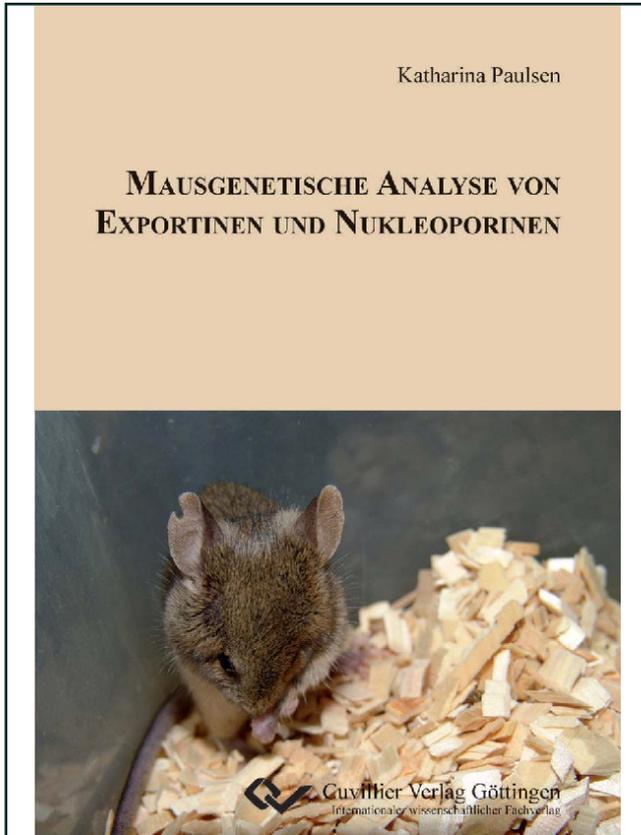




Katharina Paulsen (Autor)  
**Mausgenetische Analyse von Exportinen und Nukleoporinen**



<https://cuvillier.de/de/shop/publications/540>

Copyright:

Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen,  
Germany

Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: [info@cuvillier.de](mailto:info@cuvillier.de), Website: <https://cuvillier.de>

## 1. Einleitung

Eukaryotisches Leben unterscheidet sich vom prokaryotischem im Wesentlichen durch die Aufteilung zellulärer Prozesse in membranumschlossene Reaktionsräume (Kompartimente) (Chatton, 1925). Erst so ist die komplexe Organisation höherer Organismen möglich. Es findet zum Beispiel die hydrolytische Degradation zum Abbau bestimmter Komponenten in Lysosomen statt, ohne andere Bestandteile der Zelle zu schädigen. Die Energiegewinnung durch  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren ist in Mitochondrien lokalisiert und würde sonst die im Zytoplasma stattfindende Lipogenese beeinträchtigen. Auch die Lagerung und Reiz-bedingte Freisetzung von Signalmolekülen, wie  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen im sarkoplasmatischen Retikulum oder Neurotransmittern in neuronalen Vesikeln wird auf diesem Wege möglich (Löffler, 2002; Klinke, 2005; Alberts, 2008).

Der Zellkern ist das größte Kompartiment eukaryotischer Zellen. Er ist umgeben von der Kernmembran, die aus einer inneren, dem Nukleoplasma zugewandten und einer äußeren, mit dem endoplasmatischen Retikulum (ER) verschmelzenden Membran besteht (WATSON, 1955). Im Zellkern finden die Lagerung von DNA (Mirsky und Pollister, 1946) sowie die von der Translation im Zytoplasma (Munro 1964) räumlich getrennte Transkription statt (Clifford und Rees, 1967; Cummins und Rusch, 1967). Eukaryotische Gene enthalten Introns, die nicht für eine Aminosäure-Sequenz kodieren und nach der Transkription durch Spleißen aus prä-mRNAs entfernt werden müssen (Sharp, 1985). Erst solche intronfreien, reifen mRNAs gelangen nach Qualitätskontrolle ins Zytoplasma. Das Ausschließen von Translationsfaktoren aus dem Kern (Bohnsack *et al.*, 2002) sowie unreifer mRNA aus dem Zytoplasma ermöglicht die effektive Produktion korrekter Proteine und verhindert die Synthese verkürzter oder toxischer Produkte. Gleichzeitig erfordert dies aber auch Transport zwischen Zytoplasma und Zellkern. So müssen ribosomale Proteine (De Robertis *et al.*, 1978) und nukleäre Strukturproteine, wie Histone (Einck und Bustin, 1984) oder Lamine (Hennekes *et al.*, 1993; Leukel und Jost, 1995), in den Zellkern gelangen, während reife mRNA (Green, 1989) und in Nukleoli assemblierte Ribosomen-Untereinheiten (Lonn und Edstrom, 1977) aus diesem hinaus exportiert werden müssen. Auch zusammen mit einer über den Transport regulierbaren Aktivität von

Transkriptionsfaktoren (Kaffman und O'Shea, 1999) ist so in Eukaryoten im Vergleich zu Prokaryoten eine weit komplexere, signalregulierte Genexpression möglich. Möglicherweise waren deswegen nur eukaryotische Lebewesen in der Lage, sich zu mehrzelligen, komplexen Organismen zu entwickeln.

## 1.1 Nukleärer Transport

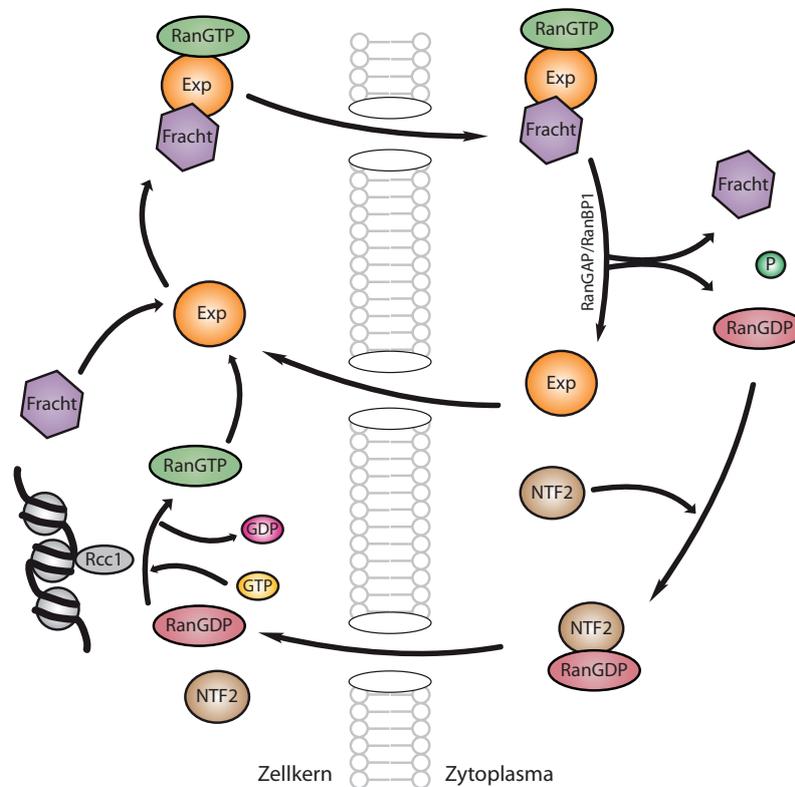
Den Austausch zwischen Zyto- und Nukleoplasma vermitteln Kernporenkomplexe (Feldherr, 1968), die in die Kernmembran integriert sind (Watson, 1955, 1959; Merriam, 1961). Diese Komplexe bestehen aus etwa 30 verschiedenen Proteinen (Davis und Blobel, 1986; Rout und Blobel, 1993), den sogenannten Nukleoporinen, und sind verantwortlich für die semipermeable Natur der Kernmembran (Harding und Feldherr, 1959). So ist sie durchlässig für anorganische Moleküle und Proteine kleiner als 40 kDa, bildet jedoch eine Barriere für „normale“ Makromoleküle (Mohr *et al.*, 2009). Auf diesem Wege wird die Durchmischung der zytoplasmatischen und nukleären Komponenten verhindert und so die räumliche Trennung von Transkription und Translation möglich. Gleichzeitig muss jedoch der kontrollierte Transport vieler Makromoleküle, wie der nukleäre Import ribosomaler Proteine oder der Export assemblierter Ribosomen-Untereinheiten, erlaubt sein. Proteine mit einer nukleären oder zytoplasmatischen Destination verfügen dafür über entsprechende Transportsignale (Dingwall *et al.*, 1982; Kalderon *et al.*, 1984b; Goldfarb *et al.*, 1986; Fischer *et al.*, 1995; Wen *et al.*, 1995b), die von nukleären Transportrezeptoren erkannt werden können. Diese Rezeptoren binden ihre Fracht und vermitteln den Transport zum jeweiligen Zielort über die Interaktion mit Nukleoporinen (Adam *et al.*, 1990; Adam und Gerace, 1991; Mattaj und Englmeier, 1998; Allen *et al.*, 2002). Im Innern der Pore lokalisierte Nukleoporine besitzen sogenannte *FG-Repeats* (Wiederholung Phenylalanin-Glycin-reicher Sequenzen) (Wente *et al.*, 1992; Radu *et al.*, 1995; Hu *et al.*, 1996). Diese bilden über hauptsächlich hydrophobe Wechselwirkungen ein gelartiges Netzwerk, das die selektive Permeabilitätsbarriere der Kernpore darstellt (Frey *et al.*, 2006). Mit diesen *FG-Repeats* können nukleäre Transportrezeptoren interagieren und den Transport per erleichterter Diffusion samt gebundener Fracht vermitteln (Frey und Görlich, 2007) ohne die Pore durchlässig für inerte Moleküle zu machen (Frey und Görlich, 2009). So können bis zu 3 MDa große Komplexe diese Barriere durchqueren (Lehmann *et al.*, 2002).

Transportrezeptoren werden entsprechend ihrer Funktion in zwei Gruppen eingeteilt: Importrezeptoren (Importine, Imp) vermitteln den Import in den Zellkern (Görlich *et al.*, 1994), während Exportrezeptoren (Exportine, Exp) ihre Fracht aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportieren (Stade *et al.*, 1997). Importine erkennen ihre Substrate an einem nukleären Lokalisationssignal (NLS) (Kalderon *et al.*, 1984a), das in der Regel aus einer oder zwei kurzen Sequenzen positiv geladener Aminosäuren, wie Arginin oder Lysin, besteht, wie zum Beispiel das NLS des großen T-Antigens von SV40 (Kalderon *et al.*, 1984b) oder das zweiteilige NLS von Nukleoplasmin (Dingwall *et al.*, 1982). Das klassische nukleäre Exportsignal (NES), das vom Exportin CRM1 erkannt wird, ist eine 25 Aminosäuren lange Sequenz mit vier bis fünf Leucinen (Güttler *et al.*, 2010) und findet sich zum Beispiel im Proteinkinase A Inhibitor PKI und auch im viralen HIV-REV-Protein (Fischer *et al.*, 1995; Wen *et al.*, 1995b; Fritz und Green, 1996; Kutay und Guttinger, 2005). Auch das Vorkommen komplexer Exportsignale ist beschrieben, wie eine entsprechende Domäne des Importadapters für spleißosomale Ribonukleotidproteine Snurportin I, die von CRM1 erkannt wird (Paraskeva *et al.*, 1999; Monecke *et al.*, 2009).

Energie für die rezeptorvermittelte Diffusion durch die Permeabilitätsbarriere liefert der RanGTP-Gradient zwischen Zytoplasma und Zellkern (Görlich *et al.*, 1996, 1997). Der im Kern an den Histonen H2A und H2B gebundene Nukleotid-Austauschfaktor Rcc1 katalysiert den Austausch von GDP zu GTP an Ran und hält so eine im Gegensatz zum Zytoplasma hohe nukleäre RanGTP-Konzentration aufrecht (Bischoff und Ponstingl, 1991; Nemergut *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2003; Makde *et al.*, 2010). Importine binden ihre Fracht im Zytoplasma und setzen sie nach Passage der Pore im Kern durch Assoziation mit RanGTP frei (Rexach und Blobel, 1995; Görlich *et al.*, 1996). Exportine dagegen binden ihre Substrate im Zellkern im Komplex mit RanGTP und entlassen sie im Zytoplasma (Fornerod *et al.*, 1997; Kutay *et al.*, 1997). Für die Dissoziation des Exportkomplexes ist die Hydrolyse von Ran-gebundenem GTP zu GDP durch die zytosolischen Proteine RanGAP und RanBP1 nötig (Bischoff *et al.*, 1995; Bischoff und Görlich, 1997; Lounsbury und Macara, 1997; Kehlenbach *et al.*, 1999; Koyama und Matsuura, 2010).

Nach erfolgreichem Transport passieren Exportine die Pore ohne zusätzliche Faktoren zurück in den Zellkern, während Importine im Komplex mit RanGTP wieder ins Zytoplasma gelangen (Görlich *et al.*, 1997). Den Rücktransport von RanGDP wiederum bewerkstelligt NTF2 (Wong *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1998). Durch den

Austausch von Ran-gebundenem GDP zu GTP durch Rcc1 ist dieser Transport unidirektional (Abbildung 1).



**Abbildung 1: Nukleärer Export.**

Exportine (orange, Exp) transportieren ihre Fracht (lila) im Komplex mit RanGTP (grün) aus dem Zellkern durch in die Kernmembran integrierte Kernporenkomplexe ins Zytoplasma, wo durch RanGAP und RanBP1 die Hydrolyse von Ran-gebundenem GTP zu GDP (rot) und Phosphat (grün, P) sowie die Freisetzung der Fracht erfolgt. Exportine können ohne zusätzliche Faktoren durch die Pore wieder in den Zellkern gelangen, während RanGDP von NTF2 (braun) zurück transportiert wird. Der Austausch von GDP (pink) zu GTP (gelb) an Ran erfolgt durch den an Histonen gebundenen Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor Rcc1 (grau), wodurch dieser Transport unidirektional ist. Rcc1 hält ebenfalls eine im Vergleich zum Zytoplasma hohe Konzentration von RanGTP im Zellkern aufrecht.