

Aus der Abteilung für
Nephrologie / Hypertensiologie
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. F.C. Luft)

HELIOS Klinikum / Franz-Volhard-Klinik, Charité, Humboldt-Universität zu Berlin

**Identifikation, Klonierung und funktionelle Charakterisierung neuer
Isoformen der humanen Importin α Proteinfamilie**

Habilitationsschrift
zur Erlangung der venia legendi
für das Fach Innere Medizin

vorgelegt dem Fakultätsrat der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von Dr. med. Matthias Köhler
geboren am 24. Februar 1967
in Bayreuth

Präsident: Prof. Dr. rer. nat. J. Mlynek

Dekan: Prof. Dr. med. J.W. Dudenhausen

Eingereicht am: 13.03.2003

Habilitation am: 04.12.2003

Gutachter: 1. Prof. Dr. Florian Lang
2. HD. Dr. Ralph Lucius

Widmung

Πάντων χρημάτων μέτρον ἐστὶν ἄνθρωπος.

Protagoras

Meiner Frau Alexandra
in Liebe

Inhaltsverzeichnis

- I. Ausführliche Zusammenfassung der zugrundeliegenden Publikationen
 1. Zusammenfassung
 2. Einleitung
 - 2.1 Bedeutung und Mechanismen des nukleozytoplasmatischen Proteintransports
 - 2.2 Zielstellungen
 3. Ergebnisse
 - 3.1 Identifikation, Klonierung und Sequenzierung neuer humaner Importin α Isoformen (V1, V2)
 - 3.2 Einteilung der humanen Importin α Isoformen in unterschiedliche Subfamilien (V1, V2)
 - 3.3 Analyse der Importin α Expression in humanen Zellen und Geweben (V1, V2, V6, V8)
 - 3.4 Rekombinante Expression und Aufreinigung der humanen α -Importine (V2)
 - 3.5 In vitro Funktionsanalysen der humanen α -Importine
 - 3.5.1 Vergleich der Bindungsaffinitäten der neu beschriebenen humanen α -Importine zu Importin β und CAS in vitro (V2)
 - 3.5.2 Nachweis der Importfunktion und unterschiedlicher Substratspezifitäten der humanen α -Importine in vitro (V2, V4, V5, V7)
 - 3.5.3 Identifikation weiterer Importin α Substrate und in vitro Analyse ihres nukleozytoplasmatischen Importmechanismus
 - 3.5.3.1 In vitro Analyse des Importmechanismus von RanBP3 (V4)
 - 3.5.3.2 In vitro Analyse des nukleozytoplasmatischen Imports von Untereinheiten des nascent polypeptide-associated complex (NAC) in der Hefe (V5)
 - 3.5.3.3 In vitro Analyse des Importmechanismus viraler Proteine (V7)
 - 3.6 Untersuchungen zur Regulation der α -Importin Expression in Abhängigkeit von Zellproliferation, -differenzierung und pathophysiologischen Zuständen
 - 3.6.1 Analyse der Importin α Expression bei diabetischer Nephropathie (V6)
 - 3.6.2 Analyse der Regulation der Importin α Expression in Abhängigkeit von Zellproliferation und -differenzierung (V8)
 - 3.7 Einfluss der spezifischen Inhibition einzelner Importin α Isoformen auf die Proliferation kultivierter humaner Zellen (V9)
 4. Diskussion und Ausblick
 5. Literaturverzeichnis
 6. Danksagung
- II. Der ausführlichen Zusammenfassung zugrundeliegende Publikationen

I. Ausführliche Zusammenfassung der zugrundeliegenden Publikationen

1. Zusammenfassung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die Identifikation, Klonierung und funktionelle Charakterisierung neuer humaner Importin α Isoformen. Die zentrale Bedeutung der Translokation diverser Proteine aus dem Zytoplasma in den Zellkern für das weitere Schicksal der Zelle ist intensiv untersucht. Aktivierte Transkriptionsfaktoren, aber auch andere Proteine wie Kernrezeptoren, Histone, ribosomale und virale Proteine können erst im Zellkern ihre wichtigen Funktionen wie z. B. die Regulation der Expression unterschiedlicher Gene erfüllen. Die Faktoren, welche den eigentlichen Transport in den Zellkern steuern, ist jedoch erst seit kurzem Gegenstand der Forschung. Der „klassische“ Proteinimport in den Zellkern erfolgt in Abhängigkeit der Importine α und β . Während jedoch nur ein Importin β existiert, waren zu Beginn der vorliegenden Arbeit bereits zwei humane α -Importine bekannt. Datenbankanalysen ergaben Hinweise auf die Existenz weiterer humaner Isoformen. Im ersten Teil der Arbeit konnten vier neue humane α -Importine identifiziert, ihre komplette kodierende DNA kloniert und sequenziert werden. Anhand ihrer Primärstruktur konnten die sechs humanen α -Importine in drei Subfamilien unterteilt werden. Die Frage, warum so viele humane α -Importine existieren, während es in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* nur eine Isoform gibt, stand im Zentrum der weiteren Untersuchungen. Es sollte die Hypothese getestet werden, dass sich die verschiedenen humanen α -Importine in ihren spezifischen Funktionen unterscheiden und sich nicht gegenseitig ersetzen können. Analysen der Expression mittels Northern blot auf RNA-Ebene sowie im Western blot auf Proteinebene mittels selbst generierter polyklonaler, affinitätsgereinigter Antikörper zeigten differentielle Expressionsmuster der verschiedenen α -Importine. Dabei ließen sich alle Isoformen außer dem testisspezifischen Importin $\alpha 6$ in zahlreichen Geweben und Zellen nachweisen, wobei ihre relativen Expressionsstärken zum Teil deutlich untereinander differierten. Mittels eines in vitro Kernimport-Versuchssystems konnte der Nachweis erbracht werden, dass alle ubiquitär exprimierten humanen α -Importine tatsächlich als Kernimportfaktoren für diverse Proteine fungieren können. Mehrere neue Substrate wurden hierbei für den klassischen Importweg entdeckt. Besonders intensiv untersucht wurden die Mechanismen, welche die Translokation der verschiedenen Untereinheiten des Hefe-NAC-Komplexes in den Zellkern regulieren. Neben dem Nachweis der tatsächlichen Kernlokalisierung von NAC konnte nachgewiesen werden, dass die unterschiedlichen NAC-Untereinheiten sowohl via den klassischen Importin α/β -abhängigen Importweg als auch über zwei andere Importin β -verwandte Importfaktoren aus dem Zytoplasma in den Zellkern

translozieren können. Die Region, in der sich die hierfür verantwortliche Signalsequenz (nuclear localization signal, NLS) befindet, konnte ebenfalls bestimmt werden. Neben der differierenden Zell- und Gewebeverteilung konnte vor allem durch den Nachweis unterschiedlicher Substratspezifitäten *in vitro* ein weiterer wichtiger Hinweis für die postulierten spezifischen Funktionen der α -Importine *in vivo* gefunden werden. Interessanterweise fanden sich Hinweise auf substratspezifische Unterschiede der humanen α -Importine sowohl für zelleigene Proteine (z.B. RCC1, RanBP3) als auch für virale Proteine (adenovirales E1A). Der Nachweis von Unterschieden in der Expressionsregulation der α -Importine in verschiedenen Modellen von Zellproliferation und Zelldifferenzierung wurde als ein weiteres Indiz für spezifische Funktionen der verschiedenen Isoformen *in vivo* gewertet. Erste Untersuchungen bzgl. möglicher pathophysiologischer Rollen der α -Importine wurden an zwei unterschiedlichen diabetischen Rattenmodellen durchgeführt. Durch Immunfluoreszenz- und Western blot-Analysen konnte ein deutlicher Anstieg insbesondere der Importin $\alpha 7$ -Expression in Nieren diabetischer Ratten nachgewiesen werden. Mit Hilfe der neu beschriebenen RNA-Interferenz Methode konnten schließlich die einzelnen α -Importine selektiv in kultivierten HeLa-Zellen in ihrem Expressionsniveau stark reduziert werden. Die Inhibition der Expression von Importin $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$ sowie der Positivkontrolle Importin β führte zu jeweils ausgeprägten Inhibitionen der zellulären Proliferation. Die Inhibition von Importin $\alpha 1$ hatte dagegen nur einen geringen, die Inhibition von Importin $\alpha 4$ überhaupt keinen inhibitorischen Effekt auf das Wachstum der analysierten Zellen. Damit konnte zum ersten Mal der Nachweis erbracht werden, dass die humanen α -Importine in lebenden Zellen essentielle Funktionen innehaben und sich trotz ihrer teilweise sehr hohen Homologie nicht vollständig gegenseitig ersetzen können. Weitere Untersuchungen, durch welche die Ursachen der unterschiedlichen Substratspezifitäten genauer analysiert werden sollen, Untersuchungen über die Rolle der humanen α -Importine bei der Pathogenese von Erkrankungen sowie über die Rolle der α -Importine in Gesamtorganismen („knock-out Mäuse“) sind derzeit in Arbeit.

2. Einleitung

2.1 Bedeutung und Mechanismen des nukleozytoplasmatischen Proteintransports

Die Trennung von nukleärem und zytoplasmatischem Kompartiment durch die Kernmembran ist das Charakteristikum eukaryoter Zellen. Diese Kompartimentierung erfordert die Existenz von Mechanismen, welche einen Stoffaustausch von Makromolekülen zwischen Nukleoplasma und Zytoplasma ermöglichen. Eine Vielzahl von Faktoren unterliegen dem nukleozytoplasmatischen Transport: Transkriptionsfaktoren, Kernrezeptoren, Histone, ribosomale Proteine, aber auch virale Proteine translozieren aus dem Zytoplasma in den Zellkern, um dort diverse Funktionen wie z. B. die Regulation der Expression unterschiedlichster Gene auszuüben. Einige dieser Proteine, aber auch die verschiedenen transfer, ribosomalen und messenger RNAs müssen aus dem Zellkern in das Zytoplasma exportiert werden. Die Mechanismen, welche über extrazelluläre Stimuli via membrangebundene Rezeptoren zu einer Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden mit nachfolgender nukleärer Translokation diverser Transkriptionsfaktoren und daraus resultierender Genregulation führen, sind bereits seit längerer Zeit Gegenstand intensiver zellbiologischer und medizinischer Forschung. Eine Vielzahl von wissenschaftlichen Arbeiten hat die Bedeutung von nukleären Proteinen wie NF κ B, Cyclinen, Stat- und Smad-Proteinen für die Regulation von Zellproliferation und -differenzierung sowie bei der Pathogenese chronisch-entzündlicher Erkrankungen unterstrichen. Demgegenüber ist die Erforschung der Faktoren, welche den nukleozytoplasmatischen Transport von Makromolekülen regulieren, ein sehr junges Forschungsgebiet, auf dem jedoch in der letzten Dekade ein explosiver Wissenszuwachs erfolgte.

1958 beschrieb L. Goldstein eine damals überraschende Beobachtung: Er transplantierte Zellkerne von Amöben, die radioaktiv-markierte Proteine enthielten, in Amöben mit unmarkierten Zellkernen. Bereits nach vier Stunden waren in den vormals unmarkierten Zellkernen radioaktive Signale nachweisbar, während im Zytoplasma nur eine geringe Radioaktivität erkennbar war. Goldstein folgerte richtig daraus, dass es eines oder mehrere nukleäre Proteine geben müsse, „die vom Zellkern in das Zytoplasma migrieren, dort kurz verweilen, um dann rasch wieder in den Nukleus zurückzukehren“ (Goldstein, 1958). Mehr als 20 Jahre später konnte erstmals eine Signalsequenz beschrieben werden, die für den Transport eines Proteins in den Zellkern essentiell ist: Eine Mutation in einer kurzen Folge basischer Aminosäuren des großen SV40 T Antigens verhindert dessen nukleäre Translokation. Umgekehrt führt die Fusion dieser als „klassischen“ NLS (nukleäres Lokalisationssignal) bezeichneten Signalsequenz an ein sonst zytoplasmatisches Protein zu dessen Akkumulation im Zellkern

(Kalderon et al., 1984, Lanford und Butel, 1984). Der zweite, sogenannte zweigeteilte Prototyp einer „klassischen“ NLS wurde erstmals in dem *Xenopus laevis* Protein Nucleoplasmin beschrieben und besteht aus zwei kurzen basischen Sequenzen, die durch eine Folge von ca. zehn Aminosäuren voneinander getrennt sind (Robbins et al., 1991). Mittlerweile wurden auch andere „nicht-klassische“ NLS beschrieben, die sich von den klassischen NLS deutlich unterscheiden, aber ebenfalls den Transport von Proteinen in den Zellkern ermöglichen. Zur systematischen Übersicht über die bekannten NLS siehe Christophe et al., 2000 und Jans et al., 2000.

Der Transport von Makromolekülen zwischen Zytoplasma und Zellkern erfolgt durch die sogenannten Kernporenkomplexe (NPC), welche die Kernmembran durchsetzen. Etwa 3000 – 5000 solcher NPC existieren in einer proliferierenden humanen Zelle (Cordes et al., 1995). Die NPC höherer Eukaryonten sind ca. 125 MDa große Proteinkomplexe, die aus ca. 50 – 100 Proteinen, sog. Nucleoporinen, bestehen (zur Übersicht s. Allen et al., 2000, Conti und Izaurralde, 2001, Vasu und Forbes, 2001). Durch einen NPC können pro Sekunde etwa 800 Proteine von einer Größe von 100 kDa in den Zellkern translozieren (Ribbeck und Gorlich, 2001). Während kleinere Moleküle passiv durch die NPC diffundieren können, ist der Transport von Proteinen ab einer Größe von ca. 20 kDa ein aktiver, energieabhängiger Prozess (Newmeyer und Forbes, 1988, Richardson et al., 1988, Gorlich und Kutay, 1999).

Die Entwicklung eines *in vitro* Kernimport-Versuchssystems durch Adam et al. war ein wichtiger Meilenstein, der seither die Identifikation einer Reihe löslicher Kerntransportfaktoren, sog. Karyopherine, die je nach Import- oder Exportfunktion in Importine und Exportine unterteilt werden, ermöglichte (Adam et al., 1990). Folgende Faktoren des sog. „klassischen“ Importin α/β -abhängigen Importwegs für NLS-tragende Proteine wurden bisher identifiziert: Importin α (Gorlich et al., 1994, Imamoto et al., 1995), Importin β (Gorlich et al., 1995a, Radu et al., 1995), die GTPase Ran (Moore und Blobel, 1993, Melchior et al., 1993) und NTF2 (nuclear transport factor, (Paschal et al., 1996)). Zur Übersicht über den klassischen nukleozytoplasmatischen Importweg siehe V3, Fig. 1 und Gorlich und Kutay, 1999, Kohler et al., 1999a, Kuersten et al., 2001, Macara, 2001. Importin α fungiert als ein Adapterprotein, welches im Zytoplasma einerseits NLS-tragende Substrate, zum anderen über seine Importin β -bindende Domäne (IBB) Importin β bindet (Gorlich et al., 1996a, Weis et al., 1996). Durch Bindung von Importin β an eine in der IBB von Importin α lokalisierte autoinhibitorische Domäne findet eine Konversion von einer niedrigaffinen zu einer hochaffinen Form von Importin α für die Bindung NLS-tragender Substrate statt (Kobe, 1999, Catimel et al., 2001). Der trimere Importin α/β /Substrat-Komplex dockt via Importin β , den eigentlichen

Importfaktor, an die Kernpore (Gorlich et al., 1995b, Moroianu et al., 1995). Der Mechanismus der eigentlichen Translokation durch die Kernpore ist bisher nicht geklärt. Zwei unterschiedliche Modelle, die zur Grundlage die Brownsche Molekularbewegung bzw. ein selektives Phasenmodell haben, werden derzeit diskutiert (Rout et al., 2000, Ribbeck und Gorlich, 2001). Im Zellkern bindet Importin β an RanGTP, was zur Dissoziation des Importkomplexes führt (Gorlich et al., 1996b). Das importierte Substrat kann so seine Funktion im Zellkern erfüllen. Die beiden Importin-Untereinheiten werden separat wieder in das Zytoplasma exportiert, wobei der Export von Importin α in einem Komplex mit RanGTP und seinem Exportfaktor CAS (cellular apoptosis susceptibility gene) erfolgt (Kutay et al., 1997). Entgegen früherer Meinungen weiß man heute, dass der eigentliche Translokationsschritt durch die Kernpore energieunabhängig ist, dass jedoch die Hydrolyse von RanGTP für das „Recycling“ der Importfaktoren sowie für Assoziation und Dissoziation von Importfaktor-Substrat-Komplexen verantwortlich ist (Ribbeck et al., 1999, Englmeier et al., 1999). Ran existiert in einer GDP- und einer GTP-gebundenen Form. Während im Zellkern das chromatingebundene Protein RCC1 (Regulator of chromosome condensation) die Umwandlung von RanGDP in RanGTP katalysiert (Bischoff und Ponstingl, 1991, Klebe et al., 1995), wird die Hydrolyse von RanGTP in RanGDP durch die zytoplasmatischen Proteine RanGAP1 (RanGTPase activating protein) und RanBP1 (Ran binding protein) mediiert (Bischoff et al., 1995, Mahajan et al., 1997, Matunis et al., 1996, Richards et al., 1996, Schlenstedt et al., 1997). Der Import von Ran in den Zellkern erfolgt in Abhängigkeit von dem kleinen Protein NTF2 (Ribbeck et al., 1998, Smith et al., 1998). Der so postulierte Gradient zwischen nukleärem RanGTP und zytoplasmatischem RanGDP, welcher die Triebkraft des Kerntransports darstellt, konnte kürzlich auch experimentell nachgewiesen werden (Kalab et al., 2002). Neben dem „klassischen“ Importin α/β -abhängigen nukleozytoplasmatischen Proteinimportweg existieren mehrere andere Wege. So können z. B. ribosomale Proteine oder Histone ohne Importin α alleine durch Importin β , aber auch durch andere, Importin β -verwandte Importfaktoren in den Zellkern importiert werden (Jakel und Gorlich, 1998, Muhlhauser et al., 2001). Auf diese durch Importin β -verwandte Proteine vermittelten Importwege soll in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter eingegangen werden. Zur Übersicht hierzu siehe Gorlich und Kutay, 1999, Kohler et al., 1999a, Kuersten et al., 2001, Macara, 2001.

2.2 Zielstellungen

Sowohl Importin α als auch Importin β konnten in allen bisher untersuchten eukaryontischen Organismen nachgewiesen werden. Während ySRP1p (suppressor of temperature-sensitive RNA polymerase I mutations) in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* für das einzige und daher essentielle Importin α -Homologe kodiert, waren zu Beginn der hier im Folgenden beschriebenen Untersuchungen bereits zwei humane Importin α -Gene bekannt, nämlich Importin $\alpha 1$ /Rch1 (Rag cohort interacting protein) und Importin $\alpha 5$ /hSRP1 (Cortes et al., 1994, Cuomo et al., 1994, Yano et al., 1992). Das Screening von Datenbanken ergab jedoch Hinweise auf die Existenz von weiteren humanen α -Importinen, eine zweite Importin β -Isoform konnte dagegen bisher nicht gefunden werden. Die Bedeutung der Existenz einer ganzen Familie von α -Importinen war zu Beginn dieser Arbeit unklar. Um die Hypothese zu testen, dass sich die verschiedenen humanen α -Importine in ihren spezifischen Funktionen unterscheiden und sich nicht gegenseitig ersetzen können, ergaben sich folgende Zielstellungen, die dieser Arbeit zu Grunde liegen:

- Identifikation und Klonierung aller humanen Importin α Isoformen
- Einteilung der α -Importine in Subfamilien an Hand ihrer Primärstruktur
- Vergleich der Expressionmuster der humanen α -Importine in verschiedenen Zellen und Geweben auf RNA- und Proteinebene
- Nachweis der Funktion der α -Importine als Importfaktoren mittels eines in vitro Kernimport-Versuchssystems
- Identifikation neuer Substrate für die humanen α -Importine
- detaillierte Analyse der Importmechanismen ausgewählter Substrate
- Untersuchung der α -Importine bezüglich erwarteter Substratspezifitäten
- Untersuchung der Regulation der α -Importin Expression in verschiedenen Systemen von Zellproliferation, -differenzierung und Pathophysiologie
- Untersuchung der Bedeutung der verschiedenen α -Importine in lebenden Zellen/ Organismen durch Inhibition ihrer Expression

3. Ergebnisse

Die in der vorliegenden Arbeit zusammengefassten Ergebnisse beruhen auf folgenden, unter II. einsehbaren Arbeiten:

- V1 Köhler, M., Ansieau, S., Prehn, S., Leutz, A., Haller, H., Hartmann, E.: Cloning of two novel importin- α subunits and analysis of the expression pattern of the importin- α protein family. *FEBS Letters* 417: 104 - 108, 1997
- V2 Köhler, M., Speck, C., Christiansen, M., Bischoff, F.R., Prehn, S., Haller, H., Görlich, D., Hartmann, E.: Evidence for distinct substrate specificities of importin α -family members in nuclear protein import. *Molecular and Cellular Biology* 19: 7782 - 7791, 1999
- V3 Köhler, M., Haller, H., Hartmann, E.: Nuclear protein transport pathways. *Experimental Nephrology* 7: 290 - 294, 1999
- V4 Welch, K., Franke, J., Köhler, M., Macara, I.A.: RanBP3 contains an unusual nuclear localization signal that is imported preferentially by importin α 3. *Molecular and Cellular Biology* 19: 8400 - 8411, 1999
- V5 Franke, J., Reimann, B., Hartmann, E., Köhler, M., and Wiedmann, B.: Evidence for a nuclear passage of nascent polypeptide-associated complex subunits in yeast. *Journal of Cell Science* 114: 2641 - 2648, 2001
- V6 Köhler, M., Buchwalow, I.B., Alexander, G., Christiansen, M., Shagdarsuren, E., Samoilova, V., Hartmann, E., Meerval, E.M.A., and Haller, H.: Increased Importin α Protein Expression in Diabetic Nephropathy. *Kidney International* 60: 2263 - 2273, 2001
- V7 Köhler, M., Görlich, D., Hartmann, E., and Franke, J.: Adenoviral E1A protein nuclear import is preferentially mediated by importin α 3 in vitro. *Virology* 289: 186 - 191, 2001
- V8 Köhler, M., Fiebeler, A., Hartwig, M., Thiel, S., Prehn, S., Kettritz, R., Luft, F.C., and Hartmann, E.: Differential expression of classical nuclear transport factors during cellular proliferation and differentiation. *Cellular Physiology and Biochemistry* 12: 335 - 344, 2002
- V9 Quensel, C., Friedrich, B., Sommer, T., Hartmann, E., and Köhler, M.: Distinct α importins are essential for proliferation of cultured human cells. eingereicht

3.1 Identifikation, Klonierung und Sequenzierung neuer humaner Importin α Isoformen (V1, V2)

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit waren mit Importin $\alpha 1$ /Rch1 und Importin $\alpha 5$ /hSRP1 nur zwei humane Importin α -Proteine bekannt. Beim Screenen der GenBank Datenbank fanden sich jedoch Hinweise auf die Existenz von vier weiteren humanen Genen mit Homologie zu zu Rch1 und hSRP1. Um die kompletten kodierenden Sequenzen dieser neuen α -Importine zu identifizieren, wurden zunächst die bekannten Teilkclone über die Reference Library ICRF erworben. Ein Teilklon des vermuteten Importin $\alpha 3$ wurde als Grundlage für die Herstellung einer [α - 32 P]dCTP markierten Sonde verwendet. Durch Screenen einer HeLa pUEX cDNA Bibliothek mit dieser Sonde wurde ein ca. 1.3 kilo Basenpaare langer Klon isoliert, der das vermutete Startkodon von Importin $\alpha 3$ enthielt. Das 3'-Ende der kodierenden Sequenz wurde mittels RACE-PCR (Rapid Amplification of cDNA Ends) aus einer HeLa Marathon-cDNA gewonnen. Zwei unabhängige positive Klone wurden isoliert und sequenziert. Die komplette cDNA des humanen Importin $\alpha 3$ wurde mittels PCR aus zwei überlappenden Teilklonen generiert und sequenziert. Humanes Importin $\alpha 4$ wurde im Rahmen eines „yeast two-hybrid screens“ aus einer Lungen-Bibliothek isoliert. Humanes Importin $\alpha 6$ wurde mittels RACE-PCR aus einer HeLa Marathon-cDNA isoliert. Die verwendeten Primer korrespondierten zu einem bekannten Teilklon von Importin $\alpha 6$. Die PCR-Produkte wurden kloniert und sequenziert. Mehrere überlappende positive Klone, welche die erwarteten Start- bzw. Stopkodons enthielten, wurden identifiziert. Mittels PCR wurde aus diesen die komplette cDNA von humanem Importin $\alpha 6$ generiert und via Sequenzierung kontrolliert. Auch die humane Importin $\alpha 7$ cDNA wurde mittels PCR gewonnen. Via RACE-PCR mit Primern, die zu bekannten Teilklonen korrespondierten, wurden mehrere positive Teilkclone, welche die erwarteten Start- und Stopkodons enthielten, isoliert und sequenziert. Mittels PCR wurde aus überlappenden Teilklonen die komplette cDNA von humanem Importin $\alpha 7$ generiert. Die Sequenzen der neu identifizierten humanen α -Importine wurden in der GenBank Datenbank unter folgenden Zugangsnummern deponiert:

- Importin $\alpha 3$: U93240
- Importin $\alpha 4$: Y12394
- Importin $\alpha 6$: AF005361
- Importin $\alpha 7$: AF060543

Um für die folgenden Untersuchungen sämtliche humanen α -Importine zur Verfügung zu haben, wurde auch das bereits bekannte Importin $\alpha 5$ /hSRP1 mittels PCR aus einer HeLa

Marathon-cDNA gewonnen. Die cDNA des humanen Importin $\alpha 1$ /Rch1 wurde von Dr. Dirk Görlich, ZMBH Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

Die cDNAs der humanen α -Importine kodieren für Proteine von 521 bis 536 Aminosäuren Länge und haben daher alle ein geschätztes Molekulargewicht von ca. knapp 60 kDa. Die Analyse der Sequenzen der sechs humanen α -Importine zeigte, dass alle Isoformen die für Importin α charakteristischen Domänen beinhalten (s. V1, Fig. 1; V2, Fig. 1):

- die am Aminoterminus lokalisierte, für die Bindung an Importin β notwendige IBB-Domäne
- die für die Bindung von NLS-Substraten verantwortlichen acht armadillo (arm) Sequenzen
- der an sauren Aminosäuren reiche Carboxyterminus, über den die Bindung an den Exportfaktor CAS erfolgt.

3.2 Einteilung der humanen Importin α Isoformen in unterschiedliche Subfamilien (V1, V2)

Infolge unterschiedlicher Homologien ihrer Primärstrukturen konnten die sechs humanen α -Importine in drei Subfamilien unterteilt werden:

- 1) Die erste Subfamilie besteht aus Importin $\alpha 1$ und Importin $\alpha 2$. Da jedoch Importin $\alpha 2$ bisher nur im Frosch *Xenopus laevis* nachgewiesen wurde, ist Importin $\alpha 1$ die einzige humane Isoform dieser Subfamilie.
- 2) Die zweite Subfamilie beinhaltet die Importine $\alpha 3$ und $\alpha 4$.
- 3) Mitglieder der dritten Subfamilie sind die Importine $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 7$.

Mitglieder einer Subfamilie sind in ihren Proteinsequenzen zu ca. 80% identisch. Proteinsequenzen humaner α -Importine unterschiedlicher Subfamilien stimmen dagegen nur zu ca. 50% überein.

Ein Vergleich der humanen α -Importine mit Homologen anderer Spezies ergab, dass die drei Subfamilien hochkonserviert sind. Auch in der Fliege *Drosophila melanogaster* ist mittlerweile je Subfamilie ein α -Importin beschrieben (V1, Fig. 2; V2, Fig. 1). Die Maus besitzt fünf α -Importine, die ca. 99% identisch mit ihren jeweiligen humanen Homologen sind. Einzig für das humane Importin $\alpha 6$ konnte keine homologe Isoform in der Maus identifiziert werden.

3.3 Analyse der Importin α Expression in humanen Zellen und Geweben (V1, V2, V6, V8)

Um die Gewebeverteilung der neu identifizierten humanen α -Importine auf RNA-Ebene zu untersuchen, wurden Northern blot Analysen durchgeführt. Northern blots, die RNAs unterschiedlicher humaner Gewebe enthielten (Human multiple tissue Northern blots, Clontech), wurden mit Sonden inkubiert, die aus radioaktiv markierten Teilsequenzen der verschiedenen α -Importine hergestellt wurden. Als Kontrolle für die geladenen RNA-Mengen diente eine Sonde gegen GAPDH. Es konnten Transkripte für die neu identifizierten Importine $\alpha 3$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ in nahezu allen untersuchten Geweben nachgewiesen werden. Allerdings unterschieden sich sowohl die Expressionsstärken der einzelnen α -Importine in verschiedenen Geweben als auch die relativen Expressionsstärken der verschiedenen α -Importine untereinander. Während z. B. Importin $\alpha 3$ eine deutlich stärkere Expression im Dünndarm als im Kolon zeigte, wies das nächstverwandte Importin $\alpha 4$ in beiden Geweben vergleichbare Expressionsstärken auf. Im Gegensatz zu den anderen humanen α -Importinen konnte eine Expression von Importin $\alpha 6$ nur in Testisgewebe nachgewiesen werden (V1, Fig. 3; V2, Fig. 2).

Um die Expression der α -Importine in verschiedenen humanen Zellen und Geweben auf Proteinebene untersuchen zu können, wurden spezifische polyklonale Antikörper hergestellt. Hierfür wurden synthetische Peptide, die Sequenzen der verschiedenen α -Importine von 10 bis 14 Aminosäuren Länge entsprachen, in Kaninchen injiziert. Aus den gewonnenen Seren wurden die entsprechenden Antikörper über zugehörige Peptidsäulen affinitätsgereinigt und für Western blots verwendet. Die Spezifität der Antikörper wurde mittels rekombinant exprimierter und gereinigter Importin α Proteine überprüft. Da die humanen Importine $\alpha 6$ und $\alpha 7$ sowohl am Amino- als auch am Carboxyterminus nahezu identisch sind, erkennen die beiden gegen diese generierten Antikörper auch beide Proteine. Da jedoch auf RNA-Ebene die Expression von Importin $\alpha 6$ auf Testis beschränkt war, sollten die nachgewiesenen Banden die Importin $\alpha 7$ -Expression repräsentieren. Mittels Western blot Analysen ließen sich die humanen Importine $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$ in einer Vielzahl humaner Zelllysate nachweisen. Analog zu den Ergebnissen auf RNA-Ebene zeigten die verschiedenen Isoformen jedoch auch auf Proteinebene differentielle Expressionsmuster (V1, Fig. 5; V6, Fig. 6; V8, Fig. 1). So konnte z. B. für Importin $\alpha 3$ im Gegensatz zu Importin $\alpha 4$ eine deutlich stärkere Expression in renalen 293 Zellen als in hepatischen HepG2-Zellen nachgewiesen werden. Untersuchungen mit Proteinlysaten von humanen Geweben zeigten ein ähnliches Bild: Alle untersuchten Importine ließen sich in unterschiedlicher Stärke in verschiedenen Geweben nachweisen, wobei das relative Expressionsniveau der verschiedenen Isoformen zum Teil deutlich unter-

schiedlich war (V1, Fig. 4; V2, Fig. 3). Um eine möglichst umfassende Analyse zu ermöglichen, wurde parallel die Expression anderer Faktoren des klassischen Importwegs in humanen Geweben untersucht. Wie erwartet konnten ubiquitäre Expressionsmuster auch für diese Faktoren (Importin β , CAS und Ran) nachgewiesen werden. Überraschenderweise zeigte sich jedoch, dass in den Geweben, in denen die verschiedenen α -Importine am stärksten exprimiert waren, nämlich Ovar und Lunge, die Expression von Importin β , CAS und Ran weniger stark als in manchen anderen Geweben war (V2, Fig. 3). Die Antikörper gegen diese Proteine wurden von Dr. Dirk Görlich, ZMBH Heidelberg, zur Verfügung gestellt.

3.4 Rekombinante Expression und Aufreinigung der humanen α -Importine (V2)

Ein wichtiger Schritt für die geplanten funktionellen Analysen der verschiedenen Importin α Proteine war deren rekombinante Expression in *E. coli*. Hierzu wurden die cDNAs zunächst mittels spezieller Primer via PCR mit Restriktionsstellen versehen, die eine anschließende Ligation in Expressionsvektoren und nachfolgende Transformation in kompetente *E. coli* ermöglichten. Die Aufreinigung der Proteine, welche mit einem sog. Histidin-tag versehen wurden, erfolgte nach Ultrazentrifugation des bakteriellen Lysats und Bindung der Proteine an eine Nickel-Säule zunächst mittels eines Imidazol-Gradienten. Die Fraktionen mit dem höchsten Importin α Gehalt wurden gesammelt, auf eine Mono Q-Säule geladen und mit einem NaCl-Gradienten eluiert. Die Fraktionen mit dem höchsten Importin α Gehalt wurden erneut gesammelt und unter Zugabe von 250 mM Saccharose bei -80°C gelagert. Die Proteinkonzentrationen wurden photometrisch bei 280 nm Wellenlänge durch den molaren Extinktionskoeffizienten, wie bei Edelhoich beschrieben, bestimmt (Edelhoich, 1967). Die Reinheit der Proteine wurde mittels Gelelektrophorese (SDS-PAGE = sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) überprüft (V2, Fig. 4). Neben den ubiquitär exprimierten humanen Importinen $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$ konnten für Kontrollexperimente auch die *Xenopus* Isoform Importin $\alpha 2$ und das Hefe Importin α ySRP1p aufgereinigt werden. Die Klone hierfür wurden von Dr. Dirk Görlich, ZMBH Heidelberg, zur Verfügung gestellt. Lediglich das nur in Testisgewebe exprimierte humane Importin $\alpha 6$ war unlöslich und konnte daher nicht aufgereinigt werden. Es zeigte sich, dass alle gereinigten humanen α -Importine in der Gelelektrophorese wie erwartet bei ca. 60 kDa migrierten.

3.5 In vitro Funktionsanalysen der humanen α -Importine

3.5.1 Vergleich der Bindungsaffinitäten der neu beschriebenen humanen α -Importine zu Importin β und CAS in vitro (V2)

Für die Importine $\alpha 1$ und $\alpha 5$ waren bereits die Interaktionen mit ihrem Importfaktor Importin β bzw. mit ihrem Exportfaktor CAS nachgewiesen (Gorlich et al., 1995a, Kutay et al., 1997). Um die erwarteten Interaktionen der neu beschriebenen humanen α -Importine mit Importin β und CAS nachzuweisen und miteinander vergleichen zu können, wurden zwei unterschiedliche Ansätze ausgewählt. Rekombinante Expression und Aufreinigung von Importin β und CAS erfolgten mit von Dr. Dirk Görlich zur Verfügung gestellten Klonen (Gorlich et al., 1995b, Kutay et al., 1997).

Um die Bindungsaffinitäten der verschiedenen α -Importine zu CAS zu quantifizieren, machten wir uns die Tatsache zu Nutze, dass die Bindungsaffinität von CAS zu RanGTP durch die Anwesenheit von Importin α enorm verstärkt wird. Des Weiteren resultiert die Bindung in einem Schutz gegen die Aktivierung der RanGTPase durch RanGAP1 (Kutay et al., 1997). Für die CAS-Bindungsstudien wurden daher $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ markiertes RanGTP in einem Puffergemisch entweder mit rekombinantem CAS alleine oder mit einem Gemisch aus rekombinantem CAS und den verschiedenen α -Importinen inkubiert. Nach 30 Minuten wurde rekombinantes Rna1p, das Hefe-Homologe von RanGAP1, für 30 Sekunden zugegeben und die Hydrolyse von Ran-gebundenem GTP als freigesetztes ^{32}P bestimmt. Die daraus berechneten Bindungsaffinitäten ergaben starke Affinitäten für CAS zu den humanen Importinen $\alpha 1$, $\alpha 3$, und $\alpha 5$ (Dissoziationskonstante $K_D < 2$ nM; V2, Fig. 4). Erstaunlicherweise war die Bindung des *Xenopus* Kontrollproteins Importin $\alpha 2$ an CAS stärker als die Affinität der humanen Isoformen $\alpha 4$ und $\alpha 7$ ($K_D > 3$ nM vs. > 5 nM). Nur die Affinität von CAS zu der Importin α Kontrolle der Hefe, ySRP1p, war deutlich schwächer ($K_D > 20$ nM).

Zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten der α -Importine an Importin β wurde ein Biacore 2000 Instrument verwendet. Die rekombinanten α -Importine sowie die Negativkontrolle BSA wurden auf sog. sensor chips immobilisiert und verschiedene Konzentrationen von rekombinantem Importin β injiziert. Die surface plasmon resonance (SPR) wurde mittels Biacore Apparatur bestimmt und die Dissoziationskonstante daraus berechnet. Mit dieser Methode konnte nachgewiesen werden, dass alle untersuchten α -Importine an Importin β binden können (V2, Tab. 1). Die gemessenen Unterschiede in den Bindungsaffinitäten der humanen α -Importine zu Importin β waren marginal und lagen alle zwischen 5 und 18 nM. Interessanterweise lagen die Affinitäten der Kontroll- α -Importine *Xenopus* $\alpha 2$ und ySRP1p zu huma-

nem Importin β im gleichen Bereich (K_D 3 bzw. 5 nM). Die Negativkontrolle BSA dagegen zeigte keine signifikante Bindung an Importin β , was für die Spezifität der nachgewiesenen Bindungen spricht.

3.5.2 Nachweis der Importfunktion und unterschiedlicher Substratspezifitäten der humanen α -Importine in vitro (V2, V4, V5, V7)

Für die humanen Importine $\alpha 1$ und $\alpha 5$ war bereits die Importfunktion in vitro nachgewiesen. Um auch für die neu identifizierten α -Importine die Importfunktionen beweisen zu können, wurden in vitro Kernimport-Versuche durchgeführt, die auf dem von Adam et al. beschriebenen Versuchssystem beruhten (Adam et al., 1990). Hierfür wurden kultivierte HeLa-Zellen mit Digitonin inkubiert, was zur Permeabilisierung der Zellmembran und zum Auswaschen des Zytosols führt, während die Kernmembran intakt bleibt. Nach Inkubation der permeabilisierten Zellen mit der Importreaktionsmischung für acht Minuten wurden die Reaktionen mit Paraformaldehyd gestoppt und im konfokalen Mikroskop ausgewertet. Die Importreaktionsmischung bestand aus einem energieregenerierenden System, einem Nucleoplasmin core-Protein enthaltenden Puffersystem, 10% Retikulozytenlysat, einem Fluorescein- oder Texas red-markierten Imports substrat sowie den rekombinant exprimierten und aufgereinigten Importfaktoren des klassischen Importweges (RanGDP, RanGAP1, RanBP1, NTF2, Importin β , sowie die jeweiligen Importin α Proteine).

Zunächst sollte mit diesem in vitro Versuchssystem gezeigt werden, dass alle humanen α -Importine bekannte Standardsubstrate des klassischen Importweges importieren können. Sowohl ein Fusionprotein aus Rinderserumalbumin (BSA) und der NLS des großen T-Antigens des SV40 Virus (NLS-BSA) als Standardsubstrat der einteiligen klassischen NLS-Substrate als auch Nucleoplasmin, das klassische Imports substrat mit einer zweigeteilten NLS, wurden von allen untersuchten humanen α -Importinen wie auch von den mitgeführten Kontroll-Importinen Xenopus $\alpha 2$ und γ SRP1p importiert (V2, Fig. 5). Im Gegensatz dazu fand in den Negativkontrollen ohne Importin α keine nukleäre Akkumulation eines der beiden Imports substrate statt. Auffälligerweise fanden sich, obwohl für jedes Substrat die Experimente mit den unterschiedlichen α -Importinen jeweils parallel unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden, deutliche Unterschiede in der Intensität der nukleären Akkumulation. So zeigten die humanen Importine $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\alpha 7$ und Xenopus $\alpha 2$ die besten Importeffektivitäten für NLS-BSA. Nucleoplasmin wurde am besten von Importin $\alpha 5$ importiert, gefolgt von den humanen Importinen $\alpha 3$ und $\alpha 4$ sowie Xenopus $\alpha 2$.

Um zu untersuchen, ob die unterschiedlichen Importeffizienzen auf einer Aufreinigung unterschiedlich effektiver α -Importine beruhten oder ob diese in tatsächlichen Unterschieden der Substratspezifitäten der α -Importine begründet seien, wurden weitere Importsubstrate zunächst alleine und dann in Kombination mit einem zweiten, kompetitiven Substrat durchgeführt. Diese Untersuchungen ergaben, dass das RNA-bindende Ribonukleoprotein hnRNP K im Prinzip von allen humanen α -Importinen, am besten jedoch von $\alpha 1$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ importiert wurde (V2, Fig. 6). Die Zugabe von Nucleoplasmin als kompetitives zweites Substrat änderte an diesen Unterschieden nichts, die erneute geringe Importeffektivität von Importin $\alpha 1$ für Nucleoplasmin konnte hier jedoch nicht in einem generell inaktiven Protein begründet sein. Während gereinigtes und Fluorescein-markiertes P/CAF, einem Stimulator des Rous Sarcoma Virus Promotors, bei alleiniger Zugabe im Kernimport-Versuchssystem von allen humanen α -Importinen ohne nennenswerte Unterschiede importiert werden konnte, führte die gleichzeitige Zugabe von Texas red-markiertem Nucleoplasmin dazu, dass P/CAF nur noch von Importin $\alpha 3$ und in deutlich schwächerer Intensität von Importin $\alpha 4$ importiert werden konnte (V2, Fig. 7). Diese ersten Hinweise auf unterschiedliche Substratspezifitäten der humanen α -Importine *in vitro* wurden bestätigt durch die Verwendung des Chromatin-gebundenen RanGTP/GDP exchange factor RCC1 als Importsubstrat. Erstmals zeigte sich schon bei Zugabe dieses alleinigen Substrates, dass eine Isoform, Importin $\alpha 3$, mit Abstand die beste Importeffizienz für dieses Substrat aufwies (V2, Fig. 8). Lediglich Importin $\alpha 4$ konnte eine nukleäre RCC1-Akkumulation bewirken, die über der der Negativkontrolle ohne Importin α lag. Die Zugabe von Nucleoplasmin als kompetitivem Zweitsubstrat änderte an der fehlenden Importwirkung der anderen α -Importine für RCC1 erwartungsgemäß nichts, belegte jedoch, dass diese auch in diesem Versuchsansatz im Prinzip funktionell waren.

3.5.3 Identifikation weiterer Importin α -Substrate und *in vitro* Analyse ihres nukleozytoplasmatischen Importmechanismus

In weiteren Untersuchungen konnten zum Teil in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen mittels des oben beschriebenen *in vitro* Kernimport-Versuchssystems neue Importin α Substrate identifiziert und der Mechanismus ihrer Translokation in den Zellkern im Detail analysiert werden. Hierbei ergaben sich weitere Hinweise auf substratspezifische Unterschiede der humanen α -Importine *in vitro*.

3.5.3.1 In vitro Analyse des Importmechanismus von RanBP3 (V4)

In Zusammenarbeit mit der AG I.G. Macara, Charlottesville / USA, konnte RanBP3 als ein neues Substrat von Importin α identifiziert werden. Während der Durchführung dieser Untersuchungen war die funktionelle Bedeutung von RanBP3 noch unklar. Mittlerweile ist bekannt, dass RanBP3 ein Kofaktor des Crm1-abhängigen Exports von Proteinen aus dem Zellkern ist (Englmeier et al., 2001, Nemergut et al., 2002). Zunächst konnte mittels spezifischer Antikörper im Immunfluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden, dass RanBP3 überwiegend in Zellkern lokalisiert ist (V4, Fig. 1). Durch Mikroinjektion unterschiedlicher Fragmente eines Glutathion S-Transferase-grünfluoreszierendes Protein-RanBP3 Fusionsproteins (GST-GFP-RanBP3) konnte zunächst gezeigt werden, dass eine Region am Aminoterminus für die Kernlokalisierung des Proteins sowohl essentiell als auch ausreichend ist (V4, Fig. 2). Weitere Deletionsanalysen ergaben, dass sich die NLS von RanBP3 von den Aminosäuren 40 bis 57 erstreckt (V4, Fig. 3 und 4). In vitro Kernimport-Versuche mittels Digitonin-permeabilisierter Zellen zeigten, dass sowohl durch Inhibition von Importin α als auch durch Inhibition von Importin β die nukleäre Translokation von RanBP3 inhibiert werden konnte (V4, Fig. 5 und 6). Dies war ein überraschender Befund, da die NLS von RanBP3 nur eine sehr geringe Identität mit der klassischen NLS des SV40 Virus aufwies und daher einer atypischen nicht-klassischen NLS entsprach. In vitro Bindungsstudien, bei denen die verschiedenen humanen α -Importine mit einem an eine GST-Säule gekoppelten RanBP3-Fusionsprotein inkubiert wurden, ergaben, dass die Importine $\alpha 3$ und $\alpha 4$ signifikant mit RanBP3 interagieren konnten. Die Bindung von Importin $\alpha 5$ war deutlich schwächer und die Importine $\alpha 1$ und $\alpha 7$ zeigten keine über dem Niveau der Negativkontrolle liegende Bindung (V4, Fig. 7). Durch kompetitive in vitro Kernimport-Versuche konnte schließlich nachgewiesen werden, dass RanBP3 tatsächlich über den klassischen Importin α/β -abhängigen Importweg in den Zellkern transportiert werden kann, wobei Importin $\alpha 3$ die höchste Importeffizienz für RanBP3 zeigte (V4, Fig. 7).

3.5.3.2 In vitro Analyse des nukleären Imports von Untereinheiten des nascent polypeptide-associated complex (NAC) in der Hefe (V5)

Der nascent polypeptide-associated complex (NAC) ist ein evolutionär konservierter Komplex, der in der Hefe aus den drei Untereinheiten Egd2p, Btt1p und Egd1p besteht. Der Gesamtkomplex schützt am Ribosom wachsende Polypeptide vor frühzeitigen Interaktionen mit zytosolischen Proteinen. Daneben gab es aber auch Berichte über eine Rolle einzelner NAC-Untereinheiten als Transkriptionsregulatoren via DNA-Interaktionen, was eine nukleäre

Translokation zumindest von Untereinheiten des NAC-Komplexes zur Voraussetzung hätte. Daten bzgl. einer nukleären Lokalisation von NAC waren aber bisher widersprüchlich (s. V5).

In Zusammenarbeit mit der AG von Dr. B. Wiedmann, Institut für Biochemie der Charité Berlin, wurden die Mechanismen, welche den nukleären Import der NAC-Untereinheiten in der Hefe kontrollieren, eingehend untersucht. Durch Herstellung von GFP-Fusionsproteinen und deren Expression in NAC-knockout Stämmen konnte eine nukleäre Lokalisation von Egd2p in der Hefe nachgewiesen werden, während das Egd1p-GFP Protein vom Zellkern ausgeschlossen blieb (V5, Fig. 1). Im Gegensatz dazu zeigte sich für ein Egd1p-GFP Fusionsprotein, dessen aminoternale Ribosomenbindungsstelle deletiert worden war (Δ N11-Egd1p-2GFP), eine deutliche Akkumulation im Zellkern (V5, Fig.1). In vitro Kernimport-Versuche zeigten, dass sowohl das Hefe-Importin α ySRP1p als auch die humanen Importine α 1, α 3 und α 7 Egd1p und Egd2p importieren konnten, wobei die Importeffizienz von Importin α 3 für Egd2p deutlich schwächer war als für Egd1p. Im Gegensatz dazu konnten die humanen Importine α 4 und α 5 keine Translokation von Egd1p oder Egd2p in den Zellkern bewirken (V5, Fig. 3). Der in vitro Kernimport von Egd2p via Importin α 1 konnte blockiert werden durch Zugabe eines Überschusses an Nucleoplasmin, was die Spezifität dieses Importweges in vitro nachwies (V5, Fig. 4). Um den Importmechanismus der NAC-Untereinheit Egd1p in lebenden Hefen zu untersuchen, wurde zunächst die Lokalisation des Egd1p-GFP Fusionsproteins mit deletierter aminoterminaler Ribosomenbindungsstelle (Δ N11-Egd1p-2GFP) in verschiedenen ySRP1p-knockout Stämmen analysiert. Hier zeigte sich nur eine leichte Abschwächung der nukleären Akkumulation von Δ N11-Egd1p-2GFP (V5, Fig. 5A). Interessanterweise ergaben die Versuche in Hefen, denen die Importin β -verwandten Importfaktoren kap123p bzw. pse1p fehlten, ebenfalls eine Inhibition der Anreicherung von Δ N11-Egd1p-2GFP im Zellkern (V5, Fig. 5B). Die Domäne, die für den kap123p sowie für den pse1p-vermittelten nukleozytoplasmatischen Import von Egd1p verantwortlich ist, konnte mittels weiterer Deletionsmutanten im Bereich der Aminosäuren 11 bis 27 lokalisiert werden (V5, Fig. 6).

3.5.3.3 In vitro Analyse des Importmechanismus viraler Proteine (V7)

Mittels in vitro Kernimport-Versuchen wurden auch die nukleozytoplasmatischen Transportmechanismen zweier viraler Proteine untersucht. Für das adenovirale E1A-Protein war die NLS bereits bekannt (Lyons et al., 1987), die Importfaktoren jedoch noch nicht identifiziert. Für das influenzavirale Nucleoprotein (NP) waren zwei unterschiedliche NLS identifiziert (Wang et al., 1997, Weber et al., 1998). Auch war für NP bereits zuvor ein via Importin α 1

und $\alpha 5$ vermittelter nukleärer Import in vitro beschrieben worden (O'Neill et al., 1995). In vitro Kernimport-Versuche mit einem maltosebindenden NP-Fusionsprotein ergaben keine Hinweise auf Präferenzen bestimmter α -Importine für dieses Substrat, da alle untersuchten humanen Isoformen auch nach Zugabe eines kompetitiven zweiten Substrates das NP-Fusionsprotein mit gleicher Effektivität importieren konnten. Für ein Fusionsprotein aus BSA und der NLS des E1A-Proteins konnte dagegen erstmals eine Importin α/β -abhängige nukleäre Translokation in vitro nachgewiesen werden (V7, Fig. 1). Dabei zeigte sich, dass im Prinzip alle ubiquitär exprimierten humanen α -Importine in vitro dieses E1A-Fusionsprotein in den Zellkern importieren konnten. Die Zugabe von Nucleoplasmin als kompetitives Substrat führte jedoch dazu, dass ähnlich wie vorbeschrieben für P/CAF Importin $\alpha 3$ noch eine gute Importeffizienz aufwies, während die Effizienz von Importin $\alpha 4$ für E1A schwächer, die der anderen α -Importine sogar kaum oder gar nicht von der Negativkontrolle ohne α -Importin verschieden waren.

3.6 Untersuchungen zur Regulation der α -Importin Expression in Abhängigkeit von Zellproliferation, -differenzierung und pathophysiologischen Zuständen

Nachdem erste in vitro Versuche Hinweise für substratspezifische Unterschiede der humanen α -Importine ergeben hatten (s. 3.5), war die Frage nach der Bedeutung der Existenz so vieler Isoformen in vivo aber weiterhin unklar. Als Ausgangsbasis für weitere geplante funktionelle Analysen sollte daher in verschiedenen Untersuchungen nach möglichen Regulationen der Importin α Expression in Abhängigkeit von pathophysiologischen Zuständen, sowie von zellulärer Proliferation und Differenzierung gesucht werden.

3.6.1 Analyse der Importin α Expression bei diabetischer Nephropathie (V6)

Es ist bekannt, dass Diabetes mellitus und erhöhte Glukosekonzentrationen mit einer Aktivierung verschiedener Faktoren intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden involviert sind (s. V6). Um eine mögliche Rolle der Importine bei der Pathogenese von Erkrankungen zu identifizieren wurde in einer ersten Arbeit die Expression in unterschiedlichen diabetischen Rattenmodellen untersucht. Zunächst wurde die Expression der α -Importine in Nieren gesunder Ratten mittels der bereits beschriebenen Antikörper im Immunfluoreszenzmikroskop analysiert. Importin $\alpha 1$ konnte in starker Expression in Epithelzellen distaler Tubuli nachgewiesen werden. Demgegenüber waren die Signale für Importin $\alpha 1$ in proximalen Tubuli schwach ausgeprägt, die Glomeruli waren negativ (V6, Fig. 1A und C). In Nieren von Ratten, die infolge Streptozotocinbehandlung diabetisch geworden waren, wurde ein signifikanter Anstieg

der Importin $\alpha 1$ Expression nachgewiesen (V6, Fig. 1B und D; V6, Tab. 1). Die Importin $\alpha 1$ Expression bei diabetischen Ratten war am stärksten im Zytoplasma tubulärer Zellen ausgeprägt, fand sich jedoch im Gegensatz zu normalen Ratten auch in geringerem Maße im Zytoplasma glomerulärer Zellen und in tubulären Zellkernen. Importin $\alpha 5$ war in den Kernen glomerulärer und tubulärer Nierenzellen gesunder Ratten nachweisbar (V6, Fig. 3A und C). In Nieren streptozotocinbehandelter diabetischer Ratten waren signifikante Anstiege der Importin $\alpha 5$ Expression in Zytoplasma und Kernen tubulärer wie glomerulärer Zellen zu erkennen (V6, Fig. 3B und D; V6, Tab. 1). Importin $\alpha 7$ war in Glomeruli gesunder Rattennieren nur schwach, im Zytoplasma tubulärer Zellen mäßig nachweisbar (V6, Fig. 2A). Demgegenüber fand sich in Nieren streptozotocinbehandelter Ratten eine deutliche Hochregulation der Expression von Importin $\alpha 7$ (V6, Fig. 2B). Diese war am stärksten ausgeprägt in den Tubuli zu finden, zeigte sich jedoch auch in glomerulären Zellen. Charakteristischerweise war die Expression in den Zellen perinukleär lokalisiert. Durch Doppelmarkierung mit einem endothelzellspezifischen Anti-CD 31 Antikörper konnte die Expression von Importin $\alpha 7$ in streptozotocinbehandelten Tieren sowohl in glomerulären und peritubulären Endothelzellen als auch in glomerulären Mesangiumzellen lokalisiert werden (V6, Fig. 2C und D). Da die Expressionsunterschiede zwischen gesunden und streptozotocinbehandelten diabetischen Rattennieren am stärksten für Importin $\alpha 7$ ausgeprägt waren, wurde die glomeruläre Expression von Importin $\alpha 7$ semiquantitativ zwischen den verschiedenen Tieren verglichen. Es ergab sich in diabetischen Nieren ein signifikanter Anstieg der positiven Kerne pro Glomerulus von 0 auf im Mittel 7 sowie der zytoplasmatisch positiven Zellen von 16 auf 34 (V6, Tab. 2).

Um unspezifische Effekte durch die Streptozotocinbehandlung als Ursache für den Importin α -Anstieg in diabetischen Rattennieren auszuschließen, wurde ein zweites diabetisches Rattenmodell untersucht. Im Gegensatz zu streptozotocinbehandelten Ratten wurden hierfür spontan diabetische Goto-Kakizaki Ratten verwendet. Die Ergebnisse waren vergleichbar (V6, Fig. 2 E – J): Während in gesunden Wistar Ratten kaum nukleäre und nur mäßige perinukleäre Reaktionen für Importin $\alpha 7$ in tubulären und glomerulären Zellen nachweisbar waren, zeigte sich eine diffuse nukleäre Färbung für Importin $\alpha 7$ in vielen tubulären und glomerulären Zellen Typ 2 diabetischer Goto-Kakizaki Ratten. Auch ein Anstieg der perinukleären Importin $\alpha 7$ Signale insbesondere in medullären Tubuluszellen im Vergleich zu gesunden Nieren war offensichtlich.

Zur Bestätigung der immunhistologischen Ergebnisse wurden parallel Western blots mit Gesamtproteinlysaten homogenisierter Nieren von gesunden und diabetischen Ratten beider Diabetesmodelle durchgeführt. Während die Antikörper gegen die Importine $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$

und $\alpha 5$ nur geringe oder keine Unterschiede zwischen gesunden und diabetischen Rattennieren ergaben, konnte der starke Anstieg der Importin $\alpha 7$ Expression in beiden diabetischen Rattennieren im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollen im Western blot verifiziert werden (V6, Fig. 4).

Da noch kaum Daten über die Regulation der Importin α Protein Expression bekannt waren, wurde untersucht, ob kurzzeitige Exposition kultivierter Zellen zu hohen Glukosekonzentrationen zu Veränderungen der Expressionsniveaus der verschiedenen α -Importine führen könnten. Untersuchungen an glatten Gefäßmuskelzellen der Ratte mittels konfokaler Mikroskopie ergaben nach dreistündiger Inkubation mit hochmolarer Glukosekonzentration (25 mmol/l) keine signifikanten Unterschiede im Expressionsniveau wie in der subzellulären Verteilung von Importin $\alpha 1$ im Vergleich zu Kontrollzellen (V6, Fig. 5). Im Gegensatz dazu zeigte Importin $\alpha 5$ einen mäßigen Anstieg und Importin $\alpha 7$ einen starken Anstieg mit überwiegend nukleärer Lokalisation nach Behandlung mit hochmolarer Glukosekonzentration. In Western blots mit Zelllysaten glatter Gefäßmuskelzellen der Ratte fanden sich keine erwähnenswerten Unterschiede in den Expressionsstärken der Importine $\alpha 1$ und $\alpha 4$ zwischen hoch- und niedrigmolaren Glukosekonzentrationen (V6, Fig. 6A). Demgegenüber konnten neben einem mäßigen Anstieg der Importin $\alpha 3$ Expression der mäßige Anstieg von Importin $\alpha 5$ sowie der starke Anstieg von Importin $\alpha 7$ nach dreistündiger Inkubation mit 25 mmol/l Glukose bestätigt werden. Allerdings fanden sich keine nennenswerten Unterschiede der Importin α Expressionen zwischen 25 mmol/l Glukose-Behandlung und den osmotischen Kontrollen mit äquimolarer Mannose. Da die beeindruckendsten Unterschiede der Importin $\alpha 7$ Expression in den Immunfluoreszenzuntersuchungen in Endothelzellen und glomerulären Zellen gefunden worden waren, wurden auch Western blots mit Zelllysaten von Mesangiumzellen der Ratte und von humanen Nabelschnurendothelzellen nach Behandlung mit 5 bzw. 25 mmol/l Glukose durchgeführt (V6, Fig. 6B und C). Während sich in den Mesangiumzellen nach Behandlung mit hoher Glukosekonzentration ähnlich wie bei den glatten Gefäßmuskelzellen keine Anstiege in der Importin $\alpha 1$ und $\alpha 4$ Expression, dagegen aber Anstiege in den $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$ Expressionen nachweisen ließen, zeigten sich in den Endothelzellen nur leichte durch hohe Glukosekonzentrationen induzierte Anstiege für die Importine $\alpha 4$ und $\alpha 5$, nicht aber für die anderen Isoformen. Wie in den glatten Gefäßmuskelzellen auch, fanden sich keine Unterschiede in den Importin α Expressionsstärken in Mesangium- und Endothelzellen zwischen hochmolarer Glukosekonzentration und der Osmosekontrolle Mannose.

3.6.2 Analyse der Regulation der Importin α Expression in Abhängigkeit von Zellproliferation und -differenzierung (V8)

Da kaum Daten bezüglich möglicher Regulationen der verschiedenen α -Importine bekannt waren, sollte als Ausgangspunkt für geplante weitere funktionelle Untersuchungen die Hypothese getestet werden, dass die Importin α Expression in Abhängigkeit von Zellproliferation und Zelldifferenzierung unterschiedlich reguliert wird.

Bisher war nicht bekannt, ob sich die humanen α -Importine in ihren absoluten Expressionsstärken signifikant unterscheiden. Daher wurden zunächst die Absolutmengen der verschiedenen α -Importine sowie von Importin β in vier verschiedenen humanen Zelllinien per Western blot durch Mitführung von Standardkurven rekombinant exprimierter und gereinigter Importine mit bekannten Konzentrationen bestimmt (V8, Fig. 1). In den vier analysierten Zelllinien war Importin $\alpha 1$ stets die am stärksten exprimierte Isoform. Die absolute Menge an Importin $\alpha 1$ war sogar in den meisten Zellen größer als die Menge an Importin β . In Matu (Mamma-Tumor) und ECV (Endothelzelllinie) Zellen war Importin $\alpha 1$ 10 – 30-fach stärker exprimiert als die verschiedenen anderen α -Importine. Demgegenüber waren die Unterschiede der absoluten Expressionsniveaus zwischen den übrigen α -Importinen weniger als vierfach. Ähnlich wie in vorangegangenen Untersuchungen unterschieden sich die α -Importine in den relativen Expressionsstärken zwischen den verschiedenen Zellen. So war in Matu-Zellen mehr Importin $\alpha 7$ nachweisbar als Importin $\alpha 5$, welches selbst wiederum stärker exprimiert war als $\alpha 4$. In Jurkat (T-Zelllinie) Zellen dagegen waren die Verhältnisse der Expressionsstärken dieser Isoformen genau umgekehrt. Während die Unterschiede in den Absolutmengen zwischen den verschiedenen Zellen für die Importine $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$ maximal zweifach waren, schwankte die Expressionsstärke von Importin $\alpha 1$ um mehr als Faktor zehn. Die Gesamtmenge aller α -Importine variierte zwischen den verschiedenen Zelllinien zwischen 7 und 47 nmol/g Gesamtprotein, wobei in drei der untersuchten Zelllinien ein mehr als dreifacher molarer Überschuss der α -Importine im Vergleich zu Importin β beobachtet werden konnte.

Um den Effekt einer Proliferationsinhibition auf die Regulation der Importin α Expression zu untersuchen wurden zunächst HeLa-Zellen für 24 und 72 Stunden serumdepletiert. Western blots der von diesen Zellen gewonnenen Proteinlysate zeigten, dass Serumdepletion zu einer Reduktion aller α -Importine inklusive ihrer Import- und Exportfaktoren Importin β und CAS geführt hatte (V8, Fig. 2A und C). Die stärksten Abnahmen der Expressionsstärken waren dabei für die Importine $\alpha 1$ und $\alpha 7$ nachweisbar. Um zu untersuchen, ob dieser Effekt HeLa-spezifisch sei, führten wir analoge Experimente mit humanen Fibroblasten (HaCaT-Zellen) durch, welche jedoch wegen ihrer größeren Empfindlichkeit nur 48 Stunden

ohne Serum gehalten werden konnten. Ähnlich wie bei den Experimenten mit HeLa-Zellen kam es zu einer starken Abnahme des Expressionsniveaus von Importin $\alpha 1$ (V8, Fig. 2B und D). Während auch für CAS wiederholt eine mäßige Abnahme des Proteinlevels nachweisbar war, änderten sich jedoch die Expressionsstärken der anderen α -Importine ebenso wie die von Importin β kaum.

Um zu kontrollieren, dass HeLa-Zellen 72 Stunden nach Serumentzug noch nicht abgestorben, sondern weiterhin wachstumsfähig sind, wurde für bis zu 24 Stunden erneut Serum in das Kulturmedium zurückgegeben und dann die Expressionslevel der verschiedenen Importine analysiert. Wie erwartet führte die erneute Zugabe von Serum zu einem Anstieg der Expressionsniveaus aller untersuchten Importine, wobei der Effekt für Importin $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 7$ und β stärker ausgeprägt war, als für Importin $\alpha 4$ und $\alpha 5$ (V8, Fig. 3). Die schnellsten Expressionsanstiege wurden für die Importine $\alpha 3$ und $\alpha 7$ gefunden, welche bereits nach einer Stunde Serumzugabe nachweisbar waren.

Als nächstes wurde der Einfluß der Induktion von Zelldifferenzierung pankreatischer AR42J-Zellen der Ratte auf die Expressionsregulation der klassischen Importfaktoren im Western blot untersucht. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um ein etabliertes Modell für die Differenzierung in Richtung neuroendokriner Phänotyp durch Aktivin A bzw. in Richtung azinärer Phänotyp mit Dexamethason (s. V8). Zunächst war bemerkenswert, dass weder in unbehandelten noch in Aktivin A oder Dexamethason behandelten AR42J-Zellen das sonst am stärksten exprimierte Importin $\alpha 1$ nachweisbar war (V8, Fig. 4). Die parallele Durchführung von Western blots mit Zytosol der Rattenzelllinie L6E9 zeigte, dass der verwendete Antikörper generell das Importin $\alpha 1$ Homologe der Ratte erkennen konnte. Während die Inkubation sowohl mit Aktivin A als auch mit Dexamethason zu einem Anstieg der Importin $\alpha 3$ und $\alpha 4$ Expression führte, ließen sich keine nennenswerten Expressionsunterschiede für die anderen Importfaktoren nachweisen.

Als nächstes Zelldifferenzierungsmodell wurden promyelozytische HL60 Zellen analysiert. Diese lassen sich mit dem Phorbolster PMA in Richtung Makrophagen, mit DMSO dagegen in Richtung neutrophile Granulozyten differenzieren (s. V8). Western blot Analysen zeigten, dass nach 72-stündiger Behandlung mit PMA die Expression der Importine $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\alpha 7$, β und CAS abgenommen hatten (V8, Fig. 5). Für die Importine $\alpha 3$ und $\alpha 5$ dagegen fand sich ein transienter Anstieg nach 24 Stunden PMA-Behandlung. Um sicher zu sein, dass die Zellen vor dem Ernten noch intakt waren und dass gleiche Proteinmengen im Gel geladen und im Western blot übertragen worden waren, führten wir Western blots mit einem Kontroll-Antikörper gegen das im endoplasmatischen Retikulum lokalisierte Protein TRAP α durch. Es

konnten wie erwartet keine relevanten Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeitpunkten beobachtet werden. Die Differenzierungsexperimente der HL60 Zellen mit DMSO zeigten ähnliche Ergebnisse wie die mit PMA: Es wurden Abnahmen für die Importine $\alpha 1$, $\alpha 4$, $\alpha 7$ und β nach fünftägiger DMSO-Behandlung beobachtet. Die stärkste Abnahme war für Importin $\alpha 1$ drei und fünf Tage nach Beginn der DMSO-Behandlung nachweisbar. Im Gegensatz dazu zeigten die Expressionslevel von Importin $\alpha 3$, $\alpha 5$ und CAS keine signifikanten Unterschiede nach DMSO-Behandlung. Auch hier zeigten die Kontroll-Western blots mit dem TRAP α -Antikörper, dass identische Mengen an Proteinlysaten aufgetragen waren.

3.7 Einfluss der spezifischen Inhibition einzelner Importin α Isoformen auf die Proliferation kultivierter humaner Zellen (V9)

Um die Frage beantworten zu können, ob die verschiedenen humanen α -Importine spezifische zelluläre Funktionen ausüben und damit essentiell sind, testeten wir die Hypothese, dass eine Inhibition der Importin α Expression das Wachstumsverhalten kultivierter Zellen beeinflusst. Für die Inhibition der Importine in kultivierten humanen Zellen wurde die neu beschriebene RNA-Interferenz Methode verwendet (Elbashir et al., 2001). Hierfür werden die Zellen mit für das Zielgen spezifischen doppelsträngigen RNA-Oligonukleotiden, sog. siRNAs (small interfering RNAs), von genau definierter Länge transfiziert. Mit Unterstützung eines intranukleär lokalisierten Nukleasekomplexes, RISC (RNA induced silencing complex), erfolgt die Bindung der siRNAs an die Ziel-mRNA. Die so entstandenen RNA-Komplexe werden über die Endonuklease Dicer in kurze RNA-Fragmente abgebaut (zur Übersicht s. Hannon, 2002).

Zunächst wurde die Halbwertszeit der humanen Importine mittels eines sogenannten cycloheximide decay assays bestimmt. In diesem Versuchsansatz wurde die Translation durch Cycloheximid blockiert und die Abnahme der zellulären Proteinmenge der verschiedenen Importine durch Western blots analysiert. Es zeigten sich für die Importine $\alpha 1$ und $\alpha 5$ Abnahmen der Proteinmengen auf 50% bzw. 70% nach 6 Stunden und auf 25% bzw. 50% nach 24 Stunden (V9, Fig. 1). Diese Effekte konnten durch Zugabe des Ubiquitin-Proteasom Inhibitors ALLN weitestgehend aufgehoben werden. Im Gegensatz zu den Importinen $\alpha 1$ und $\alpha 5$ war für die anderen Isoformen sowie für Importin β keine Degradation nachweisbar.

Um die Rolle der humanen α -Importine auf das Zellwachstum zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit spezifischen, gegen die verschiedenen Isoformen gerichteten siRNAs transfiziert. Da die Vorexperimente ergeben hatten, dass die meisten Importine sehr stabile Proteine sind, wurden die ersten Analysen der Importin α Proteinmengen nach drei- und sieben-tägiger siRNA-Behandlung durchgeführt. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurden

HeLa-Zellen mit einer Kontroll-siRNA gegen ein nicht-verwandtes Protein, TRAP α , transfiziert. Immunfluoreszenzuntersuchungen ergaben, dass in mehr als 95% der Zellen eine deutliche Signalreduktion nachweisbar war, während in weniger als 5% der Zellen die Signalintensitäten denen unbehandelter Zellen glich (V9, supplementary Fig. 1).

Drei Tage nach siRNA-Behandlung konnte nur für Importin $\alpha 1$ eine deutliche Abnahme der Proteinmenge nachgewiesen werden, während die Expression der anderen Isoformen im wesentlichen unverändert war (V9, Fig. 2B). Nach siebentägiger Transfektion war jedoch eine deutliche Abnahme für alle α -Importine nachweisbar (V9, Fig. 2C). Quantifizierung durch Vergleich mit Verdünnungskurven von Zelllysaten untransfizierter Zellen zeigten, dass die zelluläre Proteinmenge der verschiedenen Isoformen auf im Mittel 15 bis 30% ihrer Ausgangsmenge herunterreguliert werden konnte. Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse nicht durch unspezifische Effekte der jeweiligen siRNAs verursacht waren, wurde für Importin $\alpha 3$ eine zweite siRNA verwendet. Es fanden sich keine nennenswerten Unterschiede im Niveau der Proteinabnahme für Importin $\alpha 3$ zwischen den beiden siRNAs (im Mittel 21% vs. 27%). Im Gegensatz zu den α -Importinen fand sich nur eine geringe, aber reproduzierbare Abnahme der Proteinmenge von Importin β in überlebenden Zellen.

Um den Einfluß der Importin α -Abnahme auf das Wachstum der Zellen zu untersuchen, wurden die Zellzahlen untransfizierter und transfizierter Zellen nach sieben Tagen bestimmt und miteinander verglichen. Die Abnahme der Importine $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$ führte zu deutlichen Abnahmen der HeLa-Zellproliferation (V9, Fig. 3). Sieben Tage nach Beginn der siRNA-Transfektionen gegen diese Isoformen waren im Mittel nur weniger als 30% der Zellen im Vergleich zu nicht mit siRNA transfizierten Kontrollzellen vorhanden. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden verwendeten siRNAs gegen Importin $\alpha 3$ (im Mittel 25% vs. 32% der Negativkontrolle). Eine geringe, aber reproduzierbare Inhibition der Zellproliferation war auch für die Importin $\alpha 1$ -Abnahme nachweisbar. Demgegenüber war nach Abnahme von Importin $\alpha 4$ keine Inhibition der Zellproliferation nachweisbar. Die Hemmung der Importin β Expression führte zu einer den Importinen $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$ vergleichbaren Inhibition des HeLa-Zellwachstums.

4. Diskussion und Ausblick

Die Aktivierung spezifischer membranständiger Rezeptoren durch extrazelluläre Faktoren wie z. B. Mitogene oder Chemokine resultiert in der Aktivierung diverser intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden mit komplexen Kettenreaktionen. Transkriptionsfaktoren werden aktiviert, translozieren in den Zellkern und regulieren die Expression unterschiedlicher Zielgene. Die entstehende mRNA transloziert aus dem Zellkern in das Zytoplasma, um an den Ribosomen in Proteine translatiert zu werden. Diese wiederum können regulatorisch in das Schicksal der jeweiligen Zelle eingreifen und bestimmte Antworten der Zelle wie Proliferation, Apoptose, Differenzierung etc. verursachen. Die verschiedenen regulatorischen Schritte intrazellulärer Signaltransduktionskaskaden sind seit Jahren Gegenstand intensiver Forschung in Medizin und Zellbiologie. Eine Vielzahl zentraler regulatorischer Funktionen der unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren für Mechanismen wie Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Pathogenese diverser Erkrankungen sind mittlerweile identifiziert. Demgegenüber ist die Untersuchung der Mechanismen, welche die Translokation von Transkriptionsfaktoren und anderen Makromolekülen zwischen Zytoplasma und Zellkern regulieren, ein sehr junges Forschungsgebiet.

Der am intensivsten untersuchte nukleozytoplasmatische Importweg ist der „klassische“ Importin α/β -abhängige Importweg. Zwar existieren verschiedene andere, über diverse Importin β -verwandte Faktoren vermittelte Importwege aus dem Zytoplasma durch die Kernporen in den Zellkern, auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wurde, es ist jedoch nur ein humanes Importin β bekannt. Im Gegensatz dazu waren am Anfang der hier vorgelegten Arbeit bereits zwei humane α -Importine beschrieben (Cortes et al., 1994, Cuomo et al., 1994). Da Datenbankrecherchen zeigten, dass noch weitere humane Isoformen existieren mussten, stand am Beginn dieser Arbeit die Identifikation dieser neuen humanen α -Importine. Nach vollständiger Klonierung und Sequenzierung der kompletten cDNAs konnten die vier neu identifizierten und als Importin $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 6$ und $\alpha 7$ bezeichneten Gene zusammen mit den bekannten humanen Importinen $\alpha 1$ und $\alpha 5$ in drei Subfamilien unterteilt werden. Wenige Zeit vor bzw. nach unserer ersten Veröffentlichung über diese neuen Proteine wurden die humanen Importine $\alpha 3$ und $\alpha 4$ als Qip1 bzw. hSRP1 γ auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Seki et al., 1997, Nachury et al., 1998). Mittlerweile ist bekannt, dass die α -Importine und ihre Subfamilien in höheren Eukaryonten hochkonserviert sind. So konnten für alle humanen α -Importine außer für $\alpha 6$ in der Maus homologe Isoformen mit Identitäten von über 99% nachgewiesen werden (Tsuji et al., 1997). Auch in *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* konnte mittlerweile für jede Subfamilie eine Importin α Isoform identifiziert

werden. Demgegenüber ist in der Bierhefe *Saccharomyces cerevisiae* mit γ SRP1p nur ein α -Importin bekannt, dessen Fehlen letal ist (Yano et al., 1992, Yano et al., 1994). Die sich daraus ergebende zentrale Frage, welche den Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit bildet, war und ist die, ob und wenn ja welche spezifischen Funktionen die verschiedenen humanen α -Importine ausüben oder ob diese redundant sind und sich gegenseitig ersetzen können.

Ein erster Schritt zur Beantwortung dieser Frage waren die Analyse und der Vergleich der zell- und gewebespezifischen Expressionsmuster der Importine. Via Northern blots und Western blots mit selbst hergestellten Antikörpern zeigte sich, dass außer dem testisspezifischen Importin $\alpha 6$ alle anderen α -Importine ebenso wie weitere am klassischen Importweg beteiligte Faktoren (Importin β , CAS und Ran) in den meisten Zellen und Geweben nachweisbar sind. Jedoch unterscheiden sich die relativen Expressionsmuster der verschiedenen α -Importine zum Teil erheblich voneinander. Unterschiede in den Expressionsmustern verschiedener α -Importine wurden auch von anderen Arbeitsgruppen berichtet (Kamei et al., 1999, Nachury et al., 1998, Prieve et al., 1996, Tsuji et al., 1997). Diese differentiellen Expressionsmuster der verschiedenen α -Importine waren als ein erster Hinweis auf unterschiedliche spezifische Funktionen der verschiedenen Isoformen zu werten. Etwas überraschend war der Befund, dass in manchen Geweben mit relativ starker Expression der α -Importine die Faktoren Importin β , CAS und Ran relativ schwach exprimiert waren und umgekehrt. Dies könnte darin begründet sein, dass zwar nicht für CAS, jedoch für Ran, Importin β und Importin α mittlerweile andere Funktionen als die der Beteiligung am klassischen nukleozytoplasmatischen Proteinimportweg beschrieben wurden. So ist Ran als Triebkraft für die meisten nukleozytoplasmatischen Import- und Exportwege von essentieller Bedeutung (Moore, 1998). Importin β kann verschiedene Proteine auch ohne Importin α importieren (Jakel und Gorlich, 1998, Muhlhauser et al., 2001). Für Importin α wurde u. a. eine Rolle bei der mRNA Biogenese auf der Stufe der Cap-Methylierung berichtet (Wen und Shatkin, 2000). Alle drei Faktoren, Importin α , β und Ran, scheinen eine wichtige Rolle bei der Formation von Spindel und Kernmembran in der Mitose zu spielen (Askjaer et al., 2002, Geles et al., 2002, Gruss et al., 2001, Nachury et al., 2001, Timinszky et al., 2002, Wiese et al., 2001, Wilde und Zheng, 1999, Zhang et al., 2002). Es ist daher denkbar, dass die differentiellen Expressionsmuster zwischen den α -Importinen einerseits und Importin β und Ran andererseits in den unterschiedlichen Alternativ-Funktionen dieser Faktoren in verschiedenen Geweben begründet sind.

Die rekombinante Expression und Aufreinigung aller fünf ubiquitär exprimierten humanen α -Importine ermöglichte es, ihre Importfunktion mittels eines Kernimport-

Versuchssystemen *in vitro* tatsächlich nachzuweisen. Mit diesem Versuchsansatz konnten auch mehrere neue Substrate der α -Importine identifiziert werden. Die spannende Frage war jedoch, ob sich unterschiedliche Substratspezifitäten für die α -Importine nachweisen lassen würden. Zwar konnten *in vitro* die meisten untersuchten Faktoren, die über den klassischen Importweg in den Zellkern translozieren, prinzipiell von mehreren oder allen humanen α -Importinen in den Kern transportiert werden. RCC1 zeigte jedoch dagegen eine ausgeprägte Präferenz für Importin $\alpha 3$. Durch Wettbewerbsversuche mit der gleichzeitigen Zugabe von zwei unterschiedlich markierten Substraten konnten auch für mehrere andere Substrate unterschiedliche Importin α -Spezifitäten nachgewiesen werden. Auch andere Arbeitsgruppen fanden Hinweise für solche substratspezifischen Unterschiede der α -Importine (Nachury et al., 1998, Miyamoto et al., 1997, Nadler et al., 1997, Sekimoto et al., 1997). Allerdings basierten die Daten fast ausnahmslos ebenfalls auf *in vitro* Versuchen. Lediglich Sekimoto und Mitarbeiter fanden, dass die Injektion eines gegen Importin $\alpha 5$ gerichteten Antikörpers in kultivierte Zellen die Interferon α induzierte Translokation des Transkriptionsfaktors Stat1 in den Zellkern inhibierte während die Injektion eines gegen Importin $\alpha 1$ gerichteten Antikörpers keinen Effekt hatte (Sekimoto et al., 1997). In dieser Arbeit wurden jedoch nur zwei der humanen α -Importine analysiert. Zum anderen ist nicht mit Sicherheit auszuschließen, dass es sich um einen unspezifischen Effekt des Antikörpers handelte.

Ein überraschender Befund der *in vitro* Kernimport-Versuche war, dass RanBP3 trotz einer atypischen nicht-klassischen NLS über den klassischen Importweg in den Zellkern importiert werden konnte. Es gibt jedoch auch andere Proteine mit nicht-klassischer NLS, wie z. B. Stat1 oder das Influenza Nucleoprotein, für die eine Importin α/β -abhängige Translokation in den Zellkern beschrieben ist (Sekimoto et al., 1997, Wang et al., 1997). Umgekehrt gibt es Hinweise dafür, dass Proteine mit sehr großer Ähnlichkeit ihrer NLSs, wie die zum Wnt-signaling zählenden Transkriptionsfaktoren LEF-1 und TCF-1, trotzdem über unterschiedliche Transportfaktoren importiert werden können (Prieve et al., 1998).

Zu den hier untersuchten Substraten zählten u. a. auch je ein adeno- und influenzavirales Fusionsprotein. Für eine Reihe viraler Proteine sind die Faktoren, die den Import in den Zellkern regulieren, mittlerweile beschrieben. Für die meisten von ihnen wird eine Importin α -abhängige Translokation in den Zellkern vermutet (Chou et al., 1998, Fischer et al., 1997, Fontes et al., 2000, Gallay et al., 1996, Giesen et al., 2000, Goodwin und Whitehouse, 2001, Kann et al., 1999, Kim et al., 1997, La Boissiere et al., 1999, Merle et al., 1999, Nelson et al., 2002, O'Neill et al., 1995, Popov et al., 1998, Wang et al., 1997). Andere virale Proteine dagegen scheinen unabhängig von Importin α in den Zellkern zu translozieren (Efthymiadis

et al., 1998, Gally et al., 1996, Ojala et al., 2000, Palmeri und Malim, 1999, Sherman et al., 2001, Truant und Cullen, 1999). Bisher war jedoch noch für kein virales Protein eine Präferenz für eines der α -Importine beschrieben. Während in den hier dargelegten Versuchen für das Influenza Nucleoprotein keine Importin α -Spezifität nachweisbar war, konnte eine Präferenz des adenoviralen E1A für Importin α_3 gezeigt werden. Diese Spezifität des nukleozytoplasmatischen E1A-Imports lässt die Notwendigkeit einer besonderen Regulation dieses Virusproteins vermuten.

Die hier gezeigten Untersuchungen der Hefe-Untereinheiten des NAC-Komplexes führten zu folgenden Hauptbefunden: 1) NAC-Untereinheiten können tatsächlich zwischen Zytoplasma und Zellkern translozieren. 2) Der Import von NAC-Untereinheiten kann über verschiedene Importwege stattfinden. 3) Die NAC-NLS, über die der Kap123p/Pse1p vermittelte Import der NAC-Untereinheit Egd1p stattfindet, ist zwischen den Aminosäuren 11 und 17 lokalisiert. Bis dato war bekannt, dass der NAC-Komplex wichtige Funktionen am Ribosom bei der Proteinsynthese ausübt. Es gab jedoch vereinzelte Hinweise auf zusätzliche Funktionen der NAC-Proteine im Zellkern. Die hier vorgelegten Daten lassen vermuten, dass die NAC-Proteine in den Kern translozieren, um dort an ribosomale Proteine zu binden und mit diesen zusammen zu ihrem eigentlichen Ziel, den Ribosomen, zu gelangen. Zwar ist für mehrere Proteine wie Histone und ribosomale Proteine bekannt, dass sie in Abhängigkeit von verschiedenen β -homologen Importinen in den Zellkern translozieren können (Jakel und Gorch, 1998, Muhlhauser et al., 2001); Berichte über Substrate, die wie hier berichtet sowohl über den klassischen Importin α/β -vermittelten Importweg als auch über alternative Wege in den Zellkern importiert werden können, sind jedoch bisher rar (Savory et al., 1999). Diese Daten deuten in der Gesamtschau darauf hin, dass es einerseits überreichlich in der Zelle vorhandene essentielle Proteine gibt, deren Transport in den Zellkern über verschiedene Importwege sichergestellt ist. Demgegenüber stehen andere Faktoren, deren nukleozytoplasmatische Translokation durch hohe Spezifität für wenige oder sogar nur einen bestimmten Importfaktor eng kontrolliert und damit auch stärker regulierbar erscheint.

Die Ergebnisse der hier vorgelegten *in vitro* Studien sowie der Arbeiten anderer Gruppen bzgl. differentieller Expressionsmuster und unterschiedlicher Substratspezifitäten der α -Importine ließen spezifische Funktionen der verschiedenen Isoformen *in vivo* vermuten. Um in späteren Untersuchungen die Hypothese zu testen, dass verschiedene α -Importine an der Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Pathogenese von Krankheiten beteiligt sind, wurde in ersten hier vorgelegten Untersuchungen analysiert, ob die α -Importine in verschiedenen Zellkultur- und Tiermodellen differentiell reguliert sind. In diesen Arbeiten

konnte zum einen gezeigt werden, dass sich die humanen α -Importine nicht nur in ihren relativen, sondern auch in ihren absoluten Expressionsstärken in verschiedenen Zellen zum Teil deutlich voneinander unterscheiden. Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass die Expressionsmuster der verschiedenen Isoformen durch diverse externe Stimuli in unterschiedlichen Zellkulturmodellen für Proliferation und Differenzierung differentiell reguliert werden. Dabei zeigte sich, dass manche Importine wie $\alpha 3$ und $\alpha 5$ nur wenig reguliert wurden und sich eher wie „housekeeping“ Gene verhielten. Andere Isoformen wie $\alpha 1$, $\alpha 4$ und $\alpha 7$ dagegen schienen stärker und rascher durch externe Stimuli reguliert zu sein, was sie als Ziele für die Regulation zellulärer Prozesse wahrscheinlicher erscheinen lässt. Erste Hinweise für eine mögliche Rolle von α -Importinen bei der Pathogenese von Krankheiten ergaben sich bei den vorgelegten Studien über die Regulation der α -Importine in unterschiedlichen Diabetes-Modellen der Ratte sowie in Abhängigkeit von hohen Glukosekonzentrationen in verschiedenen kultivierten Zellen. Da die hier gezeigten diesbezüglichen Daten jedoch noch rein deskriptiver Natur sind, müssen nachfolgende funktionelle Analysen abgewartet werden, um beurteilen zu können, ob und wenn ja welche regulatorischen Rollen die diversen Importin α Isoformen bei der Pathogenese von Erkrankungen wie dem Diabetes mellitus tatsächlich spielen.

Diese zuletzt erwähnten deskriptiven Studien sind jedoch besonders interessant vor dem Hintergrund neuester Daten der eigenen wie auch anderer Arbeitsgruppen über die Effekte der Inhibition einzelner α -Importine in lebenden humanen Zellen bzw. in ganzen Organismen (*Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans*). Wie unter 3.7 dargelegt, führte die Herunterregulation der Proteinniveaus der Importine $\alpha 3$, $\alpha 5$ sowie $\alpha 7$ in humanen HeLa-Zellen mit Hilfe der kürzlich beschriebenen RNA-Interferenz Methode auf im Mittel ca. 20% jeweils zu einer deutlichen Inhibition der Zellproliferation. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Importine $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$ essentiell für die Proliferation von HeLa-Zellen sind. Das würde auch bedeuten, dass interessanterweise weder die stark homologen Isoformen $\alpha 5$ und $\alpha 7$, noch die zu einer gemeinsamen Subfamilie zählenden Importine $\alpha 3$ und $\alpha 4$ sich gegenseitig in ihren Funktionen ersetzen könnten. Da sich in ersten Experimenten auch zeigte, dass die Inhibition der Importin $\alpha 3$ Expression in humanen renalen Mesangiumzellen ebenfalls zu einer Proliferationsinhibition führen, scheinen die α -Importine auch für andere humane Zellen essentiell zu sein (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz zu den anderen Isoformen waren die inhibitorischen Einflüsse auf die HeLa-Zellproliferation nach Herunterregulation von Importin $\alpha 1$ und $\alpha 4$ nur gering bzw. gar nicht nachweisbar. Selbst eine Herunterregulation des Proteinniveaus von Importin $\alpha 4$ auf 10% in einem der Experimente, was in etwa

der Zahl der untransfizierten Zellen entsprechen dürfte, führte nicht zu einem signifikanten Abfall der Zellzahl. Es ist daher anzunehmen, dass Importin $\alpha 4$ keine größere Rolle bei der Regulation der Proliferation von HeLa-Zellen spielt. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass eine komplette Inhibition von Importin $\alpha 4$ ebenfalls einen Einfluß auf die zelluläre Proliferation hat. Die Inhibition der Importin β Expression war als Positivkontrolle gedacht, da Importin β neben seiner Rolle als zentraler Importfaktor des klassischen nukleozytoplasmatischen Proteinimportweges verschiedene Substrate auch ohne Importin α importieren kann (Gorlich und Kutay, 1999). Der Effekt der Inhibition der Zellproliferation durch Hemmung der Importin β Expression, der vergleichbar war mit den Effekten von Importin $\alpha 3$, $\alpha 5$ und $\alpha 7$, war daher erwartet. Allerdings deutete die nur geringe Abnahme der Menge an Importin β in den noch verbliebenen überlebenden Zellen darauf hin, dass im Gegensatz zu den α -Importinen bereits eine geringe Abnahme der Menge an Importin β das Wachstum der jeweiligen Zelle verhinderte.

Bis dato ist wenig bekannt über die Bedeutung der Existenz verschiedener α -Importine in vivo. Die bisher verfügbaren Informationen waren auf Nicht-Vertebraten beschränkt. Die essentielle Bedeutung des einzigen α -Importins in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, ySRP1p, war schon vor seiner Identifikation als nukleozytoplasmatischer Importfaktor bekannt (Yano et al., 1994). Mathe und Mitarbeiter zeigten, dass die Mutation von *Drosophila*-Importin $\alpha 3$ zum Absterben bzw. zum Stillstand der Oogenese überlebender Fliegen führt (Mathe et al., 2000). Eine ähnliche Rolle von Importin $\alpha 3$ wurde für die Embryonal- und Larvenentwicklung in *C. elegans* beschrieben (Geles und Adam, 2001). *Drosophila* Importin $\alpha 2$, welches das Homologe des humanen $\alpha 1$ -Importins ist, scheint wegen seiner zentralen Rolle bei der Assemblierung des Ringkanals für die Oogenese von essentieller Bedeutung zu sein, während seine Funktion bei der Spermatogenese von den beiden anderen *Drosophila* Importin α Proteinen übernommen werden kann (Gorjanacz et al., 2002, Mason et al., 2002). Kürzlich wurde eine Rolle des *C. elegans* α Importins IMA-2 für den Zusammenbau der Kernmembran beschrieben (Askjaer et al., 2002, Geles et al., 2002). So können also das Fehlen oder die Inhibition einer der drei Importin α -Isoformen, die jeweils in *D. melanogaster* und *C. elegans* vorhanden sind, unterschiedliche Phänotypen verursachen. Obwohl sie aber nur ca. 50% Identität zueinander besitzen, scheinen sie sich dennoch zumindest zum Teil in ihren Funktionen ersetzen zu können. Es war daher ein überraschender Befund, dass ein Mangel eines humanen α -Importins bei den meisten Isoformen so dramatische Effekte auf die HeLa-Zellproliferation bewirkte. Sogar Isoformen der gleichen Subfamilie mit hohen Homologien wie die Importine $\alpha 5$ und $\alpha 7$ konnten einander in ihrer Funktion nicht ersetzen. Verschiedene in

in vitro Studien hatten gezeigt, dass sich die α -Importine in ihren Substratspezifitäten unterscheiden, dass sie aber ebenso fähig waren, identische Substrate zu importieren (Franke et al., 2001, Kohler et al., 1999b, Kohler et al., 2001, Nachury et al., 1998, Miyamoto et al., 1997, Welch et al., 1999). Es ist daher anzunehmen, dass für die beschriebenen Effekte Importspezifitäten der verschiedenen α -Importine für bestimmte Substrate, welche essentielle Funktionen bei der Regulation der Zellproliferation ausüben, verantwortlich sind. Diese Befunde deuten auf eine zunehmende Spezifität der α -Importine während der Evolution hin, die in einer zusätzlichen Stufe der Regulation der Signaltransduktionskaskaden resultiert haben könnte. Das Fehlen einer kompensatorischen Hochregulation anderer α -Importine unterstützt diese Hypothese. Man könnte spekulieren, dass die Plastizität der nukleozytoplasmatischen Importwege während der Evolution verloren gegangen ist und dafür ein höherer Grad an Spezialisierung erreicht wurde. Dies dürfte ein generelles Phänomen von Zellen höherer Eukaryonten sein.

Derzeit sind die Mechanismen, welche die durch Importin α -Mangel verursachte Abnahme der Zellzahl verursachen, unklar. Ein klarer Apoptosenachweis nach RNA-Interferenz induzierter Importin α Inhibition konnte nicht gezeigt werden (V9, Daten nicht gezeigt). Zum einen wurden jedoch auch keine nennenswerten Mengen an abgelösten toten Zellen nach Importin α Inhibition nachgewiesen. Des weiteren wurde berichtet, dass die Überexpression von Importin $\alpha 1$ zu einem Anstieg der zellulären Apoptose führt (Kim et al., 2000), so dass der fehlende Nachweis einer gesteigerten Apoptose in Importin α depletierten Zellen keine Überraschung darstellte.

Zusammenfassend lässt sich resümieren, dass in der vorliegenden Arbeit die Identifikation und Klonierung neuer Isoformen der humanen Importin α Proteinfamilie beschrieben wurde. Nach der Analyse der Gewebeverteilung konnte in vitro die tatsächliche Importfunktion der neu identifizierten α -Importine verifiziert sowie unterschiedliche Substratspezifitäten nachgewiesen werden. Neueste Untersuchungen in kultivierten Zellen zeigen, dass sich die meisten Importin α Isoformen nicht generell ersetzen können, sondern spezifische Funktionen ausüben scheinen. Differentielle Expressionsmuster deuten daraufhin, dass die α -Importine zentrale Bedeutung nicht nur für Zellproliferation, sondern auch für Zelldifferenzierung und Pathogenese von Krankheiten haben könnten.

In weiterführenden Experimenten sollen zum einen die Ursachen für die Inhibition der Zellproliferation bei Importin α -Mangel geklärt werden. Durch sogenannte yeast two-hybrid Versuche sollen neue Substrate der humanen α -Importine identifiziert werden, um die Frage zu klären, welche Faktoren die unterschiedlichen Substratspezifitäten begründen. Bindungsstudien mit verschiedenen Substraten und unterschiedlichen Teilsequenzen diverser humaner

α -Importine, die in Zusammenarbeit mit einer finnischen Arbeitsgruppe um Dr. I. Julkunen stattfinden, liefern diesbezüglich aktuell neue Einsichten (Melen et al., eingereicht). Zusätzliche Antwort auf diese Frage sollten Untersuchungen bzgl. der Strukturunterschiede der verschiedenen α -Importine durch Kristallisierungsexperimente ergeben, welche derzeit in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. B. Kobe, Australien, durchgeführt werden. Der Frage, welche Rolle einzelne α -Importine für die Funktion des Gesamtorganismus höherer Eukaryonten spielen, wird derzeit durch Generierung unterschiedlicher knock-out Mäuse in Zusammenarbeit mit PD Dr. M. Bader am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin untersucht. Aktuell gefundene Hinweise auf eine zentrale Bedeutung der α -Importine für intrazelluläre Signalmechanismen in verletzten Neuronen sind ein weiteres Indiz für die wichtige Bedeutung der Importine in vivo (Hanz et al., eingereicht).

5. Literaturverzeichnis

- Adam, S. A., Marr, R. S., and Gerace, L. (1990). Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors, *J Cell Biol* *111*, 807-16.
- Allen, T. D., Cronshaw, J. M., Bagley, S., Kiseleva, E., and Goldberg, M. W. (2000). The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus and cytoplasm, *J Cell Sci* *113*, 1651-9.
- Askjaer, P., Galy, V., Hannak, E., and Mattaj, I. W. (2002). Ran GTPase Cycle and Importins alpha and beta Are Essential for Spindle Formation and Nuclear Envelope Assembly in Living *Caenorhabditis elegans* Embryos, *Mol Biol Cell* *13*, 4355-70.
- Bischoff, F. R., Krebber, H., Smirnova, E., Dong, W., and Ponstingl, H. (1995). Co-activation of RanGTPase and inhibition of GTP dissociation by Ran- GTP binding protein RanBP1, *Embo J* *14*, 705-15.
- Bischoff, F. R., and Ponstingl, H. (1991). Catalysis of guanine nucleotide exchange on Ran by the mitotic regulator RCC1, *Nature* *354*, 80-2.
- Catimel, B., Teh, T., Fontes, M. R., Jennings, I. G., Jans, D. A., Howlett, G. J., Nice, E. C., and Kobe, B. (2001). Biophysical characterization of interactions involving importin-alpha during nuclear import, *J Biol Chem* *276*, 34189-98.
- Chou, H. C., Hsieh, T. Y., Sheu, G. T., and Lai, M. M. (1998). Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA, *J Virol* *72*, 3684-90.
- Christophe, D., Christophe-Hobertus, C., and Pichon, B. (2000). Nuclear targeting of proteins: how many different signals?, *Cell Signal* *12*, 337-41.
- Conti, E., and Izaurralde, E. (2001). Nucleocytoplasmic transport enters the atomic age, *Curr Opin Cell Biol* *13*, 310-9.
- Cordes, V. C., Reidenbach, S., and Franke, W. W. (1995). High content of a nuclear pore complex protein in cytoplasmic annulate lamellae of *Xenopus* oocytes, *Eur J Cell Biol* *68*, 240-55.
- Cortes, P., Ye, Z. S., and Baltimore, D. (1994). RAG-1 interacts with the repeated amino acid motif of the human homologue of the yeast protein SRP1, *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 7633-7.

- Cuomo, C. A., Kirch, S. A., Gyuris, J., Brent, R., and Oettinger, M. A. (1994). Rch1, a protein that specifically interacts with the RAG-1 recombination-activating protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 6156-60.
- Edelhoch, H. (1967). Spectroscopic determination of tryptophan and tyrosine in proteins, *Biochemistry* *6*, 1948-54.
- Efthymiadis, A., Briggs, L. J., and Jans, D. A. (1998). The HIV-1 Tat nuclear localization sequence confers novel nuclear import properties, *J Biol Chem* *273*, 1623-8.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells, *Nature* *411*, 494-8.
- Englmeier, L., Fornerod, M., Bischoff, F. R., Petosa, C., Mattaj, I. W., and Kutay, U. (2001). RanBP3 influences interactions between CRM1 and its nuclear protein export substrates, *EMBO Rep* *2*, 926-32.
- Englmeier, L., Olivo, J. C., and Mattaj, I. W. (1999). Receptor-mediated substrate translocation through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis, *Curr Biol* *9*, 30-41.
- Fischer, N., Kremmer, E., Lautscham, G., Mueller-Lantsch, N., and Grasser, F. A. (1997). Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 forms a complex with the nuclear transporter karyopherin alpha2, *J Biol Chem* *272*, 3999-4005.
- Fontes, M. R., Teh, T., and Kobe, B. (2000). Structural basis of recognition of monopartite and bipartite nuclear localization sequences by mammalian importin-alpha, *J Mol Biol* *297*, 1183-94.
- Franke, J., Reimann, B., Hartmann, E., Kohler, M., and Wiedmann, B. (2001). Evidence for a nuclear passage of nascent polypeptide-associated complex subunits in yeast, *J Cell Sci* *114*, 2641-8.
- Gallay, P., Stitt, V., Mundy, C., Oettinger, M., and Trono, D. (1996). Role of the karyopherin pathway in human immunodeficiency virus type 1 nuclear import, *J Virol* *70*, 1027-32.
- Geles, K. G., and Adam, S. A. (2001). Germline and developmental roles of the nuclear transport factor importin alpha3 in *C. elegans*, *Development* *128*, 1817-30.
- Geles, K. G., Johnson, J. J., Jong, S., and Adam, S. A. (2002). A role for *Caenorhabditis elegans* importin IMA-2 in germ line and embryonic mitosis, *Mol Biol Cell* *13*, 3138-47.

- Giesen, K., Radsak, K., and Bogner, E. (2000). The potential terminase subunit of human cytomegalovirus, pUL56, is translocated into the nucleus by its own nuclear localization signal and interacts with importin alpha, *J Gen Virol* *81*, 2231-44.
- Goldstein, L. (1958). Localization of nucleus-specific protein as shown by transplantation experiments in amoeba proteus, *Experimental Cell Research* *15*, 635-637.
- Goodwin, D. J., and Whitehouse, A. (2001). A gamma-2 herpesvirus nucleocytoplasmic shuttle protein interacts with importin alpha 1 and alpha 5, *J Biol Chem* *276*, 19905-12.
- Gorjanacz, M., Adam, G., Torok, I., Mechler, B. M., Szlanka, T., and Kiss, I. (2002). Importin-alpha 2 is critically required for the assembly of ring canals during *Drosophila* oogenesis, *Dev Biol* *251*, 271-82.
- Gorlich, D., Henklein, P., Laskey, R. A., and Hartmann, E. (1996a). A 41 amino acid motif in importin-alpha confers binding to importin- beta and hence transit into the nucleus, *Embo J* *15*, 1810-7.
- Gorlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R. A., Hartmann, E., and Prehn, S. (1995a). Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope, *Curr Biol* *5*, 383-92.
- Gorlich, D., and Kutay, U. (1999). Transport between the cell nucleus and the cytoplasm, *Annu Rev Cell Dev Biol* *15*, 607-60.
- Gorlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aebi, U., and Bischoff, F. R. (1996b). Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import, *Embo J* *15*, 5584-94.
- Gorlich, D., Prehn, S., Laskey, R. A., and Hartmann, E. (1994). Isolation of a protein that is essential for the first step of nuclear protein import, *Cell* *79*, 767-78.
- Gorlich, D., Vogel, F., Mills, A. D., Hartmann, E., and Laskey, R. A. (1995b). Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import, *Nature* *377*, 246-8.
- Gruss, O. J., Carazo-Salas, R. E., Schatz, C. A., Guarguaglini, G., Kast, J., Wilm, M., Le Bot, N., Vernos, I., Karsenti, E., and Mattaj, I. W. (2001). Ran induces spindle assembly by reversing the inhibitory effect of importin alpha on TPX2 activity, *Cell* *104*, 83-93.
- Hannon, G. J. (2002). RNA interference, *Nature* *418*, 244-51.
- Imamoto, N., Shimamoto, T., Takao, T., Tachibana, T., Kose, S., Matsubae, M., Sekimoto, T., Shimonishi, Y., and Yoneda, Y. (1995). In vivo evidence for involvement of a 58 kDa component of nuclear pore- targeting complex in nuclear protein import, *Embo J* *14*, 3617-26.

- Jakel, S., and Gorlich, D. (1998). Importin beta, transportin, RanBP5 and RanBP7 mediate nuclear import of ribosomal proteins in mammalian cells, *Embo J* 17, 4491-502.
- Jans, D. A., Xiao, C. Y., and Lam, M. H. (2000). Nuclear targeting signal recognition: a key control point in nuclear transport?, *Bioessays* 22, 532-44.
- Kalab, P., Weis, K., and Heald, R. (2002). Visualization of a Ran-GTP gradient in interphase and mitotic *Xenopus* egg extracts, *Science* 295, 2452-6.
- Kalderon, D., Roberts, B. L., Richardson, W. D., and Smith, A. E. (1984). A short amino acid sequence able to specify nuclear location, *Cell* 39, 499-509.
- Kamei, Y., Yuba, S., Nakayama, T., and Yoneda, Y. (1999). Three distinct classes of the alpha-subunit of the nuclear pore- targeting complex (importin-alpha) are differentially expressed in adult mouse tissues, *J Histochem Cytochem* 47, 363-72.
- Kann, M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W. H., and Helenius, A. (1999). Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex, *J Cell Biol* 145, 45-55.
- Kim, A. L., Maher, M., Hayman, J. B., Ozer, J., Zerby, D., Yates, J. L., and Lieberman, P. M. (1997). An imperfect correlation between DNA replication activity of Epstein- Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) and binding to the nuclear import receptor, Rch1/importin alpha, *Virology* 239, 340-51.
- Kim, I. S., Kim, D. H., Han, S. M., Chin, M. U., Nam, H. J., Cho, H. P., Choi, S. Y., Song, B. J., Kim, E. R., Bae, Y. S., and Moon, Y. H. (2000). Truncated form of importin alpha identified in breast cancer cell inhibits nuclear import of p53, *J Biol Chem* 275, 23139-45.
- Klebe, C., Prinz, H., Wittinghofer, A., and Goody, R. S. (1995). The kinetic mechanism of Ran--nucleotide exchange catalyzed by RCC1, *Biochemistry* 34, 12543-52.
- Kobe, B. (1999). Autoinhibition by an internal nuclear localization signal revealed by the crystal structure of mammalian importin alpha [see comments], *Nat Struct Biol* 6, 388-97.
- Kohler, M., Gorlich, D., Hartmann, E., and Franke, J. (2001). Adenoviral E1A Protein Nuclear Import Is Preferentially Mediated by Importin alpha3 in Vitro, *Virology* 289, 186-91.
- Kohler, M., Haller, H., and Hartmann, E. (1999a). Nuclear protein transport pathways, *Exp Nephrol* 7, 290-4.

- Kohler, M., Speck, C., Christiansen, M., Bischoff, F. R., Prehn, S., Haller, H., Gorlich, D., and Hartmann, E. (1999b). Evidence for distinct substrate specificities of importin alpha family members in nuclear protein import, *Mol Cell Biol* *19*, 7782-91.
- Kuersten, S., Ohno, M., and Mattaj, I. W. (2001). Nucleocytoplasmic transport: Ran, beta and beyond, *Trends Cell Biol* *11*, 497-503.
- Kutay, U., Bischoff, F. R., Kostka, S., Kraft, R., and Gorlich, D. (1997). Export of importin alpha from the nucleus is mediated by a specific nuclear transport factor [see comments], *Cell* *90*, 1061-71.
- La Boissiere, S., Hughes, T., and O'Hare, P. (1999). HCF-dependent nuclear import of VP16, *Embo J* *18*, 480-9.
- Lanford, R. E., and Butel, J. S. (1984). Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen, *Cell* *37*, 801-13.
- Lyons, R. H., Ferguson, B. Q., and Rosenberg, M. (1987). Pentapeptide nuclear localization signal in adenovirus E1a, *Mol Cell Biol* *7*, 2451-6.
- Macara, I. G. (2001). Transport into and out of the nucleus, *Microbiol Mol Biol Rev* *65*, 570-94, table of contents.
- Mahajan, R., Delphin, C., Guan, T., Gerace, L., and Melchior, F. (1997). A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2, *Cell* *88*, 97-107.
- Mason, D. A., Fleming, R. J., and Goldfarb, D. S. (2002). *Drosophila melanogaster* Importin alpha1 and alpha3 Can Replace Importin alpha2 During Spermatogenesis but Not Oogenesis, *Genetics* *161*, 157-70.
- Mathe, E., Bates, H., Huikeshoven, H., Deak, P., Glover, D. M., and Cotterill, S. (2000). Importin-alpha3 is required at multiple stages of *Drosophila* development and has a role in the completion of oogenesis, *Dev Biol* *223*, 307-22.
- Matunis, M. J., Coutavas, E., and Blobel, G. (1996). A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex, *J Cell Biol* *135*, 1457-70.
- Melchior, F., Paschal, B., Evans, J., and Gerace, L. (1993). Inhibition of nuclear protein import by nonhydrolyzable analogues of GTP and identification of the small GTPase Ran/TC4 as an essential transport factor, *J Cell Biol* *123*, 1649-59.

- Merle, E., Rose, R. C., LeRoux, L., and Moroianu, J. (1999). Nuclear import of HPV11 L1 capsid protein is mediated by karyopherin alpha2beta1 heterodimers, *J Cell Biochem* 74, 628-37.
- Miyamoto, Y., Imamoto, N., Sekimoto, T., Tachibana, T., Seki, T., Tada, S., Enomoto, T., and Yoneda, Y. (1997). Differential modes of nuclear localization signal (NLS) recognition by three distinct classes of NLS receptors, *J Biol Chem* 272, 26375-81.
- Moore, M. S. (1998). Ran and nuclear transport, *J Biol Chem* 273, 22857-60.
- Moore, M. S., and Blobel, G. (1993). The GTP-binding protein Ran/TC4 is required for protein import into the nucleus, *Nature* 365, 661-3.
- Moroianu, J., Blobel, G., and Radu, A. (1995). Previously identified protein of uncertain function is karyopherin alpha and together with karyopherin beta docks import substrate at nuclear pore complexes, *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 2008-11.
- Muhlhauser, P., Muller, E. C., Otto, A., and Kutay, U. (2001). Multiple pathways contribute to nuclear import of core histones, *EMBO Rep* 2, 690-6.
- Nachury, M. V., Maresca, T. J., Salmon, W. C., Waterman-Storer, C. M., Heald, R., and Weis, K. (2001). Importin beta is a mitotic target of the small GTPase Ran in spindle assembly, *Cell* 104, 95-106.
- Nachury, M. V., Ryder, U. W., Lamond, A. I., and Weis, K. (1998). Cloning and characterization of hSRP1 gamma, a tissue-specific nuclear transport factor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 582-7.
- Nadler, S. G., Tritschler, D., Haffar, O. K., Blake, J., Bruce, A. G., and Cleveland, J. S. (1997). Differential expression and sequence-specific interaction of karyopherin alpha with nuclear localization sequences, *J Biol Chem* 272, 4310-5.
- Nelson, L. M., Rose, R. C., and Moroianu, J. (2002). Nuclear import strategies of high risk HPV16 L1 major capsid protein, *J Biol Chem* 277, 23958-64.
- Nemergut, M. E., Lindsay, M. E., Brownawell, A. M., and Macara, I. G. (2002). Ran-binding Protein 3 Links Crm1 to the Ran Guanine Nucleotide Exchange Factor, *J Biol Chem* 277, 17385-8.
- Newmeyer, D. D., and Forbes, D. J. (1988). Nuclear import can be separated into distinct steps in vitro: nuclear pore binding and translocation, *Cell* 52, 641-53.

- Ojala, P. M., Sodeik, B., Ebersold, M. W., Kutay, U., and Helenius, A. (2000). Herpes simplex virus type 1 entry into host cells: reconstitution of capsid binding and uncoating at the nuclear pore complex in vitro, *Mol Cell Biol* *20*, 4922-31.
- O'Neill, R. E., Jaskunas, R., Blobel, G., Palese, P., and Moroianu, J. (1995). Nuclear import of influenza virus RNA can be mediated by viral nucleoprotein and transport factors required for protein import, *J Biol Chem* *270*, 22701-4.
- Palmeri, D., and Malim, M. H. (1999). Importin beta can mediate the nuclear import of an arginine-rich nuclear localization signal in the absence of importin alpha, *Mol Cell Biol* *19*, 1218-25.
- Paschal, B. M., Delphin, C., and Gerace, L. (1996). Nucleotide-specific interaction of Ran/TC4 with nuclear transport factors NTF2 and p97, *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 7679-83.
- Popov, S., Rexach, M., Zybarth, G., Reiling, N., Lee, M. A., Ratner, L., Lane, C. M., Moore, M. S., Blobel, G., and Bukrinsky, M. (1998). Viral protein R regulates nuclear import of the HIV-1 pre-integration complex, *Embo J* *17*, 909-17.
- Prieve, M. G., Guttridge, K. L., Munguia, J., and Waterman, M. L. (1998). Differential importin-alpha recognition and nuclear transport by nuclear localization signals within the high-mobility-group DNA binding domains of lymphoid enhancer factor 1 and T-cell factor 1, *Mol Cell Biol* *18*, 4819-32.
- Prieve, M. G., Guttridge, K. L., Munguia, J. E., and Waterman, M. L. (1996). The nuclear localization signal of lymphoid enhancer factor-1 is recognized by two differentially expressed Srp1-nuclear localization sequence receptor proteins, *J Biol Chem* *271*, 7654-8.
- Radu, A., Blobel, G., and Moore, M. S. (1995). Identification of a protein complex that is required for nuclear protein import and mediates docking of import substrate to distinct nucleoporins, *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 1769-73.
- Ribbeck, K., and Gorlich, D. (2001). Kinetic analysis of translocation through nuclear pore complexes, *Embo J* *20*, 1320-30.
- Ribbeck, K., Kutay, U., Paraskeva, E., and Gorlich, D. (1999). The translocation of transportin-cargo complexes through nuclear pores is independent of both Ran and energy, *Curr Biol* *9*, 47-50.

- Ribbeck, K., Lipowsky, G., Kent, H. M., Stewart, M., and Gorlich, D. (1998). NTF2 mediates nuclear import of Ran, *Embo J* 17, 6587-98.
- Richards, S. A., Lounsbury, K. M., Carey, K. L., and Macara, I. G. (1996). A nuclear export signal is essential for the cytosolic localization of the Ran binding protein, RanBP1, *J Cell Biol* 134, 1157-68.
- Richardson, W. D., Mills, A. D., Dilworth, S. M., Laskey, R. A., and Dingwall, C. (1988). Nuclear protein migration involves two steps: rapid binding at the nuclear envelope followed by slower translocation through nuclear pores, *Cell* 52, 655-64.
- Robbins, J., Dilworth, S. M., Laskey, R. A., and Dingwall, C. (1991). Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence, *Cell* 64, 615-23.
- Rout, M. P., Aitchison, J. D., Suprpto, A., Hjertaas, K., Zhao, Y., and Chait, B. T. (2000). The yeast nuclear pore complex: composition, architecture, and transport mechanism, *J Cell Biol* 148, 635-51.
- Savory, J. G., Hsu, B., Laquian, I. R., Giffin, W., Reich, T., Hache, R. J., and Lefebvre, Y. A. (1999). Discrimination between NL1- and NL2-mediated nuclear localization of the glucocorticoid receptor, *Mol Cell Biol* 19, 1025-37.
- Schlenstedt, G., Smirnova, E., Deane, R., Solsbacher, J., Kutay, U., Gorlich, D., Ponstingl, H., and Bischoff, F. R. (1997). Yrb4p, a yeast ran-GTP-binding protein involved in import of ribosomal protein L25 into the nucleus, *Embo J* 16, 6237-49.
- Seki, T., Tada, S., Katada, T., and Enomoto, T. (1997). Cloning of a cDNA encoding a novel importin-alpha homologue, Qip1: discrimination of Qip1 and Rch1 from hSrp1 by their ability to interact with DNA helicase Q1/RecQL, *Biochem Biophys Res Commun* 234, 48-53.
- Sekimoto, T., Imamoto, N., Nakajima, K., Hirano, T., and Yoneda, Y. (1997). Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1, *Embo J* 16, 7067-77.
- Sherman, M. P., de Noronha, C. M., Heusch, M. I., Greene, S., and Greene, W. C. (2001). Nucleocytoplasmic shuttling by human immunodeficiency virus type 1 Vpr, *J Virol* 75, 1522-32.
- Smith, A., Brownawell, A., and Macara, I. G. (1998). Nuclear import of Ran is mediated by the transport factor NTF2, *Curr Biol* 8, 1403-6.

- Timinszky, G., Tirian, L., Nagy, F. T., Toth, G., Perczel, A., Kiss-Laszlo, Z., Boros, I., Clarke, P. R., and Szabad, J. (2002). The importin-beta P446L dominant-negative mutant protein loses RanGTP binding ability and blocks the formation of intact nuclear envelope, *J Cell Sci* *115*, 1675-87.
- Truant, R., and 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*, 1210-7.
- Tsuji, L., Takumi, T., Imamoto, N., and Yoneda, Y. (1997). Identification of novel homologues of mouse importin alpha, the alpha subunit of the nuclear pore-targeting complex, and their tissue- specific expression, *FEBS Lett* *416*, 30-4.
- Vasu, S. K., and Forbes, D. J. (2001). Nuclear pores and nuclear assembly, *Curr Opin Cell Biol* *13*, 363-75.
- Wang, P., Palese, P., and O'Neill, R. E. (1997). The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal, *J Virol* *71*, 1850-6.
- Weber, F., Kochs, G., Gruber, S., and Haller, O. (1998). A classical bipartite nuclear localization signal on Thogoto and influenza A virus nucleoproteins, *Virology* *250*, 9-18.
- Weis, K., Ryder, U., and Lamond, A. I. (1996). The conserved amino-terminal domain of hSRP1 alpha is essential for nuclear protein import, *Embo J* *15*, 1818-25.
- Welch, K., Franke, J., Kohler, M., and Macara, I. G. (1999). RanBP3 contains an unusual nuclear localization signal that is imported preferentially by importin-alpha3, *Mol Cell Biol* *19*, 8400-11.
- Wen, Y., and Shatkin, A. J. (2000). Cap methyltransferase selective binding and methylation of GpppG-RNA are stimulated by importin-alpha [In Process Citation], *Genes Dev* *14*, 2944-9.
- Wiese, C., Wilde, A., Moore, M. S., Adam, S. A., Merdes, A., and Zheng, Y. (2001). Role of importin-beta in coupling Ran to downstream targets in microtubule assembly, *Science* *291*, 653-6.
- Wilde, A., and Zheng, Y. (1999). Stimulation of microtubule aster formation and spindle assembly by the small GTPase Ran [see comments], *Science* *284*, 1359-62.

Yano, R., Oakes, M., Yamagishi, M., Dodd, J. A., and Nomura, M. (1992). Cloning and characterization of SRP1, a suppressor of temperature- sensitive RNA polymerase I mutations, in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol Cell Biol* *12*, 5640-51.

Yano, R., Oakes, M. L., Tabb, M. M., and Nomura, M. (1994). Yeast Srp1p has homology to armadillo/plakoglobin/beta-catenin and participates in apparently multiple nuclear functions including the maintenance of the nucleolar structure, *Proc Natl Acad Sci U S A* *91*, 6880-4.

Zhang, C., Hutchins, J. R., Muhlhauser, P., Kutay, U., and Clarke, P. R. (2002). Role of Importin-beta in the Control of Nuclear Envelope Assembly by Ran, *Curr Biol* *12*, 498-502.

6. Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Prof. Dr. Enno Hartmann, unter dessen Leitung die hier vorgelegten Arbeiten begonnen wurden und mit dem mich weiterhin eine sehr enge Kooperation verbindet.

Prof. Dr. Friedrich C. Luft ist als Vorbild und Lehrer in Klinik und Wissenschaft sicher einzigartig. Unter seiner Anleitung und mit seiner Hilfe arbeiten zu dürfen ist von unschätzbarem Wert. Für die seit Jahren kontinuierliche Unterstützung meiner Arbeiten und nicht zuletzt auch für den „Feinschliff“ bei der Fertigstellung der Manuskripte sei ihm auf das Herzlichste gedankt.

Prof. Dr. Hermann Haller war maßgeblich für den Beginn meiner Arbeiten an dem vorliegenden Projekt verantwortlich. Ihm danke ich für die Unterstützung und Ermutigung insbesondere während meiner Anfangszeit in Berlin. Seinen Arbeitsgruppenmitgliedern Carsten Lindschau, Petra Quass, Christiane Becker und Dr. Olaf Schäfer danke ich für die Unterstützung u. a. bei Arbeiten am konfokalen Mikroskop, für die wichtigen Diskussionen und die angenehme Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Siegfried Prehn und Elke Bürger möchte ich für die Unterstützung besonders zu Beginn meiner Arbeiten an dem hier vorgelegten Projekt danken. Beide waren an den Arbeiten der Klonierung und Sequenzierung der neuen humanen α -Importine beteiligt. Dr. Marret Christiansen, Maite Hartwig und Sebastian Thiel haben unter Anleitung von Prof. Prehn und mir im Rahmen ihrer medizinischen Dissertationen wichtige Beiträge zur vollständigen Klonierung und Charakterisierung von Importin $\alpha 7$ (M.C.) bzw. der Analyse der Expressionsmuster der α -Importine in Abhängigkeit von Zellproliferation und -differenzierung (M. H. und S. T.) geliefert. Für Beiträge zu letztgenannten Untersuchungen danke ich auch Dr. Anette Fiebler und PD Dr. Ralph Kettritz.

Prof. Dr. Dirk Görlich bin ich für eine ungemein intensive und produktive Phase während meines Aufenthaltes in seinem Labor am ZMBH Heidelberg sowie für die zur Verfügungstellung diverser Klone und Proteine verpflichtet. Dank auch an seine Mitarbeiter, insbesondere an Dr. Katharina Ribbeck für die Einweisung in die Methode der *in vitro* Kernimport-Versuche.

PD Dr. Eckhard Schulze-Lohoff und meinem leider viel zu früh verstorbenen Doktorvater Prof. Dr. Ralf B. Sterzel möchte ich für die intensive Betreuung während meiner Zeit als Doktorand an der Medizinischen Klinik IV der FAU Erlangen-Nürnberg danken, da diese Zeit weichenstellend für meinen weiteren beruflichen Werdegang war.

Dr. Stephane Ansieau aus der Arbeitsgruppe von Dr. Achim Leutz am Max-Delbrück-Centrum war maßgeblich an der vollständigen Klonierung des humanen Importin $\alpha 4$ beteiligt. Dr. Christian Speck und Dr. F. Ralf Bischoff leiteten die Bindungsstudien der α -Importine mit Importin β und CAS.

Prof. Dr. Igor Buchwalow, Dr. Vera Samoiloova und Dr. Erdenechimeg Shagdarsuren danke ich für die Beiträge zu den Immunfluoreszenzuntersuchungen an diabetischen Ratten. Dr. Eero M. A. Mervaala, Helsinki, stellte die Goto-Kakizaki Ratten für dieses Projekt zur Verfügung und Gabriele Alexander war maßgeblich an der Durchführung der Western blots für diese Untersuchungen beteiligt.

Dr. Jacqueline Franke hat während ihrer Zeit als naturwissenschaftliche Doktorandin unter meiner Leitung die überwiegenden Teile zu den Arbeiten über RanBP3, NAC und E1A beigetragen. Die wissenschaftliche Leitung des NAC-Projektes lag dabei überwiegend in Händen von Dr. Brigitte Wiedmann unter Mitarbeit von Dr. Barbara Reimann, Institut für Biochemie der Charité Berlin. Die Arbeiten zu RanBP3 erfolgten im Rahmen einer Kooperation mit Dr. Katie Welch und Prof. Ian G. Macara, Charlottesville, USA.

Brigitte Nentwig und Angelika Wittstruck möchte ich für die seit Jahren konstant hervorragende technische Hilfe u. a. bei der Herstellung der Antikörper, der Aufreinigung von Proteinen und den aufwendigen Klonierungs- und Zellkulturarbeiten sowie für die Verbreitung eines stets angenehmen Arbeitsklimas in unserer Arbeitsgruppe danken. Dr. Christina Quensel und Beate Friedrich danke ich für die begeisterte Mitarbeit unter hohem persönlichen Einsatz an dem vorliegenden Projekt. Beide sind maßgeblich an den Ergebnissen der RNA-Interferenz Studien beteiligt und Garantinnen einer professionellen wie freundschaftlichen Teamarbeit.

Dr. Thomas Sommer und den Mitgliedern seiner Arbeitsgruppe am Max-Delbrück-Centrum danke ich für die Integration meiner Nachwuchsgruppe, die vielen wertvollen wissenschaftlichen Diskussionen, die Hilfen bei technischen Problemen und das überaus nette Arbeitsklima. Danken möchte ich meinen Eltern insbesondere dafür, dass Sie mir ein Studium ermöglichten, bei dem ich mich ohne Zwänge frei entfalten konnte.

II. Der ausführlichen Zusammenfassung zugrundeliegende Publikationen

- V1 Köhler, M., Ansieau, S., Prehn, S., Leutz, A., Haller, H., Hartmann, E.: Cloning of two novel importin- α subunits and analysis of the expression pattern of the importin- α protein family. *FEBS Letters* 417: 104 - 108, 1997
- V2 Köhler, M., Speck, C., Christiansen, M., Bischoff, F.R., Prehn, S., Haller, H., Görlich, D., Hartmann, E.: Evidence for distinct substrate specificities of importin α -family members in nuclear protein import. *Molecular and Cellular Biology* 19: 7782 - 7791, 1999
- V3 Köhler, M., Haller, H., Hartmann, E.: Nuclear protein transport pathways. *Experimental Nephrology* 7: 290 - 294, 1999
- V4 Welch, K., Franke, J., Köhler, M., Macara, I.A.: RanBP3 contains an unusual nuclear localization signal that is imported preferentially by importin α 3. *Molecular and Cellular Biology* 19: 8400 - 8411, 1999
- V5 Franke, J., Reimann, B., Hartmann, E., Köhler, M., and Wiedmann, B.: Evidence for a nuclear passage of nascent polypeptide-associated complex subunits in yeast. *Journal of Cell Science* 114: 2641 - 2648, 2001
- V6 Köhler, M., Buchwalow, I.B., Alexander, G., Christiansen, M., Shagdarsuren, E., Samoilova, V., Hartmann, E., Meerval, E.M.A., and Haller, H.: Increased Importin α Protein Expression in Diabetic Nephropathy. *Kidney International* 60: 2263 - 2273, 2001
- V7 Köhler, M., Görlich, D., Hartmann, E., and Franke, J.: Adenoviral E1A protein nuclear import is preferentially mediated by importin α 3 in vitro. *Virology* 289: 186 - 191, 2001
- V8 Köhler, M., Fiebeler, A., Hartwig, M., Thiel, S., Prehn, S., Kettritz, R., Luft, F.C., and Hartmann, E.: Differential expression of classical nuclear transport factors during cellular proliferation and differentiation. *Cellular Physiology and Biochemistry* 12: 335 - 344, 2002

- V9 Quensel, C., Friedrich, B., Sommer, T., Hartmann, E., and Köhler, M.: Distinct α importins are essential for proliferation of cultured human cells. eingereicht

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG

gemäß Habilitationsordnung der Medizinischen Fakultät Charité

Hiermit erkläre ich, Dr. Matthias Köhler, daß

- keine staatsanwaltschaftlichen Ermittlungsverfahren gegen mich anhängig sind,
- weder früher noch gleichzeitig ein Habilitationsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde bzw. welchen Ausgang ein durchgeführtes Habilitationsverfahren hatte;
- die vorgelegte Habilitationsschrift ohne fremde Hilfe verfaßt, die beschriebenen Ergebnisse selbst gewonnen wurden, sowie die verwendeten Hilfsmittel, die Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlerinnen oder Wissenschaftlern und technischen Hilfskräften und die Literatur vollständig angegeben sind,
- mir die geltende Habilitationsordnung bekannt ist.

....12. Januar 2004.....
Datum

.....
Unterschrift