

### 3. Diskussion

#### 3.1. Das Kernlokalisierungssignal der PKC $\alpha$

Ein Kernlokalisierungssignal (NLS) sollte an Importfaktoren binden, die den Transport des Proteins in den Zellkern vermitteln (s. Kapitel 1.2.3). Die durchgeführten Untersuchungen zur Eingrenzung eines solchen Kernlokalisierungssignals der PKC $\alpha$  waren eine direkte Weiterführung der in unserem Labor von Stefan Wagner durchgeführten Arbeiten mit GFP- $\Delta$ PKC-Fusionsproteinen (Wagner 1999; Wagner et al. 2000). Die Fusion mit GFP erfüllte in den Experimenten neben der Möglichkeit die subzelluläre Lokalisation der Proteine über Fluoreszenz festzustellen auch den Zweck, dem Fusionsprotein eine Größe zu verleihen, die eine passive Diffusion durch den Kernporenkomplex ausschließt (>45 kDa). Die Ergebnisse legten die Vermutung nahe, daß sich ein NLS der PKC $\alpha$  innerhalb der Aminosäuresequenz 1-187 befindet, die die Pseudosubstratregion und die phorbolsterbindende C1-Domäne beinhaltet, denn sowohl GFP- $\Delta$ PKC $\alpha$ (1-252), als auch GFP- $\Delta$ PKC $\alpha$ (1-187) waren ohne Zugabe von PMA im Zellkern lokalisiert. Die anderen untersuchten PKC $\alpha$ -Fragmente zeigten als GFP-Fusionsproteine in der Regel eine gleichmäßige, cytoplasmatische Verteilung.

Die vorliegende Arbeit beschreibt den auf diesen Erkenntnissen basierenden Versuch, das Kernlokalisierungssignal der PKC $\alpha$  zunächst auf die beiden Zinkfinger motive der C1-Domäne (C1a und C1b) einzugrenzen. Dazu wurden Vektoren hergestellt, die Fusionsproteine codierten, bei denen das jeweilige PKC $\alpha$ -Fragment C-terminal oder N-terminal mit GFP und einem weiteren Protein fusioniert waren. Die Anwesenheit des zusätzlichen Proteins, bei dem es sich entweder um  $\beta$ -Galaktosidase oder um ein zusätzliches GFP handelte, war erforderlich, da die Fusion mit einem GFP allein nicht mehr ausreichte, um den Fusionsproteinen eine Gesamtgröße von über 45 kDa zu verleihen.

Überraschenderweise wurden die Experimente durch die ebenso starke wie unerwartete Neigung der Fusionsproteine zu aggregieren erheblich erschwert und schließlich auch konkrete Schlußfolgerungen aus diesen Untersuchungen verhindert.

Außerdem weisen die transfizierten Zellen starke morphologische Schäden auf, was auf eine hohe Cytotoxizität der Fusionsproteine hinweist. Die Größe der einzelnen Aggregate variiert von Zelle zu Zelle ebenso wie ihre subzelluläre Verteilung.

Die anfängliche Hypothese, dass die  $\beta$ -Galaktosidase einen maßgeblichen Anteil an der Aggregatbildung haben könnte, bewahrheitete sich nicht. Grundlage dieser Vermutung war die Existenz der etwa 50 Aminosäuren umfassenden  $\alpha$ -Region, mit deren Hilfe das Enzym tetramerisieren kann (Moosmann & Rusconi 1996). Diese Tetramerisierung dient normaler-

weise der Aktivierung der  $\beta$ -Galaktosidase. In den 3T3-Zellen aber könnte sie möglicherweise zu einer unspezifischen Aggregation führen, da  $\beta$ -Galaktosidase ein bakterielles Enzym ist und in einer eukaryontischen Zelle möglicherweise „fehlreguliert“ wird. Allerdings zeigten die Kontrollzellen, die lediglich mit GFP fusionierte  $\beta$ -Galaktosidase exprimierten, keinerlei Aggregate, und auch der Ersatz der  $\beta$ -Galaktosidase durch ein weiteres GFP führte lediglich zu einer geringeren Aggregatbildung, so daß höchstwahrscheinlich der PKC $\alpha$ -Bestandteil der Fusionsproteine für die Aggregatbildung verantwortlich ist (s. auch S. 47).

Aus der gelegentlich und nur in Ausnahmefällen beobachteten verstärkten Kerntranslokation mancher Konstrukte sollten keine Schlußfolgerungen bezüglich des Kernlokalisationssignals der PKC $\alpha$  gezogen werden, da die beschriebenen Ergebnisse den Verdacht nahelegen, daß es sich in diesen Fällen lediglich um eine passive Diffusion der Fusionsproteine in den Zellkern handelt.

Zum einen scheint die Wahrscheinlichkeit einer Kernlokalisierung umgekehrt proportional zur Gesamtgröße des jeweiligen Fusionsproteins zu sein. Während die mit GFP fusionierten „MonoGFP“-Konstrukte ausnahmslos im Zellkern lokalisiert sind, reicht bereits die Fusion mit einem weiteren GFP bei den „DiGFP“-Konstrukten aus, um 93-187NDi und 93-187CDi nur noch schwach in den Kern translozieren zu lassen. Wird eines der beiden GFP durch  $\beta$ -Galaktosidase ersetzt, so ist bis auf seltene Ausnahmen bei 93-187N und 93-187C überhaupt keine Lokalisation im Zellkern mehr festzustellen. Aus dieser seltenen Beobachtung zu schließen, daß das NLS der PKC $\alpha$  im Bereich der C1a-Region liegt, ist aufgrund der vorliegenden Ergebnisse schon allein aufgrund ihrer Rarität und schlechten Reproduzierbarkeit nicht zulässig. Außerdem zeigen weder 1-187N, noch 1-187C eine stimulationsabhängige Translokation in den Zellkern. Zweitens zeigen die Proteine aufgrund ihrer unerwartet hohen Neigung zur Aggregation ein ohnehin ungewöhnliches Verhalten, so daß eine Schlußfolgerung, die auf der subzellulären Verteilung nichtaggregierter Restproteine basiert, notgedrungen fehlerträchtig sein muß.

Zum anderen zeigt auch das GFP-GFP-Fusionsprotein, ähnlich wie das GFP selbst, eine verstärkte Lokalisation im Zellkern, die sich von der der MonoGFP- und DiGFP-Fusionsproteine nicht unterscheidet. Es liegt daher nahe, daß auch die mit PKC $\alpha$ -Fragmenten fusionierten GFP-Dimere durch den Kernporenkomplex in den Zellkern diffundieren und die PKC $\alpha$ -Bestandteile des jeweiligen Fusionsproteins mutmaßlich einfach nicht groß genug sind, um das GFP-Dimer daran zu hindern. Nach diesem Modell würde also das GFP selbst für die mit ihm fusionierten Proteinfragmente als NLS fungieren. Das Kriterium der Ausschlußgröße könnte seine Gültigkeit behalten, indem das Fusionsprotein bei diesem Diffusi-

onsvorgang in seinem Verhalten möglicherweise nicht einem einzelnen Protein entspricht, dessen Gesamtgröße gleich der Summe der Größen seiner Komponenten wäre, sondern jede Komponente wie die Perlen einer Kette für sich alleine durch den Kernporenkomplex diffundiert.

Aufgrund dieser Hinweise erscheinen die in den Arbeiten von Stefan Wagner gewonnenen Erkenntnisse in einem neuen Licht, da er den aktiven Transport seiner Fusionsproteine via NLS mit der erwähnten Ausschlußgröße von 45 kDa begründete und außerdem feststellte, daß der Grad der Kernlokalisierung der Konstrukte davon abhängig war, ob die PKC $\alpha$ -Fragmente C- oder N-terminal mit GFP fusioniert vorlagen. Zum einen handelt es sich bei seinen GFP-Fusionsproteinen der PKC-Fragmente 1-187 und 1-252 um die kürzesten der von ihm hergestellten Fusionsproteine. Zum anderen scheint das Argument, daß der Grad der Kernlokalisierung davon abhängig ist, ob das PKC-Fragment C- oder N-terminal mit GFP fusioniert vorliegt, unter Berücksichtigung der hier gewonnenen Erkenntnisse gleichfalls nicht überzeugend, da der Unterschied lediglich in einer gleichmäßigen Verteilung des N-terminalen Fusionsproteins über die gesamte Zelle im Vergleich zu einer verstärkten Kernlokalisierung des C-terminalen Fusionsproteins besteht, wie sie auch für GFP allein beobachtet wird. Da folglich beide Fusionsproteine in den Zellkern gelangen, kann aufgrund solcher Intensitätsdifferenzen keine Aussage bezüglich des Transportmechanismus gemacht werden, obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, daß die N-terminale Fusion mit GFP beispielsweise die Bindung eines Importfaktors beeinträchtigt. Aufgrund der in dieser Arbeit dargestellten allgemeineren Beobachtungen wäre es jedoch naheliegend, daß die betreffenden Fusionsproteine durch freie Diffusion durch die seitlichen Poren in den Kern gelangen und die N- bzw. C-terminale GFP-Fusion lediglich deren Verankerung im Zellkern beeinflusst.

Um diese Möglichkeiten auszuschließen, sollte eine weitere Kontrolle zeigen, daß ein anderes 187 Aminosäuren langes und mit GFP fusioniertes PKC-Fragment nicht im Zellkern lokalisiert ist.

Die bislang gewonnenen Erkenntnisse schließen die Präsenz eines NLS in der Region 1-187 der PKC $\alpha$  keineswegs aus, allerdings konnte sie auch nicht bestätigt werden, und die Ergebnisse lassen weiterhin Raum für Hypothesen, die ein NLS außerhalb dieser Region vermuten. Künftige Arbeiten sollten zunächst darauf abzielen, die Präsenz des NLS in der Region 1-187 abzusichern, bevor der erneute Versuch seiner Eingrenzung unternommen wird.

Interessanterweise scheint die beschriebene Neigung zur Bildung von Aggregaten mit der Gesamtgröße der Fusionsproteine zuzunehmen. So ist bei den MonoGFP-Konstrukten so gut wie keine Aggregatbildung vorhanden und die DiGFP-Konstrukte zeigen fast ausnahms-

los eine geringere Neigung zur Aggregation als ihre mit  $\beta$ -Galaktosidase fusionierten Analoga. Insofern scheint das Problem der Aggregation in den betreffenden PKC $\alpha$ -Fragmenten zu liegen, die Größe des Restproteins scheint hingegen für die Aggregatbildung eine verstärkende Wirkung zu haben.

Einen zusätzlichen und von dieser Arbeit unabhängigen Hinweis, daß das Problem der Aggregatbildung in dem PKC $\alpha$ -Bestandteil der Fusionsproteine selbst lag, lieferten die Arbeiten von Perander und Mitarbeitern (2001). Sie entdeckten mit analogen GFP-Fusionsproteinen ein NLS in der Zinkfingerregion (Aminosäuren 141-194) der atypischen PKC $\lambda$ . Bei dem Versuch, zu prüfen, ob ein solches NLS auch für die Zinkfinger der klassischen Isoformen der PKC konserviert ist, transfizierten sie HeLa-Zellen mit Vektoren, die Fusionsproteine codierten, die den hier beschriebenen zwar nicht identisch, aber sehr ähnlich waren: das eine Fusionsprotein enthielt die erste der beiden Zinkfingerregionen, das zweite die gesamte C1-Region der PKC $\alpha$  (GFP-PKC $\alpha$ (37-88) bzw. GFP-PKC $\alpha$ (37-155)). Die Beobachtung, daß diese Proteine „nicht in den Zellkernen sondern eher in punktförmigen Strukturen im Cytoplasma akkumulieren“ stimmt exakt mit den hier beschriebenen Beobachtungen überein. Offenbar sind GFP-Fusionsproteine der Zinkfingerregionen der PKC $\alpha$  aufgrund ihrer Neigung zur Aggregatbildung ungeeignet für die Feststellung eines potentiellen NLS. Daß die Aggregatbildung bei Perander und Mitarbeitern im Gegensatz zu den in unserem Labor gewonnenen Erkenntnissen bereits bei der Fusion des  $\Delta$ PKC $\alpha$ -Fragments mit einem GFP auftrat, ist wahrscheinlich auf die Verwendung unterschiedlicher Zelllinien zurückzuführen. Eine weitere Möglichkeit wäre, daß die Abwesenheit der Pseudosubstratregion die Aggregationsneigung der C1-Regionen zusätzlich verstärkt.

Im übrigen stellt die Bildung von Aggregaten nicht die einzige Schwierigkeit bei der Untersuchung der subzellulären Verteilung von GFP-Fusionsproteinen dar. Schon Stefan Wagner hatte gezeigt, daß GFP-PKC $\alpha$  in NIH 3T3-Fibroblasten nach PMA-Stimulation nicht in den Zellkern sondern an die Plasmamembran transloziert. Dieses Verhalten steht im Widerspruch zu dem der endogenen PKC $\alpha$ , die sowohl von ihm, als auch von anderen Gruppen nach PMA-Behandlung in immunocytochemischen Untersuchungen im Zellkern nachgewiesen werden konnte (Wagner 1999; Martelli et al. 1999). Diese offensichtliche Änderung der Eigenschaften des Enzyms führte Stefan Wagner allerdings nicht auf die Fusion mit GFP sondern auf die Überexpression zurück (Wagner, 1999).

In jüngerer Zeit sind mehrere Arbeiten publiziert worden, die die Erfahrungen unseres Labors teilen und GFP-PKC $\alpha$  ebenfalls nicht im Zellkern und nach deren Aktivierung durch PMA lediglich eine Translokation zur Plasmamembran beobachten (Vallentin et al., 2000;

Nacro et al., 2001; Mandil et al., 2001; Garcia-Bermejo et al. 2002). Viele dieser Arbeiten beinhalten detaillierte kinetische Analysen, die belegen, daß die rasche Translokation von GFP-PKC $\alpha$  an die Plasmamembran mit Konzentration und Einwirkungsdauer von PMA zunimmt (Mandil et al. 2001; Garcia-Bermejo et al. 2002). Im Gegensatz zu GFP-PKC $\delta$  durchläuft die Lokalisation an der Plasmamembran jedoch kein Maximum und auch die im weiteren zeitlichen Verlauf der PMA-Einwirkung stattfindende Lokalisation an der Kernmembran (Wang et al. 1999; Garcia-Bermejo et al. 2002) wurde bei GFP-PKC $\alpha$  nicht beobachtet.

Aus diesen Ergebnissen darf jedoch nicht geschlossen werden, daß die PKC $\alpha$  nicht in den Zellkern translozieren kann, da sie dort sowohl mit immunocytochemischen Methoden, als auch mit denen der subzellulären Fraktionierung eindeutig nachzuweisen ist (Buchner 1995, Buchner 2000).

### 3.2. Physiologische Bedeutung der PSF-Bindung

In der vorliegenden Arbeit wurde in einem „Pull down assay“ mit dem PTB-assoziierten Spleißfaktor (PSF) ein nucleärer Bindungspartner für Proteinkinase C identifiziert. Ferner konnte gezeigt werden, daß die PSF-Bindung vom Aktivierungszustand der PKC $\alpha$  abhängig ist, da die Gegenwart verschiedener Aktivatoren den Anteil copräzipitierten PSFs erheblich steigerte. Daß neben den Aktivatoren Ca<sup>2+</sup> und PMA jedoch auch die Zugabe des Inhibitors Staurosporin die PSF-Bindung verstärkt, scheint zunächst ein überraschendes Ergebnis zu sein. Es fügt sich allerdings sofort zwanglos in das Bild ein, wenn man bedenkt, daß die inhibitorische Wirkung auf der irreversiblen Bindung des Staurosporins im katalytischen Zentrum der PKC $\alpha$  beruht. Dadurch wird die Bindung der Pseudosubstratregion im aktiven Zentrum und damit die Autoinhibierung der PKC $\alpha$  verhindert, was letztlich eine „aktive“ Konformation der PKC $\alpha$  stabilisiert (Buchner et al. 1999).

Die Entdeckung, daß PKC $\alpha$  aktivierungsabhängig an einen essentiellen Spleißfaktor bindet, legt den Verdacht nahe, daß nucleäre PKC $\alpha$  direkten Einfluß auf den Vorgang des Spleißens nimmt. Allerdings konnten bereits 1997 in unserem Labor durchgeführte Arbeiten von Uwe Rosenberger diese Hypothese nicht bestätigen. Natürlich kann deshalb eine Funktion der PKC $\alpha$  bei der Regulation des Spleißens nach wie vor nicht ausgeschlossen werden, letztlich ist sie aufgrund der verhältnismäßig hohen Zahl der nucleären Substrate, von denen einige sogar in den Spliceosomen nachgewiesen wurden (s. Kapitel 3.3), auch nicht so unwahrscheinlich. Aber obwohl weitere gezielte Experimente nötig sind, um eine regulatorische Wirkung der PSF-Bindung auf den Prozess des Spleißens zu untersuchen, würde die Abwesenheit eines regulatorischen Effekts nicht überraschen.

PSF stellt mit einem Anteil von etwa 10% (persönliche, nicht publizierte Beobachtung) eine der Hauptproteinkomponenten im Zellkern dar. Allein dieser hohe PSF-Anteil im Zellkern macht es unwahrscheinlich, daß die Funktionen, die PSF während des Spleißprozesses erfüllen mag, seine einzigen Aufgaben in diesem Zellkompartiment sind. Da PKC $\alpha$  im Zellkern einer Zelle unter physiologischen Bedingungen in erheblich geringeren Mengen vorliegt als PSF, liegt sicherlich nur ein äußerst geringer Anteil des nucleären PSF PKC-gebunden vor, und das muß nicht notwendigerweise der Anteil sein, der an die pyrimidinreiche Region der pre-mRNA bindet. Ein PSF-vermittelter Einfluß der PKC $\alpha$  auf das Spleißen wäre daher wahrscheinlicher, wenn PSF ein Substrat der PKC $\alpha$  wäre. Aufgrund der Erkenntnis, daß PSF *in vitro* lediglich äußerst schwach phosphoryliert wird, muß man allerdings davon ausgehen, daß es unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich kein Substrat der PKC $\alpha$  ist. In den

Autoradiographien der BAC-SDS-Gele scheint PSF zwar immer noch schwach, jedoch deutlich besser phosphoryliert zu werden, was eventuell auf die höhere Aktivität der kommerziell erworbenen PKC $\alpha$  oder auf den fehlenden Einfluß der GST-Funktion zurückzuführen ist.

Das Ergebnis, daß PSF je nach experimentellem Ansatz lediglich als schwaches bis mäßiges Substrat bezeichnet werden kann, mag auf den ersten Blick überraschen, da PSF immerhin drei mögliche Phosphorylierungsstellen aufweist (KTYT(286)QR; RGRS(402)T(403)GK). Allerdings ist die bloße Anwesenheit einer Konsensussequenz zur Phosphorylierung nicht zwingend für eine gute Phosphorylierung, da die Phosphorylierungsstelle beispielsweise aus sterischen Gründen für die betreffende Kinase unzugänglich sein kann. Kürzlich konnte in unserem Labor jedoch nachgewiesen werden, daß PSF an Tyrosinresten phosphoryliert wird (Otto et al. 2001). Ob die Tyrosin-Phosphorylierung die Bindung an aktivierte PKC $\alpha$  beeinflussen kann, bleibt jedoch noch zu untersuchen.

Über PSF ist bislang relativ wenig bekannt, und bislang sind noch keine Untersuchungen zu möglichen Funktionen des Proteins außerhalb des Spleißkomplexes beschrieben worden. Insofern sind auch Mutmaßungen über die physiologische Bedeutung der Bindung zwischen aktivierter PKC und PSF höchst spekulativ.

Die Beobachtung, daß PSF *in vitro* schlecht und daher *in vivo* möglicherweise überhaupt nicht durch PKC phosphoryliert wird, könnte ein Hinweis darauf sein, daß es sich mit PSF ähnlich wie mit RACK1 verhält, einem Protein, das gleichfalls an aktivierte PKC bindet, das gleichfalls ein schlechtes Substrat ist und das wahrscheinlich eine Rolle in der PKC-vermittelten Signaltransduktion spielt (Ron et al. 1994). Möglicherweise stellt PSF ein kompartimentspezifisches RACK dar, und es wäre interessant, zu untersuchen, inwiefern es isoformselektiv für konventionelle PKC oder sogar isoformspezifisch für PKC $\alpha$  ist.

Eine weitere hypothetische Funktion der PKC $\alpha$ /PSF-Bindung wäre, die PKC $\alpha$  im Zellkern zu verankern. Das wäre insofern interessant, als die subzelluläre Verteilung der PKC abhängig von Isoform und Zelltyp variiert (Buchner 1995; Martelli et al. 1999). Ein Zusammenwirken von dem Transport in das Zielkompartiment und dortiger Verankerung durch spezifische Ankerproteine wäre eine mögliche Erklärung für die Spezifität der PKC.

Außerdem wäre es denkbar, daß PSF für aktivierte PKC $\alpha$  in ähnlicher Weise wie AKAP79 als Gerüstprotein fungiert. AKAP79 bindet Proteinkinase A, Proteinkinase C und Phosphatase 2B (Calcineurin) an jeweils unterschiedlichen spezifischen Bindungsstellen und kann daher mit allen drei Enzymen einen definierten Komplex bilden (Klauck et al. 1996). PSF kann, ähnlich dem AKAP79, außer der PKC $\alpha$  zumindest noch Proteinphosphatase 1 (Hirano et al. 1996) und somit wenigstens zwei verschiedene Enzyme binden. Allerdings ist nicht



auszuschließen, daß beide Enzyme kompetitiv um dieselbe Bindungsstelle konkurrieren, oder ihre Bindungsstellen im PSF zumindest überlappen. Es werden also auch hier weitere Untersuchungen notwendig sein, um zu entscheiden, ob die Bindung von PKC $\alpha$  und Proteinphosphatase wirklich an zwei unterschiedlichen Bindungsstellen des PSF erfolgt. In neuerer Zeit konnte in „Yeast two-hybrid“-Experimenten gezeigt werden, daß PSF über das RRM2 Motiv (Aminosäuren 371-444) mit Zinkfingermotiven anderer Proteine interagieren kann (Dye & Patton 2001), so daß die C1-Region der PKC $\alpha$  ein vielversprechender Kandidat als potentielle PSF-Bindungsregion wäre. Die Bindungsstelle für Phosphatase 1 liegt allerdings beim PSF in dem Bereich der Aminosäuren 349-430 (Hirano et al. 1996), wodurch also für das PSF die Funktion eines Gerüstproteins, zumindest für PKC $\alpha$  und Proteinphosphatase 1, nicht sehr wahrscheinlich wäre, wenn sich eine Interaktion der C1-Region der PKC mit dem RRM2-Motiv des PSF bestätigen sollten.

Eine weitere Vertiefung der Experimente zur physiologischen Bedeutung der PKC/PSF-Interaktion wäre generell in jedem Fall von Bedeutung, selbst bei Zelltypen, bei denen PKC $\alpha$  nachweislich nicht im Zellkern auftreten sollte: Es existiert eine cytosolische Form des PSF, der lediglich die 38 C-terminalen Aminosäuren (incl. C-terminaler NLS-Sequenz) fehlen, deren Aminosäuren 1-662 aber identisch mit dem nucleären PSF sind. Bei dieser F-Isoform handelt es sich vermutlich um eine Spleißvariante, deren biologische Bedeutung allerdings immer noch unbekannt ist (Patton et al. 1993; Dye & Patton 2001). Das F-PSF wird von den Zelle nach heutigem Kenntnisstand zwar nur in geringen Mengen exprimiert, aber eine spezifische und aktivierungsabhängige Bindung von PKC $\alpha$  im Cytosol wäre in ihrer Bedeutung nicht zu unterschätzen.



### 3.3. Nucleäre Substrate der PKC $\alpha$

Die Phosphorylierung von Kernmembranen bzw. eines Triton X-100-Extraktes davon in Gegenwart von  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP und die anschließende Auftrennung ihrer Proteine mittels BAC-SDS-PAGE führte zur Identifikation zahlreicher Substrate. Manche dieser Substrate sind bereits literaturbekannt und dienen als Kontrolle und als Beleg für die Tauglichkeit dieser Methode.

Zu diesen bereits bekannten Substraten gehört beispielsweise LAP2 $\beta$ , auf das in Kapitel 1.2.1 bereits ausführlich eingegangen wurde. Es stellt gemeinsam mit den Laminen und Histonen das Hauptsubstrat der PKC $\alpha$  im Zellkern dar (s. Kapitel 1.4), und seine nativen Phosphorylierungsstellen für PKC $\alpha$  konnten kürzlich in unserem Labor bestimmt werden (Dreger et al. 1999). Die Phosphorylierung von LAP2 $\beta$  beeinflusst seine Bindung an Chromatin und Lamin B (Foisner & Gerace 1993).

Auch das Lamin B wurde in dieser Arbeit bereits ausführlich beschrieben (s. Kapitel 1.2.1 und Kapitel 1.4). Es ist ebenso wie LAP2 $\beta$  ein gutes *in vivo*- und *in vitro*-Substrat nucleärer PKC (Fields et al. 1988; Beckmann et al. 1992; Collas et al. 1997; Shimizu et al. 1998). Seine Phosphorylierung durch PKC führt zur Depolymerisation dieses Intermediärfilaments und ist wahrscheinlich ein wichtiger Schritt beim Zusammenbruch der Kernhülle während der Mitose (Fields et al. 1988; Beckmann et al. 1992).

Die bislang unbekanntes (vgl. aber S. 59) *in vitro*-Substrate der PKC $\alpha$ , die während dieser Arbeit identifiziert wurden, werden im folgenden in alphabetischer Reihenfolge aufgeführt und diskutiert. Alle aufgeführten Substrate enthalten PKC-Konsensus-Phosphorylierungsstellen ([ST]-x-[RK]). Die Gegenwart von PKC-Konsensus-Phosphorylierungsstellen ist für sich allein jedoch nicht ausreichend, um daraus ableiten zu können, daß ein Protein ein Substrat ist (s. Kapitel 3.2). Da es sich zudem bei den im folgenden beschriebenen Substraten ausnahmslos um *in vitro*-Substrate handelt, muß für jedes dieser Proteine individuell geprüft werden, ob es auch *in vivo* von PKC $\alpha$  phosphoryliert wird. Eine elegante Möglichkeit hierfür wäre beispielsweise, intakte Zellen mit  $\gamma^{32}\text{PO}_4$  zu behandeln und aus deren Homogenat die interessierenden Proteine anschließend mittels Immunpräzipitation zu fällen. Ein Vergleich der mittels MALDI-Massenspektrometrie durchgeführten Phosphopeptidanalyse mit der des *in vitro* phosphorylierten Proteins sollte dann Aufschluß darüber geben können, welche der im folgenden aufgeführten Proteine auch *in vivo*-Substrate der PKC sind und was ihre Phosphorylierungsstellen sind.

Als nächster Schritt wäre es naheliegend, zunächst über Immuncytochemie oder Elektronenmikroskopie die subzelluläre Verteilung der Proteine innerhalb der Zelle oder gegebener

nenfalls sogar deren exakte Lokalisation innerhalb des Zellkerns zu untersuchen. Das gilt insbesondere für die bislang weitestgehend oder sogar vollständig unbekannt Proteine.

Desweiteren wäre es gerade bei diesen Proteinen wahrscheinlich lohnend, zunächst nach deren biologischen Funktionen zu suchen, da deren Kenntnis eine fast zwingende Voraussetzung für eine sinnvolle Untersuchung der physiologischen Bedeutung ihrer Phosphorylierung sind. Dafür läßt sich allerdings kaum ein schematisches Vorgehen entwickeln. Erste funktionelle Hinweise könnten sich jedoch aus ihren Interaktionspartnern ergeben, die man beispielsweise über Co-Immunpräzipitationsexperimente identifizieren könnte. Das weitere Vorgehen würde von dem Protein und ersten funktionellen Anhaltspunkten abhängen, denkbar wäre unter anderem die Expression von mutierten Formen des Proteins oder dominant negativen Mutanten oder der Einsatz von antisense-Oligonucleotiden.

Bei allen Proteinen, die sich als *in vivo*-Substrate der PKC $\alpha$  erweisen, drängt sich als nächster Schritt natürlich die Frage nach der physiologischen Bedeutung der Phosphorylierung und deren experimentelle Beantwortung auf. Ähnlich wie bei der funktionellen Untersuchung der Proteine ist es auch hier unmöglich, ein allgemeingültiges Vorgehen zu entwickeln. Auch hier könnten zunächst Co-Immunpräzipitationsexperimente oder andere Bindungstests hilfreich sein, um zu sehen, ob die Phosphorylierung die Bindung an bekannte Interaktionspartner beeinflußt oder vielleicht sogar neue Interaktionen ermöglicht. Auch hier wäre es in weiterführenden Experimenten erfolgversprechend, Mutanten des jeweiligen Proteins zu exprimieren, besonders was die mutmaßlichen Phosphorylierungsstellen betrifft. So würde es sich beispielsweise anbieten, durch Aspartat ein phosphoryliertes Serin zu simulieren.

#### *Heterochromatin protein 2, binding Protein 3 (Genbank Q8VE06)*

Hierbei handelt es sich um ein 554 Aminosäuren langes Protein, das bislang lediglich als hypothetisches Protein bekannt war. Die auf genomischen Untersuchungen basierende Sequenz wurde erst im Dezember 2001 und damit erst in jüngster Vergangenheit in der EMBL/GenBank-Datenbank eingetragen.

Computerunterstützte Sequenzvergleiche zeigten, daß das Protein neben einem zweiteiligen NLS in der Nähe des N-Terminus (117-134) außerdem drei „Linker-Histon“-Regionen (159-234; 266-330; 338-413) im mittleren Abschnitt des Proteins aufweist. Diese Abschnitte weisen eine hohe Homologie zu dem „Linker-Histon“ H1 auf, so daß es sehr wahrscheinlich scheint, daß das Protein ähnlich wie das „Linker-Histon“ H1 durch die Bindung von Nucleosomen in der Lage ist, Chromatinstrukturen höherer Ordnung zu erzeugen.

Aufgrund der Präsenz der Histon-ähnlichen Regionen innerhalb des Proteins ist es nicht überraschend, daß dieses Protein ein gutes *in vitro*-Substrat der PKC $\alpha$  ist. Im Gegenteil, es war sogar zu erwarten, denn gerade für das eng verwandte Histon H1 konnte in *in vitro* – Experimenten schon vor über 20 Jahren gezeigt werden, daß es ein gutes PKC-Substrat ist (Patskan & Baxter 1985; Butler et al. 1986). Eine physiologische Funktion der Phosphorylierungen durch PKC ist bislang allerdings nicht bekannt, Effekte auf die Chromosomenkondensation oder andere Änderungen in der Chromatinstruktur, die möglicherweise auch zur Aktivierung oder Stilllegung von Genen führen könnten, scheinen aber wahrscheinlich.

### *Histon H2a1*

Dieses Histon ist 129 Aminosäuren lang und gehört mit den Histonen H2B, H3 und H4 zu den Kernhistonen. Jeweils zwei dieser Kernhistone bilden zusammen das oktamere Nucleosom, um das dann ca. 145 bp der DNA gewunden sind.

Ähnlich wie im Falle des Heterochromatin 2 ist auch für das Histon H2a seine Entdeckung als gutes *in vitro*-Substrat der PKC $\alpha$  kein wirklich überraschendes Ergebnis. Schon seit Mitte der 80er Jahre ist bekannt, daß neben dem bereits oben erwähnten Histon H1 auch die Kernhistone H2B und H4 zu den besten *in vitro*-Substraten der Proteinkinase C zählen (Patskan & Baxter 1985; Butler et al. 1986). Auch für deren Phosphorylierung durch PKC ist bislang keine biologische Funktion bekannt, aber auch hier scheinen Einflüsse auf Chromatinstruktur oder Chromosomenkondensation wahrscheinlich.

### *Heterogene nucleäre Ribonucleoproteine (hnRNP)*

In der vorliegenden Arbeit konnten hnRNP A1, hnRNP A2/B1, hnRNP A3, hnRNP L und hnRNP U als Substrate der PKC $\alpha$  identifiziert werden. Die gleichmäßig im Zellkern verteilten hnRNP-Proteine sind an der Prozessierung der pre-mRNA beteiligt und haben wahrscheinlich Einflüsse auf die Auswahl der Spleißstellen beim alternativen Spleißen und sind möglicherweise am Export der reifen mRNA aus dem Zellkern beteiligt. Sie zeichnen sich durch hohe Basizität aus und sind Bestandteile der Ribonucleosomen, hochmolekularen Komplexen aus hnRNA und mindestens 24 verschiedenen hnRNPs (Dreyfuss et al. 1993).

Das hnRNP A1 ist bereits als Substrat der PKC $\zeta$  bekannt (Municio et al. 1995). Von diesem 319 Aminosäuren umfassenden Protein existiert durch alternatives Spleißen noch eine zweite Isoform, der die Aminosäuren 251-302 fehlen. Interessanterweise sind hnRNP A1 und hnRNP A2/B1 nicht nur im Kern, sondern auch im Cytosol lokalisiert, so daß sie möglicher-

weise zu den Proteinen gehören, die als „shuttle“ fungieren und die poly-A-mRNA aus Kern ins Cytoplasma transportieren können (Pinol-Roma & Dreyfuss 1992).

Vor dem Transport der hnRNP/mRNA-Komplexe durch die Kernpore müssen allerdings die hnRNPs, die keine „shuttle“-Proteine sind, spezifisch aus den Komplexen entfernt werden. Besonders interessant ist in diesem Zusammenhang die Hypothese, daß an diesem Mechanismus auch DExH/D-RNA-Helikasen beteiligt sein könnten (Mili et al. 2001; Janakowsky et al. 2001), da solch eine Helikase in dieser Arbeit ebenfalls als Substrat der PKC $\alpha$  identifiziert werden konnte.

Die möglichen biologischen Funktionen der hnRNP-Phosphorylierungen durch PKC $\alpha$  sind vielfältig, da die Reifung der mRNA in allen Stadien regulierbar ist und durch die Modifikation der hnRNP beeinflusst werden könnte. Gerade in Hinblick darauf, daß auch eine RNA-Helikase unter den in dieser Arbeit identifizierten Substraten der PKC $\alpha$  ist, sollte zudem in weiteren Untersuchungen festgestellt werden, ob die Aktivität der PKC $\alpha$  möglicherweise Auswirkungen auf den mRNA-Export hat.

Sollte es sich erweisen, daß die in dieser Arbeit identifizierten hnRNPs auch *in vivo* Substrate der PKC sind, darf nicht außer acht gelassen werden, daß bei hnRNP A1 und hnRNP A2/B1 höchstwahrscheinlich auch die cytosolische PKC $\alpha$  einen Anteil an deren Phosphorylierung hat. Es wäre in diesem Zusammenhang und unabhängig von den beiden skizzierten Modellen interessant, zu untersuchen, ob die Phosphorylierung möglicherweise Einfluß auf das Verhältnis von cytosolischem und nucleärem hnRNP A1 bzw. hnRNP A2/B1 hat, wie es für die Phosphorylierung von hnRNP A1 durch PKC $\zeta$  bereits gezeigt wurde, die zu einem Anstieg von cytosolischem hnRNPA1 führte (Municio et al. 2000).

Municio und Mitarbeiter konnten ferner zeigen, daß die Phosphorylierung durch PKC $\zeta$  die Fähigkeit von hnRNP A1 RNA zu binden, dramatisch beeinträchtigte. Sollte sich erweisen, daß dies für hnRNP A1 und die anderen identifizierten hnRNP bei deren Phosphorylierung durch PKC $\alpha$  der Fall ist, so ist wahrscheinlich, daß das direkte Auswirkungen auf die Zusammensetzung der Ribonucleosomen haben, oder vielleicht sogar ein grundlegender Regulationsmechanismus sein könnte. Änderungen der Ribonucleosomenzusammensetzung könnten wiederum Einflüsse auf die Wahl alternativer Spleißstellen der mRNA haben.

*Ott Protein (Genbank Q62012)*

Über das Ott (Qvary testis transcribed) Protein ist bislang nur wenig bekannt, und die einzigen Erkenntnisse darüber basieren auf der Arbeit von Kerr und Mitarbeitern (1996). Demnach

liegt das Gen für das Ott-Protein der Maus auf dem X-Chromosom und ist Teil einer Multifamilie, die vollständig in dieser Region lokalisiert sein soll. Das Ott-Protein soll streng spezifisch im Gewebe des Hodens exprimiert werden und mindestens sieben der Ott-Gene sollen meiosespezifisch exprimiert werden.

Die in unserem Labor gemachten Beobachtungen scheinen allerdings gegen diese restriktiven Annahmen zur Expression dieses Proteins zu sprechen, da es sich bei den in der vorliegenden Arbeit verwendeten N2a-Zellen um eine neuronale Zelllinie handelt. Ferner wird dem Ott-Protein eine ungewöhnliche Struktur zugeschrieben, da eine Besonderheit dieses Proteins seine auffallend histidinreiche Region im Mittelteil (109-271) ist. Ansonsten weist das 449 Aminosäuren umfassende Protein keinerlei signifikante Merkmale oder bekannte Sequenzmotive wie beispielsweise ein RRM oder NLS auf, die als Hinweise auf seine biologische Bedeutung dienen könnten. Daher ist es in diesem Falle auch unmöglich, Aussagen zu seiner physiologischen Rolle als Substrat der PKC $\alpha$  zu machen.

*Putatives Protein, iD: 12834524 (Trembl Q9D1C9)*

Dieses Protein (280 Aminosäuren) ist bislang noch vollständig unbekannt und in den Datenbanken lediglich als hypothetisches Protein geführt. Seine auf DNA-Sequenz-Daten basierende Sequenz befindet sich erst seit verganginem Jahr in den Datenbanken und weist ein RRM (59-149) auf. Insofern ist es möglich, daß das Protein Aufgaben in der mRNA-Prozessierung erfüllt und daß eine Phosphorylierung durch PKC $\alpha$  oder andere nucleäre Kinasen möglicherweise die Wechselwirkung zwischen RRM und RNA reguliert.

*PSF (PTB-assoziiertes Spleißfaktor)*

s. Kapitel 3.2

*Ribophorin II*

Kreibich und Mitarbeiter entdeckten die Ribophorine I und II, als sie 1978 bei einer gelelektrophoretischen Auftrennung von glatter und rauer ER-Membran zwei Proteine (63 kDa bzw. 65 kDa) entdeckten, die nur in der rauen ER-Membran zu finden waren.

Beide Ribophorine weisen eine Transmembranregion nahe ihres cytosolischen C-Terminus auf und sind Bestandteile des Oligosaccharyltransferasekomplexes (OST) im rauen ER. Daß die beiden hochkonservierten Proteine denselben Namen tragen ist irreführend, da die beiden Ribophorine eine vollständig unterschiedliche Primärsequenz aufweisen

(Crimaudo et al. 1987) und vermutlich auch unterschiedliche Funktionen haben. So wird im Falle Ribophorin I vermutet, daß es gemeinsam mit der Oligosaccharyltransferase (OST48) direkt zur katalytischen Wirkung des Komplexes beiträgt (Hardt et al. 2000). Die Funktion des Ribophorin II ist bislang noch unbekannt.

Der OST katalysiert die Übertragung von Glc(3)-Man(9)-GlcNAc(2) von Dolicholpyrophosphat auf spezifische Asparaginreste der naszierenden Polypeptidkette, sobald diese in das Lumen des ER eintritt. Der OST-Komplex besteht aus mindestens 4 verschiedenen Proteinen und enthält neben den Ribophorinen I und II und der erwähnten OST48 noch DAD1 (Defender against apoptotic death; Sanjay et al. 1998; Fu et al. 1997).

Ribophorine sind bislang als Markerproteine des rauen endoplasmatischen Retikulums bekannt. Daher ist in diesem Fall nicht das eigentlich überraschende Ergebnis, daß es sich bei dem Ribophorin II offenbar um ein Substrat der PKC $\alpha$  handelt, als vielmehr die Beobachtung, das Ribophorin in der Triton X 100-resistenten Fraktion zu finden. Da die Membranen des rauen endoplasmatischen Retikulums und die äußere Kernmembran in ihrer Proteinzusammensetzung voneinander ununterscheidbar sind, wäre es sicherlich begründet, anzunehmen, daß die äußere Kernmembran einen gewissen Ribophorinanteil enthält. Allerdings sind die Proteine der äußeren Kernmembran durch die Behandlung mit Triton X-100 weitgehend abgelöst worden, unter anderem auch andere Markerproteine des rauen ER wie beispielsweise das Calnexin (Dreger et al. 2001). Trotzdem kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß es sich bei der Anwesenheit des Ribophorins in der Triton X 100-resistenten Fraktion um ein gut reproduzierbaren Solubilisierungseffekt handelt: In der Vergangenheit wurden zahlreiche Experimente zur Solubilisierung der Ribophorine mittels nichtionischer Detergentien durchgeführt, in deren Verlauf festgestellt wurde, daß die Ribophorine mit Membranen sedimentieren, aus denen die meisten anderen Proteine von den Detergentien bereits herausgelöst worden waren (Kreibich et al. 1978; Kreibich et al. 1982).

Allerdings liegt die in dieser Arbeit eingesetzte Detergentskonzentration von 0,5 % dreifach so hoch, wie die höchste jemals von Kreibich und Mitarbeitern publizierte Konzentration, und bislang existieren noch keine hochaufgelösten elektronenmikroskopischen Aufnahmen, die die Verteilung des Ribophorins in den Kernmembranen zeigen. Da außerdem keine Funktionen für das Ribophorin II bekannt sind – und somit auch keinerlei Funktionen, die zwingend eine Assoziation mit dem OST-Komplex voraussetzen, kann nach dem derzeitigen Kenntnisstand eine Präsenz des Ribophorin im Zellkern nicht ausgeschlossen werden. Sollte der experimentelle Nachweis gelingen, daß das Ribophorin II auch an der inneren Kernmembran vorkommt, so könnten sich daraus neue Aspekte zur Ribosomen-Biogenese ergeben. So

könnte gerade ein mit Ribosomen wechselwirkendes Protein wie das Ribophorin II beispielsweise ein guter Kandidat für die Ausbildung spezifischer Routen sein, über die die präribosomalen Untereinheiten zum Kernporenkomplex transportiert werden können (Leger – Silvestre et al. 1997). Über die Phosphorylierung könnten dann diese Routen durch die PKC $\alpha$  modifiziert werden und so der Export der präribosomalen Untereinheiten beeinflusst werden.

#### *RNA-HelikaseII/Gu*

Diese Helikase besteht aus 851 Aminosäuren und gehört zur Familie der DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) –Box-Proteine. Ursprünglich wurde das Enzym von Florez-Rozas und Hurwitz (1993) in Kernextrakten von HeLa-Zellen entdeckt. Es kann doppelsträngige RNA unter ATP-Hydrolyse in 5'-3'-Richtung entwinden und bei einsträngiger RNA die Bildung von Sekundärstrukturen induzieren. Für beide Aktivitäten sind verschiedene Domänen dieses Proteins verantwortlich: Die für die Helikase-Aktivität verantwortliche Domäne befindet sich am N-Terminus und macht etwa dreiviertel des gesamten Proteins aus, die für die „RNA-Faltung“ zuständige Domäne befindet sich im C-terminalen Viertel des Proteins (Valdez et al. 1997), in dem hochkonservierte FRGQR-Motive die RNA binden (Valdez 2000). Da die RNA-HelikaseII/Gu auch im Nucleolus lokalisiert ist und die Zugabe von Actinomycin D, ein Inhibitor der rRNA-Synthese, eine Umverteilung des Enzyms in das Nucleoplasma zur Folge hat, wird vermutet, daß das Protein wichtige Aufgaben bei der Synthese der rRNA übernimmt (Perlaky et al. 1997).

Es liegt daher nahe, daß Modifikation dieses Enzyms eine interessante Möglichkeit für die PKC $\alpha$  darstellt, Einfluß auf die Synthese der ribosomalen RNA und damit auch letztlich auf die Biogenese der Ribosomen zu nehmen. Daß in dieser Arbeit auch Ribophorin II als nucleäres Substrat der PKC $\alpha$  identifiziert wurde (s.o.), könnte ebenfalls in diese Richtung deuten.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der Phosphorylierung dieses PKC $\alpha$ -Substrates ist ein möglicher Einfluß der Helikase auf die Ribonucleosomenzusammensetzung und daraus resultierend die Möglichkeit, alternatives Spleißen und/oder den Export der reifen mRNA zu regulieren (Mili et al. 2001, Jankowsky et al. 2001). Dieser Möglichkeit sollte besondere Beachtung geschenkt werden, da in dieser Arbeit auch mehrere hnRNP als *in vitro*-Substrate der PKC $\alpha$  identifiziert wurden. Nähere Einzelheiten sind oben in dem betreffenden hnRNP-Unterkapitel beschrieben.



## *Vimentin*

Bei Vimentin handelt es sich um ein Intermediärfilament (IF). Es besitzt ein etwa 310 Aminosäuren langes Zentrum aus superspiralisierten  $\alpha$ -Helices, das dem Protein erlaubt, über „coiled-coil“-Interaktionen zu polymerisieren. Welche biologische Funktion die die Kernregion flankierenden nicht helicalen N- und C-terminalen Domänen haben, ist allerdings noch unklar. Einerseits könnten sie Kinetik und Grad der Polymerisation regulieren, da zumindest Phosphorylierungen in der N-terminalen Domäne das IF-Netzwerk destabilisieren und unter Umständen wahrscheinlich vollständig auflösen können (Inagaki et al. 1997). Anderen Untersuchungen zufolge enthalten diese Domänen jedoch Lokalisationssignale und sind möglicherweise für die richtige Ausrichtung der IF-Struktur verantwortlich (Lowrie et al. 2000).

Als PKC-Substrat ist Vimentin bereits seit 1988 bekannt und in dieser Eigenschaft schon häufig beschrieben worden (z.B.: Huang et al. 1988, Bertrand et al. 1994, Williams et al. 1994). Der Anteil der einzelnen PKC-Isoformen an der Phosphorylierung ist bislang jedoch noch schlecht untersucht. Lediglich für PKC $\delta$  wurde gezeigt, daß dieses Enzym Vimentin sowohl binden als auch phosphorylieren kann (Owen et al. 1996).

Auch die Gegenwart des Vimentin in der inneren Kernmembran und der nucleären Matrix ist schon lange bekannt und ebenso, daß diese Assoziation stabil gegenüber dem Einsatz nichtionischer Detergetien ist (Carmo-Fonseca & David-Ferreira 1990, Fey et al. 1984, French et al. 1989). Es wird vermutet, daß die amphiphile N-terminale Domäne die Doppelmembran des Zellkerns durchdringen und dann direkt in Wechselwirkung mit der nucleären Matrix treten kann (Perides et al. 1987, Traub & Schoeman 1994(a)).

Nucleäres Vimentin war aufgrund seiner Ähnlichkeit mit Transkriptionsfaktoren und seiner ausgeprägten Fähigkeit, DNA und Histone zu binden, schon lange postuliert worden (Traub & Schoeman 1994(a)). Sein Nachweis erwies sich jedoch lange als schwierig, da bislang kein Antikörper gegen Epitope gefunden werden konnte, die im Zellkern nicht maskiert vorlagen. Allerdings war FITC-gekoppeltes Vimentin über die FITC-Komponente nachweisbar (Hartig et al. 1998). Es wird angenommen, daß Vimentin erhebliche regulatorische Einflüsse auf die Genexpression ausübt (Traub & Schoeman 1994a, Traub & Schoeman 1994b) – und in diesem Fall wäre es für die PKC $\alpha$  eine interessante Möglichkeit die Genexpression über die Phosphorylierung des Vimentins zu beeinflussen. Wahrscheinlich sind außerdem Einflüsse auf die Vimentin-Polymerisierung. So beobachteten Mangoura und Mitarbeiter (1995) einen starken Anstieg der Oligomerisierung nach Zugabe des Phorbolesters TPA.

### 3.4. Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, das in vorausgegangenen Arbeiten unseres Labors auf einen Teil der regulatorischen Domäne der PKC $\alpha$  eingegrenzte Kernlokalisationssignal (Wagner 1999) genauer zu definieren. Dazu wurden Zellen mit Expressionsvektoren transfiziert, die PKC $\alpha$ -Deletionsmutanten codierten, die mit GFP- $\beta$ -Galaktosidase bzw. mit zwei GFP-Molekülen fusioniert waren. Die erzielten Ergebnisse erlauben keine Aussage bezüglich der Präsenz eines NLS innerhalb der C1-Domäne der PKC, da die Fusionsproteine überraschenderweise eine ausgesprochen hohe Cytotoxizität aufweisen und in Aggregaten variabler Gestalt und Größe assemblieren.

Offensichtlich können also in diesem Fall GFP-Konstrukte nicht zur Klärung der oben genannten Fragestellung verwendet werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde auf der Grundlage von Vorarbeiten unseres Labors (Rosenberger 1997) nachgewiesen, daß der PTB-assoziierte Spleißfaktor (PSF) ein Bindungspartner für PKC $\alpha$  ist. Dabei handelt es sich um das erste nucleäre PKC-bindende Protein überhaupt. Die Bindung ist abhängig von der Aktivierung der PKC $\alpha$ . Desweiteren wurde festgestellt, daß PSF ein schwaches Substrat der PKC $\alpha$  ist.

Bei der Suche nach weiteren Substraten der PKC $\alpha$  wurden *in vitro*-Phosphorylierungen von Kermembranen bzw. deren Triton X-100 resistenten Fraktionen durchgeführt und die Proteine anschließend mittels zweidimensionaler BAC-SDS-PAGE aufgetrennt. In der Autoradiographie sichtbare Spots konnten aus den Gelen ausgestochen und mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie konnten 12 neue Substrate der PKC $\alpha$  zusätzlich zu dem bereits erwähnten PSF identifiziert werden. Darunter sind unter anderem mit dem Heterochromatin 2, dem Ott-Protein und einem putativen Protein drei neue Proteine identifiziert worden, die bislang nur aufgrund genetischer Daten in den Datenbanken zu finden waren und über deren Funktion demzufolge bislang nichts bekannt ist.

Die biologischen Funktionen, die die anderen Proteine erfüllen, sind ebenso wie mögliche Bedeutungen ihrer Modifikation durch PKC $\alpha$  vielfältig. Sie erfüllen u.a. Aufgaben bei so wichtigen Prozessen wie Spleißen, beim mRNA-Export, bei der Chromatinorganisation, bei der Genregulation und bei der Ribosomenbiogenese.

### 3.5. Ausblick

Da die Ergebnisse zwar die Existenz eines Kernlokalisierungssignals in der untersuchten Region der Aminosäuren 1-187 nicht ausschließen, aber letztlich nicht den zwingenden Beweis erbringen, daß das NLS eben dort und nicht in einem anderen Teil des Proteins sein muß, sollte zunächst sichergestellt werden, daß sich die gesuchte NLS-Sequenz tatsächlich innerhalb der C1-Domäne der PKC $\alpha$  befindet. Ein Kontrollexperiment sollte zeigen, daß ein 187 Aminosäuren langes und mit GFP fusioniertes PKC $\alpha$ -Fragment, das die C1-Domäne nicht enthält, nicht in den Zellkern transloziert (s. auch S. 46). Sollte sich die Existenz einer NLS-Sequenz innerhalb der C1-Domäne der PKC $\alpha$  bestätigen, so wäre bei einem erneuten Versuch ihrer Eingrenzung der Einsatz von Expressions-Vektoren wenig sinnvoll, wenn sie analoge PKC $\alpha$ -Deletionsmutanten codieren, die lediglich mit einem anderen Markerprotein als GFP fusioniert sind: Die bisherigen Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Probleme der Cytotoxizität und der Aggregatbildung primär in den PKC $\alpha$ -Deletionsmutanten begründet liegen und nicht in der Fusion mit GFP. Ein alternativer und wahrscheinlich sinnvollerer Weg wäre, Proteine zu identifizieren, die an die PKC $\alpha$ -Sequenz 1-187 binden und die möglicherweise als Importfaktoren fungieren könnten. Über Punktmutationen wäre dann die Bindungsstelle und somit das NLS identifizierbar.

Für weiterführende Untersuchungen zur PKC $\alpha$ /PSF-Bindung wäre es zunächst erforderlich, die PKC $\alpha$ -Bindungsstelle des PSF zu lokalisieren und zu untersuchen, ob es sich bei PSF um ein Gerüstprotein für PKC $\alpha$ , Phosphatase1 und etwaige weitere Proteine handeln könnte.

Aufgrund der Vielfalt der neuen Substrate der PKC $\alpha$  und der möglichen biologischen Funktion ihrer Phosphorylierung müssen sich Folgeexperimente anschließen, die für jedes Substrat spezifisch sind. Allgemein sollte mittels Immuncytochemie oder GFP-Fusionsproteinen zunächst die Verteilung der Substrate im Zellkern festgestellt werden – das gilt insbesondere für die drei bislang unbekanntenen Proteine. Außerdem wäre für alle Proteine der Nachweis erforderlich, daß sie auch *in vivo* Substrate der PKC $\alpha$  sind. Standardmethoden wie Coimmunpräzipitation oder das „Crosslinking“ von komplexierten Proteinen könnten ferner Aufschlüsse über Bindungspartner und damit Hinweise auf mögliche biologische Funktionen geben.

### 3.6. Summary

The family of protein kinase C (PKC) isozymes are key-players in many signaltransduction pathways. The classical isoform PKC $\alpha$  is able to translocate into the nucleus and probably to induce changes in gene expression. Therefore identification of its nuclear localization signal, interacting proteins and its substrates in the nucleus are of special interest.

Based on earlier work in our laboratory which led to prediction of a nuclear localization signal NLS in the C1-region of PKC $\alpha$  (Wagner, 1999), fusion proteins of deletion mutants of PKC $\alpha$  and either GFP- $\beta$ -Galactosidase or two GFP-molecules, respectively, were constructed and expressed in mammalian cell lines by transient expression to exactly define the NLS of PKC $\alpha$ . The localisation pattern of the fusion proteins were analysed by confocal laser scanning microscopy. Surprisingly, the fusion proteins turned out to be cytotoxic, assembling in multiple intracellular aggregates with different shape and sizes. Based on these observations it was concluded that the approach of expressing fusion proteins cannot be used to find the exact NLS of PKC $\alpha$ .

The second part of this work was aimed to identify interacting partners and substrates of nuclear PKC $\alpha$ . Nuclear extracts of mammalian cells were incubated with GST-PKC $\alpha$ , immuno-precipitated and subsequently analysed with western blot analysis, which reveals that PTB associated splicing factor (PSF) is a PKC $\alpha$ -interacting protein. This interaction depends on the activation status of PKC $\alpha$ . It was also shown that PSF is a weak substrate of PKC $\alpha$ .

In search for additional substrates of PKC $\alpha$ , nuclear membranes and their detergent insoluble fractions were phosphorylated *in vitro*. The proteins were separated via 2D BAC-SDS-PAGE and gel spots corresponding to the autoradiography were used to identify the proteins by MALDI-mass spectrometry. With this method, we identified substrates, which are already known in literature as well as 13 new substrates of PKC $\alpha$ . Three of these proteins (heterochromatin 2, the Ott-protein and a putative protein) are known only from sequence data. The other newly identified substrates of PKC $\alpha$ , which include PSF, are known to be involved in many different processes including splicing, the export of mRNA, chromatin organization, regulation of gene-expression and biogenesis of ribosomes.