

1. Einleitung

Eukaryonten unterscheiden sich entsprechend ihrer Namensgebung (griech. eu - echt, karyon - Kern) von den weniger komplexen Prokaryonten vor allem durch die Existenz eines vom Rest der Zelle abgetrennten Kerns. Daneben weisen eukaryontische Zellen eine starke Kompartimentierung auf, die sich im Auftreten verschiedener membranumhüllter Organellen widerspiegelt. Die Kompartimentierung ermöglicht eine komplexe Regulation der Eukaryontenzellen, bedeutet jedoch gleichzeitig, daß ein intensiver Transport über Membrangrenzen hinweg erfolgen muß. Während der Transport in Organellen wie dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder dem Golgi-Apparat meist nur in eine Richtung erfolgt, verläuft Kerntransport bidirektional. So werden z.B. im Kern gebildete RNA-Moleküle durch Komplexierung mit Proteinen als Ribonucleoproteine verpackt und aus dem Kern ausgeschleust. Dagegen müssen Proteine wie Histone oder Transkriptionsfaktoren nach ihrer Synthese in den Kern importiert werden. Der Import von Kernproteinen muß zudem nach jeder Zellteilung neu erfolgen, da sich die Kernhülle während der Mitose auflöst. Selbst vorsichtige Schätzungen besagen, daß z.B. in einer wachsenden Säugerzelle mehr als eine Million Makromoleküle pro Minute zwischen Kern und Cytoplasma transportiert werden (Görlich und Mattaj, 1996). Wie wird dieser gewaltige Stofftransfer über die Kernhülle hinweg bewältigt?

1.1. Kernhülle und Kernporenkomplexe

Die Kernhülle setzt sich aus zwei Lipidmembranen zusammen. Dabei geht die äußere Kernmembran morphologisch in die Membran des rauhen ER über. Infolge dieser fehlenden Abgrenzung werden aus Kernhüllenpräparaten häufig auch ER-Proteine erhalten (Senior und Gerace, 1988). An der inneren Kernmembran befindet sich auf der nucleoplasmatischen Seite ein filamentöses Netzwerk, die sogenannte Lamina. Die Phosphorylierung der Lamina-Proteine A, B und C führt zur Auflösung der Lamina während der Mitose. Die Kernhülle wird von den Kernporenkomplexen (*nuclear pore complexes*, NPCs, Übersicht in Davis, 1995) durchspannt, die nach dem heutigen Kenntnisstand den gesamten Transport zwischen Cytoplasma und Kern ermöglichen. Die Kernporenkomplexe haben in Vertebraten eine Größe von ca. 125 MDa und setzen sich aus etwa 100 verschiedenen Proteinen, den Kernporenproteinen (Nucleoporinen) zusammen (Mattaj und Englmaier, 1998). Nahezu alle Kernporenproteine kommen in acht- bzw. 16-facher Kopienzahl innerhalb eines Kernporenkomplexes vor (Nigg, 1997). Aufschlüsse

zur Struktur von NPCs konnten bei Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* und Hefe mittels Elektronenmikroskopie erzielt werden (Rout und Went, 1994; Fahrenkrog et al., 1998). Danach hat der Kernporenkomplex eine zylinderartige Struktur mit achtfacher Symmetrie. Er enthält vier Substrukturen: den direkt von der Kernhülle umgebenen Speichenkomplex, den darin eingebetteten Zentralkörper, den cytoplasmatischen Ring mit acht ins Cytoplasma ragenden Filamenten und den nucleären Korb im Nucleoplasma. Der gesamte Kernporenkomplex umfaßt einen Durchmesser von 120 nm. Freie Diffusion durch den Komplex erfolgt für Proteine mit einem Durchmesser bis zu 9 nm entweder durch periphere Kanäle zwischen Speichenkomplex und Zentralkörper (Paine et al., 1975) oder direkt durch den Zentralkörper. Der geöffnete Kanal im Zentralkörper soll sich von 9 nm auf einen Durchmesser von etwa 25 nm erweitern lassen und so aktiven Kerntransport größerer Proteine vermitteln (Görlich, 1998). In den letzten Jahren wurden aus Hefe und verschiedenen Vertebraten einige Kernporenproteine isoliert und teilweise kloniert. Viele Nucleoporine enthalten kurze repetitive Sequenzen wie FXFG und GLFG oder O-glykosidische N-Actetylglucosamin- (Fabre und Hurt, 1994) und Sialinsäureverknüpfungen (Emig et al., 1995). Die repetitiven Sequenzen in Kernporenproteinen spielen wahrscheinlich eine direkte Rolle beim Kerntransport, da z.B. für den Import- und Exportfaktor KAP95p sowie den mRNA-Exportfaktor Gle2p Bindung an die GLFG-Repeats der Nucleoporine Nup116p und Nup110p gezeigt werden konnte (Iovine und Went, 1997; Bailer et al., 1998). Auch für weitere Nucleoporine wie RanBP2/Nup358 an der cytoplasmatischen Seite des Kernporenkomplexes (Melchior et al., 1995) oder p62 in der Pore (Paschal und Gerace, 1995) wird aufgrund von Wechselwirkungen mit Kerntransport vermittelnden Proteinen eine aktive Beteiligung am Kerntransport postuliert.

1.2. Transport vom Cytoplasma in den Kern

Mitte der achtziger Jahre wurden durch Strukturvergleich von Kernproteinen Sequenzen ermittelt, die für den Import in den Kern notwendig, aber auch ausreichend sind, da das Anfügen an Proteine, die allein nicht in den Kern translozieren, zu deren Anreicherung im Kern führte. Diese Sequenzen werden aus historischen Gründen als klassische Kernlokalisierungssignale (nuclear localisation signals, NLSs) bezeichnet und umfassen drei bis fünf basische Aminosäuren. Klassische Kernlokalisierungssignale liegen entweder einteilig wie beim großen T-Antigen des Affen-Virus 40 (*simian virus 40 large T-Antigen*) (**PKKKRKV**, Kalderon et al., 1984) oder zweiteilig wie beim Nucleoplasmin (**KRPAATKKAGQAKKK**, Robbins et al., 1991) vor. In den letzten Jahren wurden weitere Sequenzen gefunden, die RNA bindende Proteine in den Kern dirigieren. Dazu gehören die 38 Aminosäuren umfassende M9-Sequenz innerhalb des

hnRNP A1-Proteins (Pollard et al., 1996) sowie ein aus 40 Aminosäuren bestehendes Signal in hnRNP K, das als KNS (*hnRNP K nuclear shuttling domain*, Michael et al., 1997) bezeichnet wird. Bei U snRNP konnte gezeigt werden, daß das Sm-core-Protein und die Trimethylguanosin-Kappe als komplexes Kernlokalisierungssignal fungieren. Mit hoher Wahrscheinlichkeit existieren weitere, bisher unbekannte Kernlokalisationssequenzen z.B. im Herpes-Virus-Protein VP-22, das durch Plasmamembran und Kernhülle transportiert wird (Elliott und O'Hare, 1997), oder beim Transkriptionsfaktor TFIIIA, wo man die entsprechende Sequenz innerhalb des Zink-Fingers vermutet (Rudt und Pieler, 1996). Transport in den Kern ist jedoch nicht zwingenderweise abhängig von konservierten Kernsignalen. Neben einer passiven Diffusion kleinerer Proteine, ggf. mit Retention durch nucleäre Interaktionspartner, ist Kerntransport auch durch bloße Bindung an Proteine mit einem Kernsignal denkbar (Nigg, 1997).

Das Auftreten konservierter Kernlokalisierungssignale legte die Vermutung nahe, daß zumindest für Proteine mit dem gleichen NLS gemeinsame Interaktionspartner existieren, die den Transport vom Cytoplasma zum Kern ermöglichen. Tatsächlich konnten mit Hilfe eines *in vitro*-Testsystems mit Digitonin-permeabilisierten Zellen (Adam et al., 1990) derartige Interaktionspartner gefunden werden. Die Zugabe von Digitonin bewirkt durch die Bildung schwerlöslicher Digitinoid-Komplexe mit Cholesterin eine Permeabilisierung der Plasmamembran, während die cholesterinarme Kernhülle intakt bleibt. Die Fraktionierung von Transport-regenerierendem Cytosol erlaubte so z.B. die Isolation und spätere Klonierung des NLS-Rezeptors, der gewöhnlich als Importin α bezeichnet wird (Görlich et al., 1994).

Derzeit ergibt sich für Kerntransport von Proteinen mit klassischen NLS und die beteiligten Faktoren folgendes Bild (Übersicht in Mattaj und Englmaier, 1998; Weiss, 1998): Das NLS-enhaltende Protein bindet an den NLS-Rezeptor Importin α , der in Lösung als Komplex mit Importin β durch eine Importin β bindende Domäne (*importin β binding domain*, IBB) vorliegt. Importin α fungiert dabei offenbar lediglich als Adapterprotein, während der eigentliche Transporter durch die Pore das Importin β ist. Der trimere Komplex bindet energieunabhängig mittels Importin β an die cytoplasmatischen Fibrillen des Kernporenkomplexes. Wie der Transport durch die Pore erfolgt, ist noch völlig unklar. Neuere Ergebnisse deuten darauf hin, daß das Durchschleusen durch die Pore energieunabhängig erfolgt (Englmaier und Mattaj, 1999; Ribbeck et al., 1999). Meines Erachtens kann eine frühere Theorie, nach der der Transport durch die Pore durch einen oder mehrere Hydrolyseschritte von GTP an Ran, ein kleines GTP-bindendes Protein erfordert (Radu et al., 1995), jedoch nicht völlig ausgeschlossen werden. An der nucleoplasmatischen Seite des Kernporenkomplexes wird die Dissoziation des NLS-

enthaltenden Proteins von Importin β durch Bindung von Ran-GTP an Importin β ausgelöst. Wahrscheinlich induziert dieser Dissoziationsschritt auch die nachfolgende Ablösung des Importin α vom NLS-Protein (Görlich et al., 1996). Das freie Importin α bindet schließlich in Gegenwart von Ran-GTP an den Export-Rezeptor CAS und wird ins Cytoplasma ausgeschleust. Der Mechanismus des Recyclings von Importin β ist nicht geklärt. Die Existenz eines spezifischen Export-Rezeptors wie im Falle des Importin α erscheint jedoch wenig plausibel, da für diesen hypothetischen Export-Rezeptor noch weitere Transport-Rezeptoren existieren müßten (Mattaj und Englmaier, 1998). Möglicherweise erfolgt der Export von Importin β mit Hilfe von Ran-GTP, wobei die Dissoziation im Cytoplasma durch GTP-Hydrolyse erfolgt (Görlich, 1998). Eine wichtige Rolle beim Transport zwischen Cytoplasma und Kern spielt die unsymmetrische Verteilung von Ran-GTP und Ran-GDP. Ran selbst hat eine geringe GTPase-Aktivität, die jedoch durch das aktivierende Protein Ran-GAP1 (*Ran-GTPase-activating-protein*) stark erhöht wird. Da Ran-GAP1 vorwiegend cytoplasmatisch lokalisiert ist, liegt Ran im Cytoplasma meist in der GDP-gebundenen Form vor. Dagegen führt der am Chromatin gebundene Faktor Ran-GEF (*Ran-GTP-exchange-factor*) zum Nucleotid austausch von GDP gegen GTP und somit zu einer hohen Konzentration von Ran-GTP im Kern.

Über den Kerntransport von Proteinen ohne klassisches NLS ist weitaus weniger bekannt. Für das M9-NLS in hnRNP A1 existiert ein Rezeptor, der Import und Export vermittelt und von seinen Entdeckern Transportin genannt wurde (Pollard et al., 1996). Transportin weist eine geringe Ähnlichkeit zu Importin β auf. Entgegen bisherigen Vorstellungen scheint der Transportin-vermittelte Import (und Export) unabhängig von Energie in Form hydrolysierbarer Trinucleotidphosphate zu verlaufen (Englmaier und Mattaj, 1999; Ribbeck et al., 1999). Demnach scheint Energie in Form von Ran-GTP nur für die Dissoziation des Transportins vom M9-Substrat benötigt zu werden.

1.3. Proteinkinase C

Ursprünglich als Ca^{2+} - und Phospholipid-abhängige Kinase beschrieben (Ogawa et al., 1981), stellt Proteinkinase C (PKC) ein wichtiges regulatorisches Enzym dar, das als molekularer Schalter bei verschiedenen Signalwegen fungiert, indem es durch Phosphorylierung an Serin- und Threoninresten die Eigenschaften von Proteinen verändert. Besonderes Interesse erlangte PKC aufgrund der Aktivierbarkeit mit Phorbolestern, einer Gruppe starker Tumorpromotoren (Castagna et al., 1982; Kikkawa et al., 1983). Später konnte gezeigt werden, daß PKC eine wichtige Rolle bei Prozessen wie Wachstum, Differenzierung oder bei der Langzeitpotenzie-

rung, einem zellulären Modell für Lernen, spielt. Befunde aus den letzten Jahren deuten zudem darauf hin, daß PKC auch an der Ausbildung von Immunreaktivität und neoplastischem Wachstum sowie an der Apoptose, dem programmierten Zelltod, beteiligt ist.

Mittlerweile versteht man unter Proteinkinase C kein einzelnes Protein, sondern eine ganze Reihe miteinander verwandter Kinasen. Derzeit sind in Mammalia elf Isoformen von PKC bekannt. Der ursprünglichen Definition entsprechend werden die zuerst beschriebenen Ca^{2+} - und Phospholipid- (bzw. Phorbolster-) abhängigen Isozyme als klassische oder konventionelle PKCs (cPKCs) bezeichnet. Dazu gehören die Isozyme α , βI , βII und γ . Die Isozyme βI und βII sind Spleißvarianten, die sich nur geringfügig innerhalb des C-Terminus unterscheiden (Coussens et al., 1987). Zur vollständigen Aktivierung konventioneller Isoformen werden Ca^{2+} , Diacylglycerol und Phosphatidylserin benötigt. Diacylglycerol kann durch Phorbolster ersetzt werden, wobei beide Aktivatoren die gleiche Bindungsstelle innerhalb der cPKCs besetzen, Phorbolster aber etwa hundertfach langsamer dissoziiert und somit eine stärkere Aktivierung induziert (Mosior & Newton, 1996). Diacylglycerol oder Phorbolster bewirken die Erhöhung der Affinität zur Plasmamembran durch Ausbildung einer hydrophoben Oberfläche, vermutlich ohne stärkere Konformationsänderung von PKC (Zhang et al., 1995). Die Gruppe der 1987 von Ono und Mitarbeitern entdeckten nichtkonventionellen PKCs (nPKCs) umfaßt die Isozyme δ , ϵ , η und θ . Diese Isozyme benötigen zur Aktivierung im Gegensatz zu den konventionellen PKCs kein Ca^{2+} . Die Isoformen ζ und λ bzw. deren homologe Form in Maus τ werden weder von Ca^{2+} noch von Phospholipiden aktiviert und deshalb als atypische PKCs (aPKCs) bezeichnet. Eine besondere Rolle nimmt die PKC-Isoform μ , deren Maushomolog als PKD bezeichnet wird, ein. PKC μ wird ebenso wie die nichtkonventionellen Isoformen Ca^{2+} -unabhängig von Phospholipiden bzw. Phorbolstern aktiviert, weist aber eine abweichende Struktur auf, so daß die früher übliche Einstufung zu den nichtkonventionellen Isozymen (Übersicht in Dekker und Parker, 1994) umstritten ist.

Alle PKC-Isoformen setzen sich aus einer regulatorischen und einer katalytischen Domäne zusammen, die durch eine sogenannte Scharnier-Region (*hinge region*) verbunden werden. Diese Scharnier-Region ist besonders empfindlich gegenüber Proteasen (Inoue et al., 1977). Proteolyse in der Scharnier-Region führt zu einem als PKM bezeichneten daueraktiven PKC-Fragment das jedoch so schnell proteolytisch abgebaut wird, daß eine physiologische Rolle bisher nicht nachgewiesen werden konnte (Olson et al., 1993). Die Bezeichnung der Substrukturen von PKC leitet sich von einem Sequenzvergleich der konventionellen PKC-Isozyme ab (Coussens et al., 1986). Danach werden die vier konservierten Bereiche mit C1 bis C4 und

die dazwischenliegenden variablen Bereiche, die somit die Isozymspezifität der konventionellen Isozyme ausmachen, als V1 bis V5 bezeichnet. Die Verwendung unterschiedlicher Methoden zur Bestimmung für konserviert/variabel führt jedoch leider dazu, daß für die Grenzen zwischen V- und C-Regionen keine mit allen Publikationen übereinstimmenden Angaben gemacht werden können.

Die regulatorische Domäne der konventionellen Isoformen (Abb. 1) umfaßt die Regionen V1, C1, V2 und C2, während sich an die Scharnier-Region (V3) die aus C3, V4, C5 und V5 bestehende katalytische Region anschließt. Die C1-Region setzt sich aus zwei verwandten Sequenzwiederholungen mit jeweils einem Zinkfinger, die für die Bindung von Diacylglycerol bzw. Phorbol ester verantwortlich sind, zusammen. Neueren Angaben zufolge (Newton, 1997; Toeker, 1998) werden bereits die einzelnen Zinkfingersequenzen als C1-Region aufgefaßt, so daß dann von zwei C1-Regionen ausgegangen werden muß. Am N-terminalen Ende von C1 befindet sich die Pseudosubstratregion, die nach einem allgemein anerkannten Modell das katalytische Zentrum von inaktiver PKC bindet (Pears und Parker, 1991). In der C2-Region befindet sich die Bindungsstelle für Ca^{2+} , die von fünf Aspartatresten gebildet wird (Shao et al., 1996). Die C3-Region ist für die Bindung von ATP und die C4-Region für die Substratbindung verantwortlich.

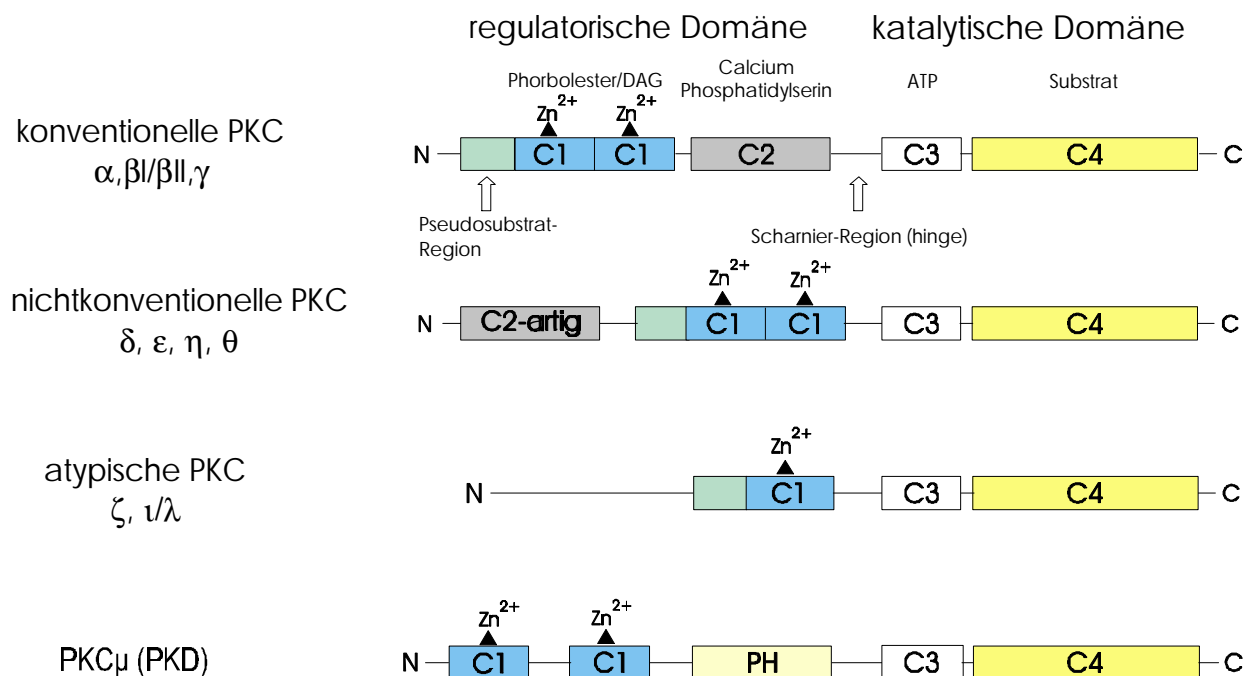


Abb. 1: Klassifizierung der PKC-Isozyme (nach Newton und Johnson, 1998)

Nichtkonventionelle Isoformen (Abb. 1) besitzen ebenfalls eine C1- und C2-artige-Region, wobei sich letztere jedoch vor der C1-Region befindet und die zur Ca^{2+} -Bindung notwendigen Aspartatreste fehlen (Newton, 1995).

Atypische Isoformen (Abb. 1) besitzen keine C2-Region, was die fehlende Regulation durch Ca^{2+} erklärt. Außerdem fehlt ihnen in der C1-Region einer der beiden Zinkfinger, so daß keine Aktivierung über Diacylglycerol oder Phorbolster induziert werden kann. Die Aktivierung der atypischen Isoformen kann, wie für das Isozym ζ gezeigt, über Phosphatidylinositol-3,4,5-Bisphosphat (PIP_3) erfolgen (Nakanishi et al., 1993). Daneben wurde auch Aktivierung durch freie Fettsäuren, insbesondere Arachidonsäure aufgezeigt (Übersicht in Nishizuka, 1995).

Die Proteinkinase $\text{C}\mu$ (Abb. 1) besitzt im Gegensatz zu übrigen Isoformen eine Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne und keine Pseudosubstratregion, kann aber wie die nichtkonventionellen Isoformen über die C1-Region mit Diacylglycerol oder Phorbolster aktiviert werden.

Die räumliche Struktur vollständiger PKC-Isoformen konnte bisher nicht bestimmt werden, was in erster Linie mit der Empfindlichkeit von PKC gegenüber proteolytischem Verdau zu erklären ist. Direkte Strukturaufklärung einzelner Bereiche innerhalb von PKC oder der Vergleich mit bereits aufgeklärten Proteinen, die PKC-Homologie aufweisen, lassen jedoch bedingte strukturelle Voraussagen für das gesamte Protein zu.

So konnten z.B. aufgrund starker Sequenzhomologie mit der in ihrer 3-D-Struktur durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärten Proteinkinase A (Knighton et al., 1991) Modelle für die katalytische Domäne von $\text{PKC}\beta\text{II}$ (Orr und Newton, 1994) und $\text{PKC}\alpha$ (Srinivasan et al., 1996) entwickelt werden. Danach ist eine Reihe saurer Aminosäuren in der C4-Region an der Interaktion zwischen katalytischer Domäne und Pseudosubstratregion beteiligt.

Die C2-Region stellt eine weitverbreitete Proteinstruktur dar, die sich auch in anderen Proteinen befindet. Durch Strukturaufklärung von C2-Domänen von Synaptotagmin (Sutton et al., 1995) und Phospholipase C (Essen et al., 1996) mittels Röntgenstrukturanalyse und $\text{PKC}\beta\text{II}$ mittels NMR (Shao et al., 1996) wurde ermittelt, daß sich innerhalb der β -Faltblatt-reichen Domäne eine neuartige Ca^{2+} -Bindungstasche befindet, welche die Bindung von zwei Ca^{2+} -Ionen an insgesamt fünf Aspartatresten ermöglicht. Für Phospholipase $\text{C}\delta$ konnte gezeigt werden, daß die Bindung von Ca^{2+} eine Konformationsänderung bewirkt, die in einer Exposition basischer Aminosäuren resultiert, was Interaktion mit sauren Lipiden der Plasmamembran ermöglicht (Grobler et al., 1996).

1.3.1. Subzelluläre Verteilung von Proteinkinase C

Die große Anzahl verschiedener Isozyme von PKC legt auch unterschiedliche Funktionen nahe, da eine weitreichende Redundanz der Isozyme evolutionär gesehen wenig sinnvoll erscheint. So konnte z.B. gezeigt werden, daß eine $\text{PKC}\gamma$ -knockout-Maus ein reduziertes neuropathi-

sches Schmerzempfinden und ein verändertes Substratphosphorylierungsmuster im Vergleich zu nichtmutierten Mäusen aufweist (Malmberg et al., 1997; Ramakers et al., 1999). Spezifität der Isozyme ist über wenigstens drei verschiedene Mechanismen zu erzielen: unterschiedliche Aktivierbarkeit gemäß der schon beschriebenen Einteilung in c-, n- und aPKCs; Phosphorylierung bestimmter Substrate (Substratspezifität) und Kompartimentierung. Da die einzelnen Isozyme jedoch keine gravierenden Unterschiede bei der Phosphorylierung von Substraten aufweisen (Jaken, 1996), scheinen die unterschiedlichen Funktionen der Isozyme hauptsächlich über spezifische Aktivierung und Kompartimentierung reguliert zu werden. Tatsächlich zeigen PKC-Isozyme ein sehr komplexes Verteilungsmuster, das in Abhängigkeit von Gewebe und Zelltyp variiert. Während z.B. PKC α , β I, β II ubiquitär vorliegen, findet man PKC γ hauptsächlich im ZNS und im Rückenmark. Älteren Vorstellungen zufolge wurde davon ausgegangen, daß sich nichtaktivierte PKC zunächst im Cytosol befindet und nach Aktivierung eine Translokation zur Plasmamembran erfolgt. Die Untersuchung der subzellulären Verteilung in verschiedenen Zelltypen zeigte jedoch, daß PKC-Isozyme in nahezu allen Kompartimenten wie Cytoskelett, Golgi, ER, Kernhülle, Nucleoli, Plasmamembran, Mitochondrienmembran, Dendriten oder endozytotischen Vesikeln auftreten (Übersicht in Liu und Heckmann, 1998). Obwohl einzelne PKC-Isoformen häufig in verschiedenen Zelltypen gleichverteilt vorliegen, kann kein generelles Kompartimentierungsmuster angegeben werden. So findet man PKC δ in den Neuroblastom-Gliom-Zellen NG 108-15 in Cytoplasma und den Nucleoli (Beckmann et al., 1994), während sie in NIH 3T3-Fibroblasten hauptsächlich Golgi-assoziiert vorliegt (Goodnight et al., 1995). Änderungen der Kompartimentierungsmuster sind vor allem nach Aktivierung der verschiedenen PKC-Isoformen zu beobachten. Translokationen aktivierter PKC können bereits durch intramolekulare Veränderungen wie Phosphorylierung und Autophosphorylierung bei den konventionellen PKCs ausgelöst werden (Newton, 1997). Andererseits wird die Existenz zahlreicher Cofaktoren postuliert, die aktivierte PKC-Isozyme zum Zielkompartiment dirigieren. Derartige Rezeptor-Proteine wurden 1991 erstmals von Mochly-Rosen und Mitarbeitern beschrieben und als Rezeptoren für aktivierte PKCs bezeichnet (*receptor of activated C kinases*, RACK). In den letzten Jahren wurden weitere PKC-Rezeptor Proteine wie PICK1 (*protein interacting with C kinase*; Staudinger et al., 1995) und AKAP79 (*a kinase anchoring protein*; Klauk et al., 1996) gefunden, die wahrscheinlich an der Translokation von PKC-Isoformen beteiligt sind.

1.3.2. Proteinkinase C im Zellkern

Die Entdeckung, daß Proteinkinase C mit Phorbolestern aktiviert werden kann, deutet darauf hin, daß PKC an der Signaltransduktion zum Zellkern beteiligt sein muß, da die Wirkung von Tumor-induzierenden Substanzen wie Phorbolestern mit Veränderungen in der Genexpression einhergeht. Für die Beeinflussung nucleärer Prozesse durch PKC sind zwei grundsätzlich verschiedene Szenarien vorstellbar (detaillierte Übersicht in Buchner, 1995). Einerseits kann das im Cytoplasma vorliegende Enzym durch spezifische Substratphosphorylierung eine Signalkaskade zum Zellkern induzieren, ohne selbst in den Kern zu gelangen. Beispiele für indirekte "upstream"-Aktivierungen durch PKC im Cytoplasma stellen die MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Kaskade oder die Kerntranslokation von NFκB (*nuclear factor regulating expression of κ-light chain immunoglobulin* [zuerst in B-Zellen gefunden]) dar. Bei der MAP-Kinase-Kaskade greift PKCα durch Phosphorylierung von raf-1 (= MAPKKK) in die Signaltransduktion zum Zellkern ein (Kolch et al., 1993; Carroll et al., 1994). Etwas komplizierter stellt sich die Rolle von PKC bei der Kerntranslokation von NFκB dar, obwohl eine Beteiligung durch die Aktivierung mit Phorbolster und die Inhibition mit einer dominant negativen PKCζ-Mutante (Diaz-Meco et al., 1993) klar gezeigt wurde. Der Transkriptionsfaktor NFκB liegt zunächst cytoplasmatisch verankert als Komplex mit dem inhibierenden IκB vor. Die Phosphorylierung von IκB durch die IκB-Kinasen IKK1 und IKK2 innerhalb eines ca. 700 kDa großen Komplexes führt dann zur Dissoziation des Ankerproteins IκB und Exposition eines klassischen zweiteiligen Kernlokalisationssignals innerhalb von NFκB (Scheidereit, 1998). Die genaue Funktion von PKC bei der Aktivierung von NFκB ist derzeit noch nicht bekannt. Denkbar ist jedoch, daß die Aktivierung über PKC durch Phosphorylierung innerhalb des 700 kDa-Komplexes erfolgt.

Außerdem kann PKC auch negativ regulierend bei Signaltransduktion zum Kern wirken. So wurde kürzlich gezeigt, daß die Phosphorylierung von Diacylglycerol-Kinase-ζ durch PKCα und γ die Kerntranslokation der Diacylglycerol-Kinase inhibiert (Topham et al., 1998). Dies resultiert in einer höheren Konzentration von Diacylglycerol im Kern, da die von der Diacylglycerol-Kinase katalysierte Umwandlung von Diacylglycerol in Phosphatidsäure inhibiert wird. Interessanterweise bewirkt die höhere Konzentration an nucleärem Diacylglycerol eine verstärkte Translokation cytoplasmatischer PKCα zum Kern (Neri et al., 1998). Letzteres zeigt, daß PKC selbst als Signalmolekül zwischen Cytoplasma und Kern fungieren kann.

Tatsächlich wurden in den letzten Jahren trotz des Fehlens eines "klassischen" NLS fast alle Isozyme von PKC auch im Zellkern gefunden (Buchner, 1995). Zumeist befindet sich PKC

konstitutiv im Kern, so z.B. die Isozyme α , δ und ϵ in Neuroblastom NG108-Zellen (Beckmann, 1994). Daneben wurde für einige Isoformen, wie bereits oben für PKC α beschrieben, auch Stimulus-induzierte Kerntranslokation gefunden. Das erste Beispiel dafür wurde von Leach und Mitarbeitern 1989 beschrieben, die in NIH 3T3-Zellen beobachteten, daß die Aktivierung mit Phorbol ester eine Translokation von PKC α zur Kernhülle bewirkt. Außerdem findet man induzierte Kerntranslokation z.B. bei PKC α in IIC9-Fibroblasten nach Aktivierung mit Thrombin (Leach et al., 1992), bei PKC β II in HL-60 Zellen nach Stimulation mit Bryostatin (Hocevar und Fields, 1991) oder bei PKC ζ in HL-60 Zellen nach Aktivierung mit Vitamin A bzw. D3 (Bertolaso et al., 1998).

Das Auftreten von PKC im Zellkern impliziert die Frage nach ihrer Funktion, d.h. nach nucleären Substraten von PKC und den dadurch ausgelösten zellulären Veränderungen. Ein großes Problem beim Identifizieren nucleärer PKC-Substrate besteht darin, daß zwar etliche Kernproteine von PKC *in vitro* phosphoryliert werden, aber häufig die physiologische Bedeutung der Phosphorylierung *in vivo* nicht klar ist bzw. überhaupt nicht demonstriert werden konnte. Nichtsdestotrotz konnte für einige Proteine wie Lamin B (Fields et al., 1988), DNA-Topoisomerase I (Samuels et al., 1989), das Tumorsuppressorprotein p53 (Baudier et al., 1992), die terminale Deoxynucleotidtransferase (Trubiani et al., 1995) oder Nucleolin (Zhou et al., 1997) gezeigt werden, daß es sich um nucleäre PKC-Substrate *in vitro* und *in vivo* handelt. Während die Lamin B-Phosphorylierung auf eine Funktion von PKC bei der Mitose beim Auflösen der Kernhülle hindeutet, demonstrieren die beiden aufgeführten DNA-modifizierenden Enzyme, daß PKC auch direkt in die Regulation der Genexpression eingreift.

1.3.3. Detektion von PKC

Die Charakterisierung von PKC ist untrennbar mit der Entwicklung spezifischer Antikörper verbunden. Wurde PKC zunächst als ein Protein mit einem polyklonalen Serum nachgewiesen, erlaubte die Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen PKC abgeleitete Peptide bzw. Domänen die Identifizierung verschiedener Isoformen, die sich wie z.B. die konventionellen PKCs strukturell nur geringfügig voneinander unterscheiden. Trotz der meist hohen Spezifität dieser monoklonalen Antikörper werden teilweise mehrere PKC-Isoformen (Batlle et al., 1994) oder zusätzlich andere Proteine erkannt, was sogar zur Identifizierung von neuen, PKC verwandten Proteinen führte (Zouari et al., 1997; Smallwood et al., 1998). Ein weiterer Nachteil der immunocytochemischen Detektion von PKC liegt in der Begrenzung auf fixierte Zellen. So ist eine direkte Beobachtung der Translokation von PKC-Isozymen nicht möglich, da lediglich

Bestandsaufnahmen von "eingefrorenen" Zwischenzuständen gemacht werden können, was z.B. eingehendere kinetische Beobachtungen erschwert.

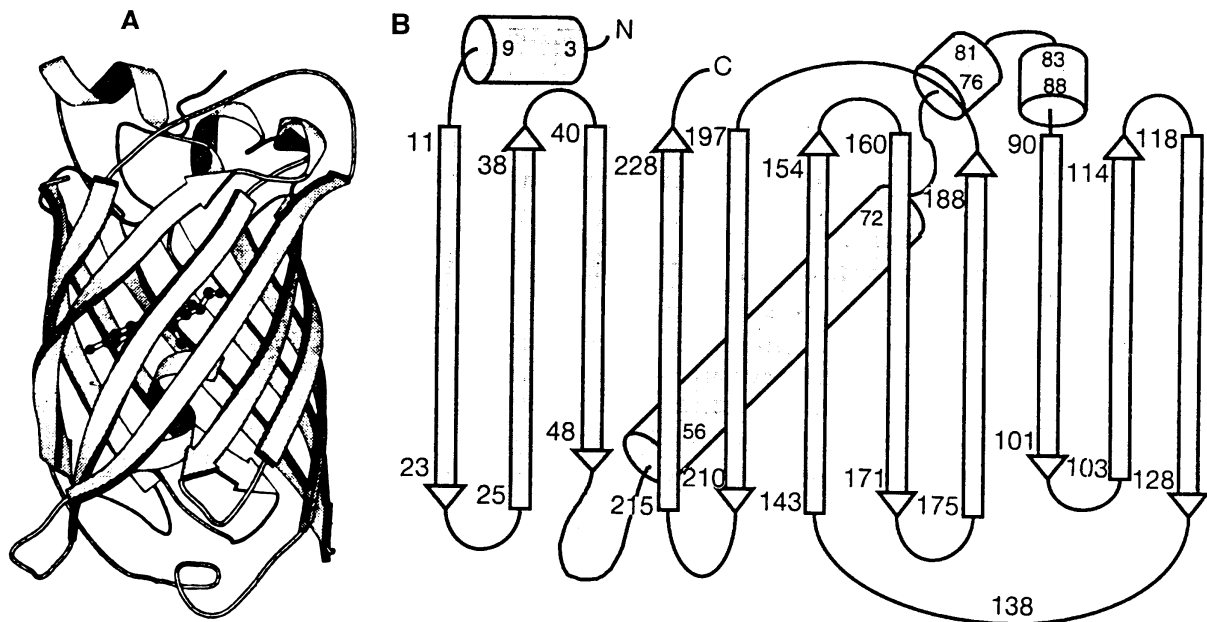
In den letzten Jahren wurden deshalb zur direkten Visualisierung subzellulärer Transportprozesse verstärkt fluoreszierende Fusionsproteine eingesetzt, die aufgrund ihrer Fluoreszenz eine immunocytochemische Detektion mit Antikörpern überflüssig machen. Alle verwendeten fluoreszierenden Fusionsproteine enthalten Varianten des grün fluoreszierenden Proteins, das im folgenden ausführlich beschrieben wird.

1.4. Das grün fluoreszierende Protein (*Green fluorescent protein, GFP*)

Die Umwandlung blauen Lichts in energieärmeres im grünen bis gelben Bereich *in vivo* wird als Biolumineszenz bezeichnet und wurde für eine Reihe sehr verschiedener Organismen wie Bakterien, Insekten oder Fische beschrieben (Übersicht bei Hastings und Morin, 1998). Die älteste Überlieferung von Biolumineszenz stammt aus dem ersten Jahrhundert unserer Zeitrechnung von Plinius dem Älteren, der Quallen aus der Bucht von Neapel benutzte, um verschiedene Gegenstände fluoreszierend zu machen. Leider wurden weitere Untersuchungen abrupt durch den Ausbruch des Vesuv im Jahr 79 zunichte gemacht (Cubitt et al., 1995). In den sechziger Jahren unseres Jahrhunderts begannen eingehende biochemische Untersuchungen von grün fluoreszierenden Proteinen aus den Schirmrändern von Quallen. Diese Proteine wurden wenig einfallsreich als grün fluoreszierende Proteine (*green fluorescent proteins, GFPs*) bezeichnet. Für die Qualle *Aequorea victoria* (bzw. *Aequorea aquorea*, siehe Shimomura, 1998) aus dem Nordwestpazifik konnte gezeigt werden, daß die Biolumineszenz durch zwei Proteine vermittelt wird: das primäre Photoprotein Aequorin, das in Abwesenheit von GFP blaues Licht emittiert und GFP, das durch Aequorin zur Emission grünen Lichts angeregt wird (Übersicht bei Shimomura, 1998). Der Energietransfer von Aequorin zum GFP erfolgt vorrangig strahlungslos (ohne Photonenemission) durch Dipol-Dipol-Interaktion und somit nicht durch die Absorption blauen Lichts vom Aequorin (Ward, 1979). Die Klonierung des GFP aus *Aequorea victoria* (Prasher et al., 1992) und der Nachweis, daß das Protein funktionell in verschiedenen Zellen heterolog exprimiert werden kann (Übersicht in Chalfie und Kain, 1998), machten GFP in den letzten Jahren zu einem faszinierenden Werkzeug für die Zellbiologie.

1.4.1. Eigenschaften von GFP

GFP setzt sich aus 238 Aminosäuren zusammen und hat ein Molekulargewicht von 27 kDa. Das Protein besitzt eine interessante 3D-Struktur (Ormö et al., 1996, Yang et al., 1996). Danach befindet sich das Fluoreszenz erzeugende Chromophor Ser₆₅-Tyr₆₆-Gly₆₇ im Innern eines Fasses (*b-can*), das sich aus elf antiparallel angeordneten β -Faltblättern zusammensetzt (Abb.



2).

Abb. 2: Struktur von GFP (nach Ormö et al., 1996)

A: Schematische Darstellung der 3D-Struktur von GFP. Das Chromophor befindet sich im Innern und ist durch die miteinander verbundenen Punkte angedeutet.

B: Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von GFP mit elf vertikal skizzierten β -Faltblättern und einer schräg eingezeichneten α -Helix mit dem Chromophor.

Untersuchungen mit GFP-Deletionsmutanten zeigten, daß für die Fluoreszenz fast die gesamte Struktur benötigt wird und lediglich das N-terminale Methionin sowie die letzten sieben Aminosäuren am C-Terminus deletiert werden können (Dopf und Horiagan, 1996). Die Funktion der Faßstruktur dürfte darin liegen, das Chromophor vor größeren Molekülen zu schützen, während kleinere Moleküle wie Wasser oder Sauerstoff Zugang zum Chromophor haben. Die ungewöhnliche Struktur ist auch für die hohe Stabilität von GFP, die z.B. in einer Resistenz gegen den Abbau durch die meisten Proteasen resultiert, verantwortlich. Für das Chromophor wurde ausgehend von einem nach Papainverdau von GFP erhaltenen Hexapeptid eine Imidazo-

linon-Struktur vorgeschlagen (Shimomura, 1979), die später mit der genauen Sequenz des Hexapeptids (Cody et al., 1993) und der Auflösung der 3D-Struktur bestätigt werden konnte. Die posttranslationale Bildung des Chromophors stellt sich nach heutigen Vorstellungen folgendermaßen dar (Cubitt et al., 1995; Abb. 3): Zunächst führt der nucleophile Angriff der Aminogruppe des Glycins₆₇ auf die Carbonylgruppe des Serin₆₅ zur Bildung eines 5-Rings. Daran schließt sich die Abspaltung von Wasser unter Bildung eines Imidazolinon-5-Intermediats an. Im Anschluß erfolgt in Gegenwart von molekularem Sauerstoff eine Oxydation der Tyrosinseitenkette, die das fluoreszierende p-hydroxy-benzyliden-imidazolinon-Chromophor ergibt.

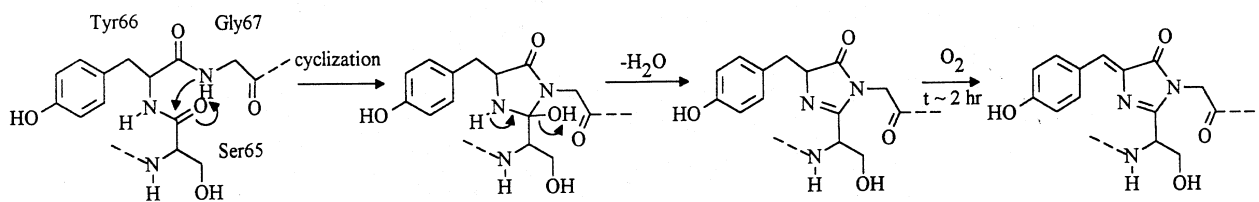


Abb. 3: Bildung des GFP-Chromophors (nach Cubitt et al., 1995)

Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus für die posttranslationale Bildung des GFP-Chromophors nach Cubitt et al., 1995. An die Zyklisierung schließt sich eine Wasserabspaltung und als geschwindigkeitsbestimmender Schritt die Oxydation zum p-hydroxy-benzyliden-imidazolinon-Chromophor an.

Mittels Mutation der Aminosäuren des Chromophors konnte gezeigt werden, daß der Austausch des Glycin₆₇ die Fluoreszenz verhindert, während verschiedene Aminosäure-Substitutionen von Serin₆₅ und Tyrosin₆₆ GFP-Mutanten mit veränderten Fluoreszenzeigenschaften ergaben (Übersicht zu GFP-Mutanten bei Tsien und Prasher, 1998). Besonders interessant sind GFP-Mutanten mit substituiertem Ser₆₅, für die eine Verschiebung des Absorptionsmaximums in den längerwelligen Bereich beobachtet wurde. Während das Wildtyp-GFP sein Absorptionsmaximum bei 395 nm hat und einen geringeren Absorptionspeak bei 475 nm aufweist, besitzt die Thr₆₅-Mutante nur noch einen Absorptionspeak bei 489 nm. Außerdem hat die Thr₆₅-Mutante gegenüber dem Wildtyp-GFP ein leicht verändertes Emissionsmaximum (511nm vs. 508nm) und einen etwa doppelt so hohen Extinktionskoeffizienten beim Absorptionsmaximum ($\epsilon_{489}=39200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ vs $\epsilon_{397}=21000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [Heim et al.,1995]). Andere Aminosäuresubstitutionen außerhalb des Chromophors führen zur verbesserten Faltung und weiteren Erhöhung des Extinktionskoeffizienten von GFP (Tsien und Prasher, 1998), so daß bei heterologer GFP-Expression gewöhnlich vom Wildtyp abweichende Proteine benutzt werden.

Die Flut erfolgreicher Anwendungen von GFP in den letzten fünf Jahren erstreckt sich auf so verschiedene Organismen wie Bakterien, Hefe, Drosophila, Pflanzen oder Mammalia (Übersicht in Chalfie und Kain, 1998). Dabei fand GFP u.a. Verwendung als Reporter für die Genexpression in lebenden Tieren (Chalfie et al., 1994), als Fusionsprotein oder als Indikator für Protein-Protein-Wechselwirkung durch Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer (FRET) (Miyawaki et al., 1997; Übersicht zu FRET zwischen GFPs in Pollock und Heim, 1999). Am häufigsten wird GFP als Fusionsprotein benutzt, was z.B. die direkte Visualisierung von Proteinen oder die Doppelfärbung von Proteinen mit verschiedenen GFP-Varianten (Ellenberg et al., 1999) in lebenden Zellen ermöglicht. Voraussetzung für eine erfolgreiche Verwendung von GFP als Fluoreszenzmarker ist natürlich, daß GFP keinen signifikanten Einfluß auf die Eigenschaften des Proteins ausübt. Erstaunlicherweise scheint sich GFP bei den meisten Fusionsproteinen tatsächlich inert zu verhalten, wenngleich nicht ausgeschlossen werden kann, daß andere Fälle nicht publiziert wurden. GFP-Fusionsproteine wurden zur Aufklärung der subzellulären Verteilung von Proteinen in Säugerzellen für fast alle Organellen benutzt (Übersicht bei Lippincott-Schwartz, 1998). So konnte z.B. für ein Fusionsprotein aus dem Glucocorticoid-Rezeptor und GFP eine induzierbare Translokation in den Kern gezeigt werden (Htun et al., 1996; Ogawa et al., 1995; Carey et al., 1996). Alle bisher beschriebenen GFP-PKC-Fusionsproteine mit den Isozymen α , β , γ , δ und ϵ zeigen nach Aktivierung eine Translokation zur Plasmamembran (Almholdt et al., 1999; Kim et al., 1999; Feng et al., 1998; Sakai et al., 1997; Ohmori et al., 1998; Shirai et al., 1998).

1.5. Zielsetzung der Arbeit

Zur Untersuchung des Kerntransports wurden NIH 3T3-Fibroblasten benutzt, eine Zelllinie bei der die Kerntranslokation von PKC α durch Aktivierung mit Phorbol ester induziert werden kann (Leach et al., 1989). Frühere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigten die Abhängigkeit des PKC α -Kerntransports vom intakten Cytoskelett und deuteten damit an, daß sich der Kerntransport von PKC von dem der "klassischen" NLS-abhängigen Kernproteine unterscheidet (Schmalz et al., 1996).

Ziel meiner Untersuchungen war es, den Kerntransport von Proteinkinase C am Beispiel des Isozyms α zu untersuchen. Dazu sollte zunächst ein Fusionsprotein bestehend aus dem *green fluorescent protein* (GFP) und PKC α mit Hilfe des Sf9-Baculovirus-Systems hergestellt werden. Das GFP dient als Fluoreszenzmarker, der die bisher notwendige Antikörperdetektion überflüssig macht. Das rekombinante GFP-PKC α -Fusionsprotein sollte bei Vorhandensein katalytischer Aktivität zum einen das aufwendige Reinigen von nativer PKC aus Gewebe überflüssig machen. Andererseits dürfte das GFP-PKC α -Fusionsprotein für den in unserer Arbeitsgruppe etablierten *in vitro* Kerntransport-Test nach Adam et al. (1990) oder zur Mikroinjektion in Fibroblasten geeignet sein. Schließlich könnte das Fusionsprotein zum Auffinden von Bindungspartnern der PKC verwendet werden.

Zur direkten Beobachtung der subzellulären Verteilung von PKC α sollte GFP-PKC α in Fibroblasten transient exprimiert werden. Dies sollte z.B. kinetische Untersuchungen zur PKC α -Translokation nach Aktivierung in lebenden Zellen ermöglichen. Ferner sollte es durch Veränderung potentieller PKC α -Interaktionspartner, z.B. durch Mikroinjektion spezifischer Antikörper möglich sein, die Bedingungen für die Translokation von PKC α einschließlich Inhibitoren bzw. Effektoren zu ermitteln.

Weitere Untersuchungen sollten dahin gehen, durch Herstellung verschiedener GFP-PKC α -Mutanten die für die Kerntranslokation essentiellen Bereiche innerhalb von PKC zu identifizieren. Die Kenntnis derartiger Bereiche sollte in einem weiteren Schritt dann auch das Identifizieren der am Kerntransport von PKC beteiligten Proteine möglich machen.