. (2000): Exportin 4: a mediator of a novel nuclear export pathway in higher eukaryotes. *EMBO J.* **19** (16): 4362-4371.
- Liu, S. M. & Stewart, M. (2005): Structural basis for the high-affinity binding of nucleoporin Nup1p to the *Saccharomyces cerevisiae* importin-beta homologue, Kap95p. *J. Mol. Biol.* **349** (3): 515-525.
- Madrid, A. S. & Weis, K. (2006): Nuclear transport is becoming crystal clear. *Chromosoma* **115**: 98-109.
- Marshallsay, C., Dickmanns, A., Bischoff, F. R., Ponstingl, H., Fanning, E. & Luhrmann, R. (1996): In vitro and in vivo evidence that protein and U1 snRNP nuclear import in somatic cells differ in requirement for GTP-hydrolysis, Ran/TC4 and RCC1. *Nucleic acids Res.* **24**: 1829-1836.
- Massenet, S., Pellizzoni, L., Paushkin, S., Mattaj, I. W. & Dreyfuss, G. (2002) The SMN complex is associated with snRNPs throughout their cytoplasmic assembly pathway. *Mol. Cell. Biol.* **22** (18): 6533-6541.
- Matsuura, Y. & Stewart, M. (2004): Structural basis for the assembly of a nuclear export complex. *Nature* **432**: 872-877.
- Mattaj, I. W. & Englmeier, L. (1998): Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu. Rev. Biochem.* **67**: 265-306.
- Medlin, J. E., Uguen, P., Taylor, A., Bentley, D. L. & Murphy, S. (2003): The C-terminal domain of pol II and a DRB-sensitive kinase are required for 3' processing of U2 snRNA. *EMBO J.* **22** (4): 925-934.
- Melchior, F., Paschal, B. M., Evans, J. & Gerace, L. (1993): Inhibition of nuclear protein import by non-hydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor. *J. Cell Biol.* **123**: 1649-1659.
- Messerschmidt, A. (2007): X-Ray Crystallography of Biomacromolecules – A Practical Guide. Wiley-VCH, Weinheim, Germany.
- Mingot, J., Kostka, S., Kraft, R., Hartmann, E. & Görlich, D. (2001): Importin 13: a novel mediator of nuclear import and export. *EMBO J.* **20** (14): 3685-3694.
- Moore, M. S. & Blobel, G. (1993): The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus. *Nature* **365**: 661-663.
- Moore, J. D., Yang, J., Truant, R. & Kornbluth, S. (1999): Nuclear import of Cdk/cyclin complexes: identification of distinct mechanisms for import of Cdk2/cyclin E and Cdc2/cyclin B1. *J. Cell Biol.* **144** (2): 213-224.
- Mouaikel, J., Verheggen, C., Bertrand, E., Tazi, J. & Bordonne, R. (2002): Hypermethylation of the cap structure of both yeast snRNAs and snoRNAs requires a conserved methyltransferase that is localized to the nucleolus. *Mol. Cell* **9** (4): 891-901.
- Mühlhäusser, P., Müller, E. C., Otto, A. & Kutay, U. (2001): Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones. *EMBO Rep.* **21** (81): 690-696.
- Murshudov, G. N., Vagin, A. A., Lebedev, A., Wilson, K. S. & Dodson, E. J. (1999): Efficient anisotropic refinement of macromolecular structures using FFT. *Acta Cryst. D* **55**: 247-255.
- Narayanan, U., Ospina, J. K., Frey, M. R., Hebert, M. D. & Matera, A. G. (2002): SMN, the spinal muscular atrophy protein, forms a pre-import snRNP complex with snurportin1 and importin beta. *Hum. Mol. Genet.* **11** (15): 1785-1795.

8. Literaturverzeichnis

- Neuman de Vegvar, H. E. & Dahlberg, J. E. (1990): Nucleocytoplasmic transport and processing of small nuclear RNA precursors. *Mol. Cell. Biol.* **10** (7): 3365-3375.
- Ohno, M., Segref, A., Bachi, A., Wilm, M. & Mattaj, I. W. (2000): PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. *Cell* **101** (2): 187-198.
- Ossareh-Nazari, B., Bachelier, F. & Dargemont, C. (1997): Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science* **278** (5335): 141-144.
- Palacios, I., Hetzer, M., Adam, S. A. & Mattaj, I. W. (1997): Nuclear import of U snRNPs requires importin beta. *EMBO J.* **16** (22): 6783-6792.
- Paine, P. L., Moore, L. C. & Horowitz, S. B. (1975): Nuclear envelope permeability. *Nature* **254**: 109-114.
- Patel, S. S., Belmont, B. J., Sante, J. M. & Rexach, M. F. (2007): Natively unfolded nucleoporins gate protein diffusion across the nuclear pore complex. *Cell* **129** (1): 83-96.
- Paraskeva, E., Izaurralde, E., Bischoff, F. R., Huber, J., Kutay, U., Hartmann, E., Lührmann, R. & Görlich, D. (1999). CRM1-mediated recycling of snurportin 1 to the cytoplasm. *J. Cell. Biol.* **145** (2): 255-264.
- Paulillo, S. M., Phillips, E. M., Koser, J., Sauder, U., Ullman, K. S., Powers, M. A. & Fahrenkrog, B. (2005): Nucleoporin domain topology is linked to the transport status of the nuclear pore complex. *J. Mol. Biol.* **351** (4): 784-798.
- Paushkin, S., Gubitz, A. K., Massenet, S. & Dreyfuss, G. (2002): The SMN complex, an assemblyosome of ribonucleoproteins. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**: 305-312.
- Pearson, W. R. & Lipman, D. J. (1988): Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85** (8): 2444-2448.
- Pemberton, L. F. & Paschal, B. M. (2005): Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export. *Traffic* **6**: 187-198.
- Peters, R. (2006): Introduction to nucleocytoplasmic transport: molecules and mechanisms. *Methods Mol. Biol.* **322**: 235-258.
- Plafker, S. M. & Macara, I. G. (2000): Importin-11, a nuclear import receptor for the ubiquitin-conjugating enzyme, UbcM2. *EMBO J.* **19** (20): 5502-5513.
- Pollard, V. W., Michael, W. M., Nakielny, S., Siomi, M. C., Wang, F. & Dreyfuss, G. (1996): A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell* **86**: 985-994.
- Ramachandran, G. N., Sasisekharan, V. (1968): Conformation of polypeptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* **23**: 283-438.
- Reddy, R., Henning, D., Das, G., Harless, M. & Wright, D. (1987): The capped U6 small nuclear RNA is transcribed by RNA polymerase III. *J. Biol. Chem.* **262** (1): 75-81.
- Rhodes, G. (2006): Crystallography made crystal clear, Third Edition: A Guide for Users of macromolecular models. Elsevier/Academic Press, San Diego, USA.
- Ribbeck, K. & Görlich, D. (2001): Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes. *EMBO J.* **20** (6): 1320-1330.
- Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A. & Dingwall, C. (1991): Two independent basic domains in nucleoplasmic nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence. *Cell* **64**: 615-623.

8. Literaturverzeichnis

- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y. & Chait, B. T. (2000): The yeast nuclear pore complex: Composition, architecture and transport mechanism. *J. Cell Biol.* **148**: 635-651.
- Seewald, J. S., Körner, C., Wittinghofer, A. & Vetter, I. R. (2002): RanGAP mediates GTP hydrolysis without an arginine finger. *Nature* **415**: 662-666.
- Sheldrick, G. (2005). Bruker AXS Inc., Madison, Wisconsin, USA.
- Shuman, S. (2002): What messenger RNA capping tells us about eukaryotic evolution. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3** (8): 619-625.
- Siomi, M. C., Eder, P. S., Kataoka, N., Wan, L., Liu, Q. & Dreyfuss, G. (1997): Transportin-mediated nuclear import of heterogeneous nuclear RNP proteins. *J. Cell Biol.* **138** (6): 1181-1192.
- Sleeman, J. E., Ajuh, P. & Lamond, A. I. (2001): snRNP protein expression enhances the formation of Cajal bodies containing p80-coilin and SMN. *J. Cell Sci.* **114** (24): 4407-4419.
- Sleeman, J. E. & Lamond, A. I. (1999): Nuclear organization of pre-mRNA splicing factors. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11** (3): 372-377.
- Stade, K., Ford, C. S., Guthrie, C. & Weis, K. (1997): Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. *Cell* **90** (6): 1041-1050.
- Stewart, M. (2007): Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8** (3): 195-208.
- Strasser, A., Dickmanns, A., Lührmann, R. & Ficner, R. (2005): Structural basis for m3G-cap-mediated nuclear import of spliceosomal UsnRNPs by snurportin1. *EMBO J.* **24** (13): 2235-2243.
- Stura, E. A., Matsumura, M., Fremont, D. H., Saito, Y., Peterson, P. A. & Wilson, I. A. (1992): Crystallization of murine major histocompatibility complex class I H-2Kb with single peptides. *J. Mol. Biol.* **228** (3): 975-982.
- Suel, K. E., Cansizoglu, A. E. & Chook, Y. M. (2006): Atomic resolution structures in nuclear transport. *Methods* **39**: 342-355.
- Takizawa, C., Weis, K. & Morgan, D. (1999): Ran-independent nuclear import of cyclin B1-Cdc2 by importin beta. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96** (14): 7938-7943.
- Tiganis, T., Flint, A., Adam, S. A. & Tonks, N. (1997): Association of the T-cell protein tyrosine phosphatase with nuclear import factor p97. *J. Biol. Chem.* **272** (34): 21548-21557.
- Truant, R. & Cullen, B. R. (1999): The arginine-rich domains present in human immunodeficiency virus type 1 Tat and Rev function as direct importin beta-dependent nuclear localization signals. *Mol. Cell. Biol.* **19** (2): 1210-1217.
- Tucker, J., Sczakiel, G., Feuerstein, J., John, J., Goody, R. S. & Wittinghofer, A. (1986): Expression of p21 proteins in *Escherichia coli* and stereochemistry of the nucleotide-binding site. *EMBO J.* **5**: 1351-1358.
- Uguen, P. & Murphy, S. (2003): The 3' ends of human pre-snRNAs are produced by RNA polymerase II CTD-dependent RNA processing. *EMBO J.* **22** (17): 4544-4554.
- Uguen, P. & Murphy, S. (2004): 3'-box-dependent processing of human pre-U1 snRNA requires a combination of RNA and protein co-factors. *Nucleic Acids Res.* **32** (10): 2987-2994.

8. Literaturverzeichnis

van Hoof, A., Lennertz, P. & Parker, R. (2000): Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *EMBO J.* **19** (6): 1357-1365.

Vetter, I. R., Arndt, A., Kutay, U., Görlich, D. & Wittinghofer, A. (1999): Structural view of the Ran-Importin beta interaction at 2.3 Å resolution. *Cell* **97**: 635-646.

Will, C. L. & Lührmann, R. (2001): Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13** (3): 290-301.

Wohlwend, D. (2004): Expression, Aufreinigung und Kristallisation des Kernimportrezeptors Importin 7. Diplomarbeit, *Georg-August-Universität Göttingen*.

Wohlwend, D., Strasser, A., Dickmanns, A., Doenecke, D. & Ficner, R. (2007a): Thermodynamic analysis of H1 nuclear import: receptor tuning of importinbeta/importin7. *J. Biol. Chem.* **14**, 10707-10719.

Wohlwend, D., Strasser, A., Dickmanns, A. & Ficner, R. (2007b): Structural basis for RanGTP independent entry of spliceosomal U snRNPs into the nucleus. *J. Mol. Biol.* **374**: 1129-1138.

Xiao, Z., Liu, X. & Lodish, H. F. (2000): Importin beta mediates nuclear translocation of Smad 3. *J. Biol. Chem.* **275** (31): 23425-23428.

9. Anhang

9.1 Abbildungen

Imp7 mutant	scheme	vector	recombinant expression	purification established	Imp β binding	H1 binding (Imp β /Imp7: +++)	rpL23a import	H1 import (with Imp β)
Imp7 fl		pQE-80	++	+++	+++	++	+++	+++
Imp7N357		pQE-9	-	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Imp7N693		pQE-9	-	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Imp7N875		pQE-80	-	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Imp7N916		pQE-80	+	+/-	-	-	-	-
Imp7N1001		pQE-80	+	+++	-	++	+++	-
Imp7C75		pQE-80	-	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Imp7C358		pQE-80	++	+/-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Imp7C598		pGEX-6P-1	+++	+++	+++	++	n.i.	+
Imp7C665		pGEX-6P-1	+++	+	+++	++	n.i.	n.i.
Imp7C694		pGEX-6P-1	+++	+/-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Imp7C755		pGEX-6P-1	+++	+/-	+++	+	n.i.	n.i.
Imp7C824		pGEX-6P-1	+++	+/-	+++	+	n.i.	n.i.
Imp7C849		pGEX-6P-1	+++	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Imp7C876		pGEX-6P-1	+++	+/-	+++	-	n.i.	n.i.
Imp7C917		pGEX-6P-1	+++	+/-	+++	-	n.i.	n.i.
Imp7C922		pGEX-6P-1	+++	+/-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Imp7C1002		pGEX-6P-1	+++	+++	+++	-	n.i.	n.i.
Imp7_75-1001		pQE-80	-	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Imp7_694-1001		pGEX-6P-1	-	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Imp7_876-1001		pGEX-6P-1	+++	+	-	-	n.i.	n.i.
Imp7_917-1001		pGEX-6P-1	+++	+	-	-	n.i.	n.i.
Imp7_876-916		pGEX-6P-1	+++	+	-	-	n.i.	n.i.
Imp7 Δ 876-915		pQE-9	+	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.
Imp7 Δ 917-1001		pQE-9	-	-	n.i.	n.i.	n.i.	n.i.

Abb. A1: Liste aller verfügbaren Imp7-Fragmente.

Die Tabelle zeigt zusätzlich die Charakteristika aller Deletionsfragmente in Bezug auf Möglichkeit der Expression und Reinigung, sowie der eventuell getesteten Bindungen an Imp β und H1. Zusätzlich wird auch noch die Funktionalität bei in-vitro-Kernimportexperimenten dargestellt. (+++) bedeutet: ohne Einschränkung oder Wildtyp-Niveau, (-) bedeutet nicht möglich. Dazwischen wird abgestuft. *No indication* (n.i.) steht für "kein Befund". Wie gezeigt, konnten nicht alle Deletionen gereinigt werden. (+/-) bedeutet, daß entweder Probleme mit der Löslichkeit nach dem Verdau des Fusionsproteins oder eine Aggregation der Deletionskonstrukte auftraten. Dennoch konnte in den Fällen von Imp7_876-1038 (Imp7C876) und Imp7_917-1038 (Imp7C917) eine Interaktion mit Imp β verifiziert werden, da es in diesem Fall in der Lage war, die aggregierten Proteine zu lösen. Eine Bindung an H1 konnte für beide Proteine aber nicht detektiert werden. Bei den Konstrukten Imp7_358-1038 (Imp7C358), Imp7_694-1038 (Imp7C694) und Imp7_922-1038 (Imp7C922) konnten die Probleme mit Aggregation nicht überwunden werden. Diese Konstrukte sind nicht funktionell. Farbgebung der Schemata: Grün ist die Ran-Bindungsstelle, Rot die erste saure Schleife (AS 882-912), Orange die zweie (AS 927-957), Gelb ist IBB₇ (AS 1008-1038), Blau ist das restliche Polypeptid.

9. Anhang

A: Alignment of H1 subtypes with CLUSTALW:

CLUSTAL FORMAT for T-COFFEE Version_1.41, CPU=1.77 sec, SCORE=55, Nseq=3, Len=229

```

H1.0      mtensts-----apaakp-----krakaskkstdhpkysdmivaaiaeknra
H1.2      MSETAPA-----APAAAPPAEKAPVKKKAACKAGGTPRKASGPPVSEELITKAVAASKERS
H1.11L    msetapapaaeapaaapapakaakpkkaaggakarkpagpsvtelitkavsakerk
          *:.:.:.:      **** *      . . . . . *      :.:*. * : *.*:*

H1.0      gssrqsiqukyikshykvgenadsqiklsikrlvttgvlkqtkgvgasgsfrlak---sde
H1.2      GVSLAALKKALAAAGYDVEKNNSRIKLGKLSLVSKGTLVQTKGTGASGSFKLNKKAASGE
H1.11L    glslaalkkalaaggydveknnsriklgklslvskgtlvqtkgtgasgsfrlskkpgvkv
          * *      :.:* : :      * : :.*:***.:* * :.*.* * **.*.***:.* * . :

H1.0      pk---ksvafkktkkekikvatpkkas---kpkaaskaptkkpkatpvkkakkklaatp
H1.2      AKPKVKKAGGTPKPKPVGAACKPKKAAGGATPKKSAAKTP--KKAKKPAATVTKKVAKSP
H1.11L    ekapkkkasaakpkp--aakpaaaakpkkavavkkspp--kkakppaa--satkksaksp
          *      *.. . *.* * . * * * : . . . . . * * * * . . . * * * : *

H1.0      kkak---kptv-kak-pv--kaskpkakp--vkpkaksakragkkk
H1.2      KKA-KVAKPKKA-AK-SA--AKAVKPKAAKPKVVKPK-----KAAPKKK
H1.11L    kkvtkavkpkkavaakspakakavkpaakpkaakpkaakakkaakkaak
          ** .      ***.. .      .      ** * * * * * * .***      * * * *
  
```

Identity of H1⁰ and H1.2: 43%
 Identity of H1⁰ and H1.11L: 41%

B: Alignment of H1 subtypes with T-COFFEE:

T-COFFEE, Version_1.41(Fri Jun 28 14:24:48 MDT 2002) Notredame, Higgins, Heringa,
 JMB(302)pp205-217,2000, CPU TIME:1 sec.
 SCORE=55

```

*
BAD  AVG  GOOD
*
H1.0      : 51
H1.2      : 57
H1.11L    : 57

H1.0      MTENSTS-----APAAKP-----KRAKASKKSTDHPKYSDMIVAAIQAEKNRAGSS
H1.2      MSETAPA-----APAAAPPAEKAPVKKKAACKAGGTPRKASGPPVSEELITKAVAASKERSGV
H1.11L    MSETAPAPAAEAPAAAPAPAKAAAKPKKAAGGAKARKPAGPSVTEELITKAVSASKERKGLS
Cons      *:.:.:.:      **** *      . . . . . *      :.:*. * : *.*:* *

H1.0      RQSIQKYIKSHYKVGENDSQIKLSIKRLVTTGVLKQTKGVLGASGSFRLAK---SDEPK---K
H1.2      LAALKKALAAAGYDVEKNNSRIKLGKLSLVSKGTLVQTKGTGASGSFKLNKKAASGEAKPKVK
H1.11L    LAALKKALAAAGYDVEKNNSRIKLGKLSLVSKGTLVQTKGTGASGSFRLSKKPGEVKEKAPKK
Cons      :.:* : :      * : :.*:***.:* * :.*.* * **.*.***:.* * . : *

H1.0      SVAFKKTKKEIKKVATPKKAS---KPKAASKAPTKKPKATPVKKAKKKLAATPKKAK---KP
H1.2      KAGGTPKPKPVGAACKPKKAAGGATPKKSAAKTP--KKAKKPAATVTKKVAKSPKKA-KVAKP
H1.11L    KASAAKPKKE--AAKPPAAAKPKKAVAVKSE--KKAKKPAASATKKSARKSPKRVTKAVKE
Cons      .. . *.* * . * * * : . . . . . * * * * . . . * * * : * * *

H1.0      KTV-KAK-PV--KASKPKKAKE--VKPKAKSSAKRAGKKK
H1.2      KKA-AK-SA--AKAVKPKAAKPKVVKPK-----KAAPKKK
H1.11L    KKAVAAKSPAKAKAVKPKAAKPKAAKPKAAKAKKAAAKKK
Cons      *.. .      .      ** * * * * * * .***      * * * *
  
```

Abb. A2: Sequenzvergleiche von H1⁰ (*H. sapiens*), H1.2 (*B. taurus*) und H1.11L (*G. gallus*).
 (A) Sequenzvergleich mit CLUSTALW. (B) Sequenzvergleich mit T-COFFEE. Die Vergleiche enthüllen eine eher geringe Konservierung der N-Termini innerhalb der verschiedenen H1-Subtypen mit einigen Ähnlichkeiten, aber nur wenigen Identitäten. Die zentralen Bereiche und die C-Termini dagegen sind hoch konserviert. In der Consensus-Zeile zeigt ein einzelner Punkt(.) eine Konservierung mit einem *score* ≤ 0.5 nach der Gonnet Pam250 Matrix an, ein Doppelpunkt (:) bedeutet eine Konservierung mit einem *score* > 0.5, ein Stern (*) bedeutet Identität.

9.2 Tabellen

Tab. A1: Quantifizierung der Immunfluoreszenz in den Nuclei

Nuclear immunofluorescence of the negative control

	Area	Mean	Min	Max	without background (negative control)
Mean	0.112	21,030	19	23,350	0.000
SD	0.025	1,235	1,013	1,805	
Min	0.083	18,519	17	20	
Max	0.179	22,927	21	27	

Nuclear immunofluorescence of 0.2 μ M ImpBeta-His/His-Imp7

	Area	Mean	Min	Max	without background (negative control)
Mean	0.118	24,601	20,625	28,425	3.571
SD	0.024	1,504	1,213	2,049	
Min	0.065	21,932	18	25	
Max	0.167	28,143	23	33	

Nuclear immunofluorescence of 0.2 μ M ImpBeta-His/Imp7_598-C

	Area	Mean	Min	Max	without background (negative control)
Mean	0.13	24,491	20,975	27,825	3.461
SD	0.031	1,376	1,209	1,738	
Min	0.077	22,522	19	25	
Max	0.21	28,527	24	33	

Nuclear immunofluorescence of 0.2 μ M ImpBeta-His/His-Imp7_598-C

	Area	Mean	Min	Max	without background (negative control)
Mean	0.133	24,270	20,525	27,825	3.240
SD	0.028	1,209	0.987	1,708	
Min	0.082	21,965	18	25	
Max	0.204	27,256	22	32	

Nuclear immunofluorescence of 2 μ M ImpBeta-His/His-Imp7

	Area	Mean	Min	Max	without background (negative control)
Mean	0.115	26,155	21,975	30,050	5.125
SD	0.027	2,163	1,250	3,258	
Min	0.074	23,210	20	25	
Max	0.177	33,416	25	42	

9.3 Skripte für die Datenprozessierung

XDS input file

```

!*****
! File XDS.INP containing named arguments for running XDS (arbitrary order).
! Characters in a line to the right of an exclamation mark are comment.
!*****
!***** Example for MAR 165mm CCD-detector at BESSY beamline BL14-2 *****
!***** 06.06.2007 *****
!*****
!Standard settings for the MAR CCD that rarely need to be changed

DETECTOR=CCDCHESS          MINIMUM_VALID_PIXEL_VALUE=0          OVERLOAD=65000
!DIRECTION_OF_DETECTOR_X-AXIS=cos(2theta),0,sin(2theta)
DIRECTION_OF_DETECTOR_X-AXIS= 1.0 0.0 0.0
DIRECTION_OF_DETECTOR_Y-AXIS= 0.0 1.0 0.0
TRUSTED_REGION=0.0 0.99 !Relative radii limiting trusted detector region
!File name, access, format of dark-current (non-Xray background) image
!DARK_CURRENT_IMAGE=./images/blank.tif !hardly ever used

MAXIMUM_NUMBER_OF_JOBS=1 !Speeds-up COLSPOT & INTEGRATE on a Linux-cluster
MAXIMUM_NUMBER_OF_PROCESSORS=3 !<25; ignored by single cpu version of xds
!MINUTE=0 !Maximum number of minutes to wait until data image must appears
!MINUTE>0 implies that only one processor will be used
!TEST=1 !Test flag. 1,2 additional diagnostics and images

!NX=number of fast pixels (along X); QX=length of an X-pixel (mm)
!NY=number of slow pixels (along Y); QY=length of a Y-pixel (mm)
!NX=3072 NY=3072 QX=0.07345 QY=0.07345 !MARCCD 225mm version at Argonne 22ID
!NX=2048 NY=2048 QX=0.079 QY=0.079 !MARCCD 165mm version
!NX=2048 NY=2048 QX=0.064 QY=0.064 !MARCCD 133mm version
!NX=1024 NY=1024 QX=0.0508 QY=0.0508 !CCD at CHESS

!
! Do not forget to define ORGX and ORGY, which are app. ORGX=NX/2, ORGY=NY/2

!===== JOB CONTROL PARAMETERS =====
JOB= ALL !XYCORR INIT COLSPOT IDXREF DEFPIX XPLAN INTEGRATE CORRECT

!===== GEOMETRICAL PARAMETERS =====
NX=2048 NY=2048 QX=0.079 QY=0.079 !MARCCD 165mm version
ORGX=1036.00 ORGY=1030.00 !Detector origin (pixels). ORGX=NX/2; ORGY=NY/2
DETECTOR_DISTANCE= 180.77 ! (mm)

ROTATION_AXIS= 1.0 0.0 0.0
OSCILLATION_RANGE=1.0 !degrees (>0)

X-RAY_WAVELENGTH=0.91841 !Angstroem
INCIDENT_BEAM_DIRECTION=0.0 0.0 1.0
FRACTION_OF_POLARIZATION=0.99 !default=0.5 for unpolarized beam;0.90 at DESY;
POLARIZATION_PLANE_NORMAL= 0.0 1.0 0.0
AIR=0.001 !Air absorption coefficient of x-rays

!===== CRYSTAL PARAMETERS =====
SPACE_GROUP_NUMBER=0 !0 for unknown crystals; cell constants are ignored.
UNIT_CELL_CONSTANTS= 64.160 78.970 208.240 90.00 90.00 90.00

!Optional reindexing transformation to apply on reflection indices
!REIDX= 0 0 -1 0 0 -1 0 0 -1 0 0 0

!===== DATA COLLECTION STRATEGY (XPLAN) =====

```

9. Anhang

```
!                                     !!! Warning !!!
! If you processed your data for a crystal with unknown cell constants and
! space group symmetry, XPLAN will report the results for space group P1.

!FRIEDEL'S_LAW=FALSE !Default is TRUE.

!STARTING_ANGLE= 0.0      STARTING_FRAME=1
!used to define the angular origin about the rotation axis.
!Default:  STARTING_ANGLE= 0 at STARTING_FRAME=first data image

!RESOLUTION_SHELLS=10 6 5 4 3 2 1.5 1.3 1.2

!STARTING_ANGLES_OF_SPINDLE_ROTATION= 0 180 10

!TOTAL_SPINDLE_ROTATION_RANGES=30.0 120 15

!REFERENCE_DATA_SET= CK.HKL      !Name of a reference data set (optional)

!===== SELECTION OF DATA IMAGES =====
!Generic file name, access, and format of data images
NAME_TEMPLATE_OF_DATA_FRAMES=c127ibb_3ds_01???.img DIRECT  TIFFF

DATA_RANGE=1 119      !Numbers of first and last data image collected

BACKGROUND_RANGE=1 9  !Numbers of first and last data image for background

!SPOT_RANGE=1 9      !First and last data image number for finding spots
!Up to 10 SPOT_RANGE= parameters can be specified

!===== INDEXING PARAMETERS =====
!Never forget to check this, since the default 0 0 0 is almost always correct!
!INDEX_ORIGIN= 0 0 0      ! used by "IDXREF" to add an index offset

!Additional parameters for fine tuning that rarely need to be changed
!INDEX_ERROR=0.05 INDEX_MAGNITUDE=8 INDEX_QUALITY=0.8
!SEPMIN=6.0 CLUSTER_RADIUS=3
!MAXIMUM_ERROR_OF_SPOT_POSITION=3.0

!===== CRITERIA FOR ACCEPTING REFLECTIONS =====
VALUE_RANGE_FOR_TRUSTED_DETECTOR_PIXELS= 6000 30000 !Used by DEFPIX
!for excluding shaded parts of the detector.

INCLUDE_RESOLUTION_RANGE=40.0 0.0 !Angstroem; used by DEFPIX,INTEGRATE,CORRECT

!used by CORRECT to exclude ice-reflections
!EXCLUDE_RESOLUTION_RANGE= 3.93 3.87 !ice-ring at 3.897 Angstrom
!EXCLUDE_RESOLUTION_RANGE= 3.70 3.64 !ice-ring at 3.669 Angstrom
!EXCLUDE_RESOLUTION_RANGE= 3.47 3.41 !ice-ring at 3.441 Angstrom
!EXCLUDE_RESOLUTION_RANGE= 2.70 2.64 !ice-ring at 2.671 Angstrom
!EXCLUDE_RESOLUTION_RANGE= 2.28 2.22 !ice-ring at 2.249 Angstrom

!WFAC1=1.0 !This controls the number of rejected MISFITS in CORRECT;
!a larger value leads to fewer rejections.

!MINIMUM_ZETA= 0.15 ! Exclusion of reflection near the Blind region
! The default is MINIMUM_ZETA=0.15

!===== INTEGRATION AND PEAK PROFILE PARAMETERS =====
!Specification of the peak profile parameters below overrides the automatic
!determination from the images
!Suggested values are listed near the end of INTEGRATE.LP
!BEAM_DIVERGENCE= 0.80      !arctan(spot diameter/DETECTOR_DISTANCE)
!BEAM_DIVERGENCE_E.S.D.= 0.080 !half-width (Sigma) of BEAM_DIVERGENCE
!REFLECTING_RANGE= 0.780 !for crossing the Ewald sphere on shortest route
!REFLECTING_RANGE_E.S.D.= 0.113 !half-width (mosaicity) of REFLECTING_RANGE
```

9. Anhang

```
!NUMBER_OF_PROFILE_GRID_POINTS_ALONG_ALPHA/BETA=9 !used by: INTEGRATE
!NUMBER_OF_PROFILE_GRID_POINTS_ALONG_GAMMA= 9      !used by: INTEGRATE

!CUT=2.0      !defines the integration region for profile fitting
!MINPK=75.0 !minimum required percentage of observed reflection intensity
!DELPHI= 5.0!controls the number of reference profiles and scaling factors

!PATCH_SHUTTER_PROBLEM=TRUE          !FALSE is default
!STRICT_ABSORPTION_CORRECTION=FALSE !TRUE  is default

!===== PARAMETERS CONTROLLING CORRECTION FACTORS (used by: CORRECT) =====
!MINIMUM_I/SIGMA=3.0 !minimum intensity/sigma required for scaling reflections
!NBATCH=-1 !controls the number of correction factors along image numbers
!REFLECTIONS/CORRECTION_FACTOR=50 !minimum #reflections/correction needed
!PATCH_SHUTTER_PROBLEM=TRUE          !FALSE is default
!STRICT_ABSORPTION_CORRECTION=FALSE !TRUE  is default

!===== PARAMETERS DEFINING BACKGROUND AND PEAK PIXELS =====
!STRONG_PIXEL=3.0                      !used by: COLSPOT
!A 'strong' pixel to be included in a spot must exceed the background
!by more than the given multiple of standard deviations.

!MAXIMUM_NUMBER_OF_STRONG_PIXELS=1500000 !used by: COLSPOT

!SPOT_MAXIMUM-CENTROID=3.0             !used by: COLSPOT

!MINIMUM_NUMBER_OF_PIXELS_IN_A_SPOT=6 !used by: COLSPOT
!This allows to suppress spurious isolated pixels from entering the
!spot list generated by "COLSPOT".

!NBX=3 NBY=3 !Define a rectangle of size (2*NBX+1)*(2*NBY+1)
!The variation of counts within the rectangle centered at each image pixel
!is used for distinguishing between background and spot pixels.

!BACKGROUND_PIXEL=6.0                  !used by: COLSPOT,INTEGRATE
!An image pixel does not belong to the background region if the local
!pixel variation exceeds the expected variation by the given number of
!standard deviations.

!SIGNAL_PIXEL=3.0                      !used by: INTEGRATE
!A pixel above the threshold contributes to the spot centroid

!===== PARAMETERS CONTROLLING REFINEMENTS =====
!REFINE(IDXREF)=BEAM AXIS ORIENTATION CELL !DISTANCE
!REFINE(INTEGRATE)=!DISTANCE BEAM ORIENTATION CELL !AXIS
!REFINE(CORRECT)=DISTANCE BEAM ORIENTATION CELL AXIS
```

XSCALE input file

```
MAXIMUM_NUMBER_OF_PROCESSORS=16!<33;ignored by single cpu version of xscale

RESOLUTION_SHELLS= 9 7 5.5 4.5 3.8 3.4 3.1 2.93 2.84
SPACE_GROUP_NUMBER=16
UNIT_CELL_CONSTANTS=64.21 79.02 208.40 90.00 90.00 90.00
!REIDX=-1 0 0 0 0 -1 0 0 0 0 -1 0

!REFLECTIONS/CORRECTION_FACTOR=50 !minimum #reflections/correction_factor

!0-DOSE_SIGNIFICANCE_LEVEL=0.10

!Defines first scaled data set (at minimum of f')
OUTPUT_FILE=c127ibb119P222.ahkl FRIEDEL'S_LAW=TRUE
```

9. Anhang

```
!file-name, type, resolution range, (WEIGHT=), (DELFRM=), (NBATCH=)
  INPUT_FILE= XDS_ASCII.HKL XDS_ASCII 50 2.84
!CORRECTIONS= DECAY MODULATION ABSORPTION
!CRYSTAL_NAME=Selenol !Remove first "!" to switch on 0-dose extrapolation
!STARTING_DOSE=0.0 DOSE_RATE=1.0 !Use defaults for 0-dose extrapolation
```

XDSCONV input file

```
SPACE_GROUP_NUMBER=16
UNIT_CELL_CONSTANTS= 64.21 79.02 208.40 90.00 90.00 90.00

!name, type, and resolution window (for accepting reflections) of XDS-file
INPUT_FILE=c127ibb119P222.ahkl XDS_ASCII 50 2.3

!This omits reflections with I/sigma(I) below a specified cut-off
!NEGATIVE_INTENSITY_CUTOFF=-3

!File-name, target software-package, and validity of Friedel's law
OUTPUT_FILE=c127ibbP222.hkl SHELX FRIEDEL'S_LAW=TRUE

!This creates new test-reflections from a fraction of the input reflections
!GENERATE_FRACTION_OF_TEST_REFLECTIONS=0.05

!If you want to keep old test-reflections (all or only a fraction of them)
!INHERIT_TEST_REFLECTIONS_FROM_FILE=old.hkl SHELX
!INHERIT_FRACTION_OF_TEST_REFLECTIONS=1.0 !Default is to keep them all (1.0)

!Specify whether intensity data obey Wilson statistics or not. Optional.
WILSON_STATISTICS=TRUE !Default is TRUE
```

10. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde von Juni 2004 bis November 2007 in der Abteilung für Molekulare Strukturbiologie des Mikrobiologischen Instituts der Georg-August-Universität Göttingen angefertigt.

Bei Herrn Prof. Dr. Ralf Ficner bedanke ich mich herzlich für das hochinteressante wissenschaftliche Thema und seine stete Unterstützung, aber auch seine klare Anleitung und Begeisterung, insbesondere in der Kristallographie.

Herrn Prof. Dr. Oliver Einsle bin ich zu aufrichtigstem Dank für die Übernahme des Koreferats und zahlreiche Hilfestellungen verpflichtet, mögen die Haare auf seinen Zehen niemals ausfallen.

Herrn Dr. Achim Dickmanns danke ich mit tiefem Respekt für die große, fachliche Unterstützung in Bezug auf alles, was auch nur im Entferntesten mit Kerntransport zu tun hat. Außerdem bin ich ihm für die gewaltige psychologische Stütze dankbar, die er mir stets bot.

Frau Dr. Anja Strasser danke ich für drei Jahre einer wundervollen und heiteren Kooperation, die sich nicht zuletzt in den gemeinsam erreichten Publikationen niederschlug. Darüber hinaus verdient sie meine tiefste Verehrung dafür, daß sie bisweilen versucht war, mich zu erschlagen, stets aber Langmut unter Beweis stellte und davon abließ.

Herrn Dr. Markus Rudolph danke ich für die erhellenden Diskussionen über die Thermodynamik und für die Einsicht, daß es Magier auf dem Gebiet der Zahlen gibt.

Thomas Monecke gebührt ebenso Dank für die zahlreichen wissenschaftlichen Diskussionen, die tolle und in der Tat besondere Atmosphäre des Transportlabors (hierfür auch nochmal tausend Dank an Achim, Anja, Britta, Christian und Steffl!). Außerdem weiß ich jetzt, daß Brüllaffen nicht die lautesten Säuger auf unserem Planeten sind.

Kristina Lakomek, Denis Kudlinzki, Daniel Heitmann und Eike Schulz bin ich für die Unterstützung bei allerlei graphischen Problemen dankbar, Eike und Denis auch besonders für die einprägsame Synchronzeit.

Herrn Prof. Dr. Detlef Doenecke, Herrn Dr. Ralf Kehlenbach und Herrn Dr. Jörg Kahle danke ich für die Möglichkeit, *import assays* in ihren Labors durchführen zu können.

Nicht zuletzt bin ich meinen Eltern und Brüdern für ihre vielgestaltete Unterstützung während der Promotionszeit unendlich dankbar.

Und natürlich gehen mindestens 1320tausend Dankeschöns und Entschuldigungen an Marie, die leider die unvermeidlichen Hoch- und Tiefphasen während dieser Arbeit voll ausbaden mußte, und trotz allem immer für mich da war!

Lebenslauf

Name: Daniel Wohlwend
Adresse: Porscheweg 8
37075 Göttingen
E-mail: dwohlwe@gwdg.de

Geboren am 22.05.1979 in München

Staatsangehörigkeit: deutsch

Bildungsweg:

1985-1986	Volksschule Kiefersfelden (Bayern)
1986-1989	Schloßschule Karlsruhe-Durlach (Baden-Württemberg)
1989-1991	Helmholtz-Gymnasium Karlsruhe (Baden-Württemberg)
1991-1993	Gymnasium im Schulzentrum Nieder-Olm (Rheinland-Pfalz)
1993-1998	Helmholtz-Gymnasium Karlsruhe (Baden-Württemberg)
23. Juni 1998	Abitur
10/1998 – 09/1999	Studium der Elektrotechnik (Diplom) an der Universität Karlsruhe (TH)
10/1999 – 09/2001	Studium der Biologie (Diplom) an der Universität Karlsruhe (TH)
10/2001 – 03/2004	Studium der Biologie (Diplom) an der Georg-August-Universität Göttingen
30. März 2004	Diplom der Biologie
06/2004 – 01/2008	Promotionsstudium an der Fakultät für Biologie der Georg-August-Universität Göttingen unter der Anleitung von Prof. Dr. Ralf Ficner