

1. Einleitung

Bei der Erforschung biochemischer Prozesse in Zellkernen rückt zunehmend die Subkompartimentierung der Zellkerne ins Zentrum des Interesses. So verschiedene Vorgänge wie DNA-Replikation, RNA-Spleißen, Protein-Import und -Export finden nicht an isotrop im Kern verteilten Orten statt, sondern dynamisch reguliert und kompartimentiert jeweils unter Beteiligung definierter Multiproteinkomplexe, die durch das strukturelle Gerüst nukleärer Subkompartimente lokalisiert werden. Diese neue Sichtweise, die die isolierte Betrachtung einzelner nukleärer Reaktionen ablöst, könnte unter anderem die Entdeckung zur Zeit unbekannter funktioneller Rollen von bislang als weitgehend "inert" angesehenen Strukturproteinen sowie die Entdeckung weiterer nukleärer Proteine, die im Zuge der Identifizierung von Proteinen in distinkten Subkompartimenten des Zellkerns gefunden werden, ermöglichen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist in diesem Sinne versucht worden, über die Identifizierung signalinduzierter Modifikationen bei Kernhüllenproteinen ein verfeinertes Bild der biochemischen Vorgänge im Zellkern zu gewinnen.

1.1 Zellkern-Kompartimente

Präparativ lassen sich Zellkerne beim Aufschluß in eine lösliche Fraktion (Nukleoplasma) und eine unlösliche Fraktion trennen. Die unlösliche Fraktion enthält die Kernmatrix (das Nukleoskelett), die Kernhülle mit innerer und äußerer Kernmembran, die Porenmembran mit den Kernporenkomplexen und der Kernlamina sowie das Chromatin. Im Kerninneren können morphologisch distinkte Strukturen unterschieden werden: die Nukleoli (Orte der Assemblierung ribosomaler Untereinheiten), coiled bodies, nukleäre "speckles" und eine zunehmende Anzahl weiterer Ultrastrukturen (im Überblick bei Lamond und Earnshaw, 1998; Misteli und Spector, 1998). Multiproteinkomplexe oder Ribonukleoproteinpartikel wie das Spleißosom und sogenannte "Replikationsfabriken" diffundieren offenbar nicht frei im Nukleoplasma, sondern sind aufgrund von Interaktionen mit dem Kernskelett (Kernmatrix) zumindest zu distinkten Zeitpunkten während des Zellzyklus gezielt lokalisiert (Cardoso und Leonhardt, 1998). Spleißfaktoren können so schnell in einem Subkompartiment mobilisiert und für das Spleißosom in einem unterscheidbaren Subkompartiment rekrutiert werden (Misteli und Spector, 1997).

Die Struktur des Chromatins ist vielfältig: im Heterochromatin liegt eine höhere Packungsdichte assoziiert mit geringer Transkriptionsaktivität vor. Das weniger kompakte Euchromatin ist assoziiert mit DNA-Bereichen, die transkribiert werden. Auch nach der Dekondensation der Chromosomen nach erfolgter Zellteilung und Reassemblierung von Kernmembran und -lamina nimmt das zu bestimmten Chromosomen gehörige Chromatin distinkte Bereiche im Zellkern ein, die sogenannten Chromosomen-Territorien (bei Lamond und Earnshaw, 1998). Die DNA vor allem des Heterochromatins interagiert mit Proteinen der Kernhülle. Dabei ist die Kernhülle in vielen Zellen nur näherungsweise sphärisch: Es zeigen sich Einstülpungen der Kernhülle bis hin zu "Tunneln" durch den Zellkern hindurch (Fricker et al., 1997). Der Proteinexport erfolgt möglicherweise entlang von durch das Nukleoskelett festgelegten Bahnen, die zu den Kernporenkomplexen führen (z.B. Strambio de Castillia et al., 1999).

Dem Thema der Arbeit entsprechend wird sich die weitere Darstellung nukleärer Struktur und Funktion auf die Kernhülle, insbesondere die innere Kernmembran, fokussieren.

1.2 Aufbau und Dynamik der Zellkernhülle

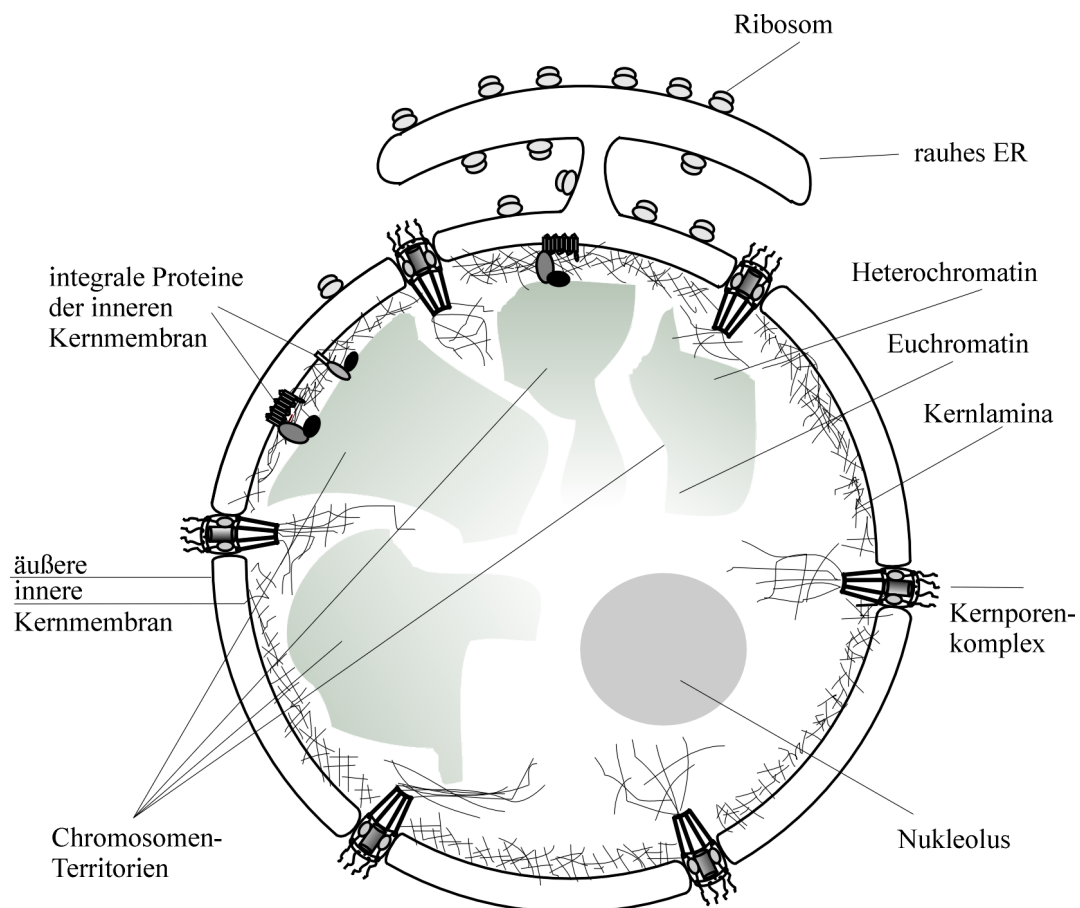
1.2.1 Subkompartimente der Kernhülle

Die Hülle von Zellkernen wird durch zwei Membransysteme gebildet: die innere Kernmembran und die äußere Kernmembran, die an den Kernporen ineinander übergehen. Die äußere Kernmembran ist zudem kontinuierlich mit der des Endoplasmatischen Retikulums (ER) und weist nach derzeitigem Wissensstand eine gleichartige Proteinausstattung wie diese auf (im Überblick bei Gant und Wilson, 1997). In der inneren Kernmembran sind dagegen einige Proteine kompartimentspezifisch lokalisiert (siehe unten). Auf der nukleären Seite wird die innere Kernmembran über weite Bereiche von der Kernlamina ausgekleidet. Diese besteht aus einem Proteinnetzwerk, das hauptsächlich von zellkernspezifischen Intermediärfilamentproteinen, den Laminen, gebildet wird (im Überblick bei Nigg, 1992). Zwischen den beiden Kernmembranen befindet sich der perinukleäre Raum, der kontinuierlich mit dem ER-Lumen ist. Die Kernporen werden von den Kernporenkomplexen (NPCs), Multiproteinkomplexen von ≈ 120 MDa (Davis, 1995) gebildet.

Funktionell stellt die Kernhülle eine Barriere zwischen Zytoplasma und Kerninnerem dar. Über die Kernporenkomplexe werden in regulierter Weise Proteine und Ribonukleinsäuren transportiert.

Die innere Kernmembran bietet zusammen mit der Kernlamina Bindungsstellen für Chromatin (Paddy et al., 1990; Foisner and Gerace, 1993; Ye and Worman, 1994; Ye und Worman, 1996). Unter Berücksichtigung der Beobachtung, daß transkriptionell inaktives Heterochromatin eher an der Kernperipherie lokalisiert ist (z.B. Nickerson et al., 1995), erscheint es möglich, daß innere Kernmembran und Lamina an der Regulation der Genexpression beteiligt sein könnten. Außerdem wurden in der Kernhülle verschiedene Komponenten von Signaltransduktionswegen gefunden. Darauf wird in Abschnitt 1.3 näher eingegangen.

Einige der Zellkern-Subkompartimente sind in Graphik 1 dargestellt:



Graphik 1: Schematischer Aufbau eines Zellkerns unter spezieller Berücksichtigung der Kernhüllen-Subkompartimente

1.2.1.1 Kernporenkomplex und Porenmembran

Der Kernporenkomplex ist ein Multiproteinkomplex aus einer geschätzten Anzahl von ca. 50-100 verschiedenen Polypeptiden. Er hat eine Masse von mehr als 100 MDa (Davis, 1995; Panté und Aebi, 1996). Der Kernporenkomplex erscheint in elektronenmikroskopischen Aufnahmen als ein Komplex von etwa 125 nm Durchmesser mit einer achtfachen Rotationssymmetrie (Panté und Aebi, 1996) und verschiedenen Substrukturen. Zu diesen gehören ins Zytoplasma ragende filamentöse Strukturen, die als Andockstellen für Protein-Import-Komplexe dienen können (Englmeier und Mattaj, 1998), außerdem ein Komplex, der den zentralen Kanal bildet und der in einen weiteren Komplex ("spoke complex") eingebettet ist, der für das Grundgerüst des Kernporenkomplexes gehalten wird, ein zytoplasmatischer und ein nukleärer Ring sowie auf der nukleoplasmatischen Seite eine korbartige Struktur ("nuclear basket") (im Überblick bei Davis, 1995; Panté und Aebi, 1996), die über filamentöse Strukturen mit dem Kerninneren verbunden ist (Arlucea et al., 1998; Strambio de Castillia et al., 1999). Über die Kernporenkomplexe findet ein regulierter Im- und Export von Proteinen und Nukleinsäuren in den Kern hinein oder heraus statt (zusammengefaßt bei Nigg, 1997). Importsubstrate mit einer Größe von >40 kDa können nicht mehr passiv durch die Kernporen diffundieren. Zahlreiche Proteine tragen aber Kernlokalisationssequenzen, die von Importfaktoren erkannt werden. Ähnliches gilt für den Kernexport von Makromolekülen (Nigg, 1997; Englmeier und Mattaj, 1998).

Die Proteine Nuclear Pore Complex Protein (NUP) 98 (Radu et al., 1995; Powers et al., 1995; Powers et al., 1997), NUP 153 (Sukegawa und Blobel, 1993) und Tpr (Byrd et al., 1994; Bangs et al., 1998), die mit der Korbstruktur assoziiert sind, spielen allesamt eine Rolle bei der Regulation des Protein- und Nukleinsäure-Exports. Tpr steht wahrscheinlich mit filamentösen Strukturen in Verbindung, die die Kernporenkomplexe mit dem Kerninneren, z.B. den Nukleoli verbinden (Cordes et al., 1997; Strambio de Castillia et al., 1999).

Ein spezifisch in der Porenmembran lokalisiertes Transmembranprotein ist gp210. Das Protein sorgt wahrscheinlich für die Verankerung der Kernporenkomplexe in der Kernhülle. Antikörper gegen den Teil des Proteins, der mutmaßlich im perinukleären Raum der Kernhülle gelegen ist, inhibieren den Proteinimport (Greber und Gerace, 1992; im Überblick u.a. bei Panté und Aebi, 1996).

1.2.1.2 Äußere Kernmembran

Die äußere Kernmembran ist kontinuierlich mit der Membran des rauhen Endoplasmatischen Retikulums. Ob es spezifisch in der äußeren Kernmembran lokalisierte Proteine gibt, ist nicht bekannt (z.B. Gant und Wilson, 1997), da diese Membran bislang nicht biochemisch isoliert werden konnte. Allerdings wurde in vielen Fällen eine Lokalisierung von Komponenten aus Signaltransduktionswegen sowohl in der ER- als auch in der äußeren Kernmembran beobachtet. Beispiele dafür sind IP₃- und Ryanodinrezeptoren (Ca²⁺-Kanäle, die für die Freisetzung von Ca²⁺ aus intrazellulären Speichern notwendig sind), Ire1p (Rezeptor-Serinkinase/Endonuklease, die die Streßantwort aufgrund des Vorliegens entfalteter Proteine im ER-Lumen vermittelt, Sadrauski et al., 1998) sowie etliche weitere Komponenten inklusive Proteine, die signalinduziert zur äußeren Kernmembran/ER-Membran translozieren können (Jans und Hassan, 1998; Peters-Golden, 1998).

1.2.1.3 Perinuklearraum

Der Raum zwischen innerer und äußerer Kernmembran ist kontinuierlich mit dem Lumen des Endoplasmatischen Retikulums. Es existiert keine Barriere für die Diffusion von Ca²⁺ zwischen ER-Lumen und Perinuklearraum (Subramanian und Meyer, 1997). Von einigen Autoren wird angenommen, daß vom Perinuklearraum signalinduziert Calcium in das Nukleoplasma freigesetzt werden kann, analog zur Funktion des ER als Calciumspeicher, aus dem Calcium ins Zytoplasma freigesetzt werden kann (Santella und Carafoli, 1997; Malviya und Rogue, 1998). Eine von der des ER-Lumens abweichende Proteinausstattung des Perinuklearraumes über die hineinragenden Domänen von Proteinen der inneren Kernmembran und der Porenmembran hinaus ist nicht bekannt.

1.2.1.4 Innere Kernmembran

Die innere Kernmembran besitzt eine spezifische Proteinausstattung (Gant und Wilson, 1997). Die Proteine, die bislang als integrale Membranproteine der inneren Kernmembran identifiziert wurden, spielen offenbar eine zentrale Rolle bei der Organisation von Interaktionen zwischen

Kernmembran, Kernlamina und Chromatin. Die exakte Funktion der Proteine *in vivo* ist dabei nach wie vor nur teilweise geklärt, die Analyse ihrer Protein-Protein-Interaktionen ist unvollständig. Da Proteine der inneren Kernmembran im Zentrum der vorliegenden Arbeit stehen, sollen die Befunde in der Literatur über die bislang bekannten spezifisch in diesem Kompartiment lokalisierten Proteine ausführlich dargestellt werden. Andere Proteine, die neben ihrer Lokalisation in anderen Zellkompartimenten auch in der inneren Kernmembran gefunden worden sind, werden in Abschn. 1.3 aufgeführt.

Emerin

Emerin ist ein 34 kDA Protein mit einem C-terminal gelegenen vorhergesagten Transmembranbereich (Manial et al., 1996). Mutationen in verschiedenen Bereichen von Emerin sind verantwortlich für das Auftreten des Emery-Dreifuss-Syndroms (Bione et al., 1994), einer erblichen Muskelschwäche-Krankheit, die aufgrund der Beeinträchtigung der Funktion des Herzmuskels zum Tod führt, wenn sie nicht behandelt wird (Emery, 1989). Über welchen Mechanismus Emerin zur Pathogenese beiträgt, ist unklar. Emerin ist in der inneren Kernmembran lokalisiert (Manial et al., 1996; Nagano et al., 1996), wurde aber auch in der Kernmatrix und an Zellkontaktstellen, insbesondere den Desmosomen von Herzmuskelzellen (Cartegni et al., 1997), gefunden. Bei Patienten mit dem Emery-Dreifuss-Syndrom kommen Deletionen des C-Terminus von Emerin, der die vorhergesagte Transmembranregion enthält, vor (Nigro et al., 1995). Andere pathologische Mutationen, die zu einer Fehlphosphorylierung von Emerin führen, bewirken eine diffuse Lokalisierung des Proteins während der Interphase des Zellzyklus (Ellis et al., 1998). Emerin weist zwar eine begrenzte Sequenzähnlichkeit zu LAP 2 β und LAP 2 γ auf, zeigt jedoch innerhalb der inneren Kernmembran eine von der der LAPs verschiedene Lokalisation (Tsuchiya et al., 1999).

Lamin B-Rezeptor

Der Lamin B-Rezeptor (LBR) ist ein integrales Protein der inneren Kernmembran mit einem relativen Molekulargewicht von etwa 58 kDa. Die anhand der Primärstruktur des Proteins vorhergesagte Topologie beinhaltet acht Transmembranbereiche. N- und C-Terminus des Proteins sind mutmaßlich nukleoplasmatisch lokalisiert (Worman et al., 1990; Schuler et al., 1994; Ye und Worman, 1994). Von Untersuchungen des Lamin B-Rezeptors leitet sich das gegenwärtig favorisierte Modell für das Targeting integraler Membranproteine zur inneren

Kernmembran ab: Mit Hilfe chimärer Proteine wurde gezeigt, daß die Größe der nukleoplasmatischen Domäne eines Proteins der inneren Kernmembran für ein korrektes Targeting ein gewisses Ausmaß (ca. 70 kDa) nicht überschreiten darf (Soullam und Worman, 1995). Es wird angenommen, daß die Proteine der inneren Kernmembran über Diffusion durch die seitlichen Kanäle des Kernporenkomplexes (bei Panté und Aebi, 1996) in die innere Kernmembran gelangen und dort durch Interaktionen mit Chromatin und Kernlamina fixiert werden. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, daß die N-terminale Domäne 1-203 des Lamin B-Rezeptors Membranproteine an die innere Kernmembran leiten kann. (Soullam und Worman, 1995). Bislang ist kein einheitliches Targeting-Signal in den Primärstrukturen verschiedener integraler Proteine der inneren Kernmembran gefunden worden, die kritischen Proteinregionen scheinen auf der Ebene der Primärstrukturen von Protein zu Protein verschieden zu sein (Furukawa et al., 1995; Ashery-Padan et al., 1997; Tsuchiya et al., 1999).

Pyrpasopoulou et al. (1996) fanden *in vitro*, daß der LBR den größten Beitrag der Kernhülle zur Chromatinbindung im Vergleich zu Lamin und LAP 2 (s.unten) beisteuert. Der LBR bindet das Chromatin-bindende Protein HP-1 (Ye und Worman, 1996; Ye et al., 1997), welches vermutlich nach der Mitose als eines der ersten Proteine wieder mit Chromosomen reassoziert (Ellenberg et al., 1998). Assoziiert mit dem LBR wurde eine Kinase identifiziert, die die Arginin/Serin-reiche Domäne (RS-Domäne) des LBR phosphorylieren kann (Simos und Georgatos, 1992; Nikolakaki et al., 1996; Nikolakaki et al., 1997). RS-Domänen sind außer beim LBR bei einigen Spleiß-Faktoren gefunden worden (Misteli und Spector, 1997). Diese Domänen sind Ziele von RS-spezifischen Kinasen (SRPKs), die durch Phosphorylierung Spleiß-Faktoren funktionell regulieren können (Misteli et al., 1997). Es wurde gezeigt, daß *in vitro* die SRPKs und die Lamin-B-Rezeptor-Kinase identische Substratspezifität zeigen (Papoutsopoulou et al., 1999). Dies könnte bedeuten, daß der LBR in Zusammenhang zu Signalwegen, die das RNA-Spleißen regulieren, steht. Dies ginge weit über die bislang angenommen Funktion des Lamin-B-Rezeptors als die eines für die strukturelle Integrität der Kernhülle wichtigen Proteins hinaus. Der LBR weist in den Transmembransegmenten darüberhinaus Sequenzähnlichkeit zu Sterol-Reduktasen auf (im Überblick bei Holmer et al., 1999). Eine mögliche Sterol-Reduktase-Aktivität des Lamin B-Rezeptors wird nach wie vor debattiert: Silve et al. (1998) fanden eine Sterol C14-Reduktase-Aktivität für den humanen LBR in transfizierten Hefezellen. Diese Funktion könnte ein bislang unbekanntes Signaltransduktionssystem in der Kernmembran unterstützen.

Die Befähigung des Lamin B-Rezeptors zur direkten Bindung von Lamin B ist umstritten (Mical et al., 1998).

LAP 1

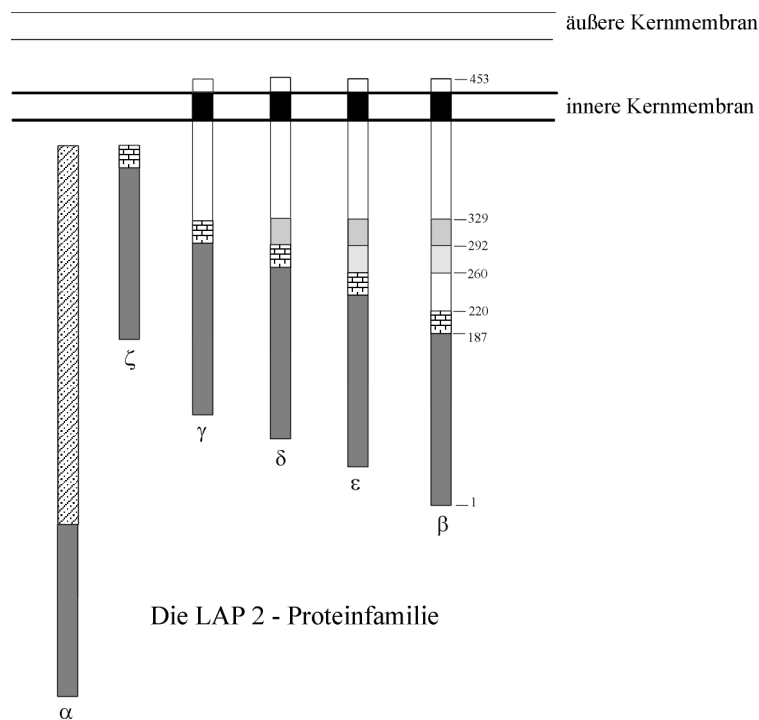
Das Lamina-assoziierte Polypeptid 1 (LAP 1) ist ein integrales Membranprotein (Foisner und Gerace, 1993, Furukawa et al., 1995), das in den drei Spleißvarianten LAP 1A, 1B und 1C vorkommt (Martin et al., 1995). Die Variante LAP 1C ist als einzige zur Zeit biochemisch näher charakterisiert worden (Maison et al., 1997). Das Protein interagiert wie LAP 2 β (s.unten) mit B-Typ-Laminen, bildet aber keinen gemeinsamen Proteinkomplex mit LAP 2 β . Bei der Deassemblierung der Kernhülle zu Beginn der Mitose verteilt sich LAP 1C auf andere mitotische Vesikel als LAP 2 β , obwohl in beiden Vesikelpopulationen B-Typ-Lamine vorkommen. Basierend auf diesem Befund wurde die Existenz von Subdomänen innerhalb der inneren Kernmembran vorgeschlagen, die nach gegenwärtigem Kenntnisstand durch Unterschiede in der Proteinausstattung definiert sind. In durch anti-LAP 1C-Immunpräzipitation isolierten Komplexen mit Lamin B ist auch eine Kinaseaktivität nachweisbar (Maison et al., 1997).

Lamina-assoziiertes Polypeptid 2 (LAP 2)

Die Lamina-assoziierten Polypeptide 2 (LAP-2) bilden eine Proteinfamilie aus mindestens fünf Spleißvarianten, die sich von einem einzigen Gen her ableiten (Harris et al., 1994; Harris et al., 1995; Berger et al., 1996; Graphik 2).

Mit Ausnahme von LAP 2 α und LAP 2 ζ weisen alle Spleißvarianten mutmaßlich einen Transmembranbereich auf, außerdem einen kurzen C-terminalen Abschnitt, der in den Intermembranbereich ragt und eine nukleoplasmatische Domäne, die mehr als 90 % der Proteinsequenz beinhaltet.

Lediglich die Spleißvarianten α und β sind bislang auf Proteinebene beschrieben worden (Foisner und Gerace, 1993; Dechat et al., 1998). LAP 2 β , die zur Zeit am besten untersuchte Spleißvariante, bindet phosphorylierungsabhängig B-Typ-Lamine und Chromatin (Foisner und Gerace, 1993). Die Chromatin-Bindungsregion liegt im Bereich der Aminosäuren (AS) 1-85, die Lamin-Bindungsregion im Bereich der AS 293-373 ("minimales Lamin-bindendes Fragment") (Furukawa et al., 1998). Mitotische Phosphorylierung hebt diese Bindungen auf. Die Interphase-Phosphorylierung des Proteins und deren funktionelle Bedeutung ist bislang allerdings nicht untersucht worden.



Graphik 2: Spleißvarianten des LAP 2-Gens anhand identifizierter cDNAs (nach Berger et al., 1996)

LAP 2 β hat offenbar eine kritische Funktion für die Struktur der Zellkernhülle: Die Mikroinjektion eines zur Lamin-bindenden Domäne des Proteins korrespondierenden rekombinanten Polypeptids in HeLa-Zellen behindert das Wachstum der Kernhülle und damit den Anstieg des Kernvolumens nach der Mitose (Yang et al., 1997). Konsistent damit wurde in zellfreien *in vitro* Assemblierungsreaktionen von Zellkernen von *Xenopus laevis* beobachtet, daß in Gegenwart des rekombinanten LAP 2 β -Fragmentes 1-408 Kerne mit deutlich verkleinertem Volumen und exzessiven Einstülpungen der inneren Kernmembran (allerdings verschieden von den beobachteten "Tunneln" und "tubulären Strukturen" bei Fricker et al., 1997) assemblieren. Die Gegenwart des rekombinanten Fragmentes 1-187, das die Chromatinbindungsregion enthält (Furukawa et al., 1998), verhinderte in solchen Experimenten sogar die Ausbildung geschlossener Kernhüllen und die Rekrutierung von Laminen zur Membran (Gant et al., 1999). Letztere Beobachtung suggeriert, daß die Bindung von Chromatin (direkt oder indirekt) an LAP 2 β Voraussetzung für die Rekrutierung von B-Typ-Laminen in den Komplex sein könnte. Darüberhinaus wurde in dem beschriebenen Assemblierungssystem gefunden, daß die kleineren

Kerne, die in Gegenwart des Fragmentes 1-408 assembliert wurden, eine höhere Effizienz bei der DNA-Replikation zeigten.

LAP 2 α ist die einzige weitere Spleißvariante, die bislang biochemischen Untersuchungen zugänglich war. LAP 2 α ist kein integrales Membranprotein und ist unter Bedingungen, unter denen LAP 2 β aus der Kernhülle extrahierbar ist, weiterhin mit der Kernmatrix und/ oder Chromatin assoziiert (Dechat et al., 1998). Die Chromatinbindung ist phosphorylierungsabhängig.

Otefin

Otefin ist ein assoziiertes oder integrales Protein der inneren Kernmembran, das bislang nur aus *Drosophila* bekannt ist (Harel et al., 1989; Padan et al., 1990). Die aufgrund der Primärstruktur des Proteins vorhergesagte Topologie von Otefin weist mutmaßlich einen Transmembranbereich aus, der größte Teil des Proteins ist wahrscheinlich nukleoplasmatisch lokalisiert. Otefin bildet vermutlich einen Proteinkomplex mit *Drosophila*-Laminen und weiteren Proteinen (Goldberg et al., 1998).

1.2.1.5 Kernlamina

Die Kernlamina, die in direkter Interaktion mit der inneren Kernmembran und dem Chromatin steht, wird hauptsächlich von nukleären Intermediärfilament-Proteinen, den Laminen, gebildet (Aebi et al., 1986; zusammengefaßt bei Nigg, 1992). Sie assembliert nach der Mitose, nachdem sich die Kernmembran um die Chromosomen geschlossen und ein Kernimport von Laminen begonnen hat (Chaudhary und Courvalin, 1993; Marshall und Wilson, 1997). In Säugerzellen kommen B-Typ-Lamine (Lamin B1 und B2) vor, die außer über Protein-Protein-Interaktionen (s. Abschn. 1.2.1.4) über Farnesylierung des C-Terminus (Wolda et al., 1988; Farnsworth et al., 1989) in der inneren Kernmembran verankert sind. In differenzierten Zellen treten daneben A- und C-Typ-Lamine auf. A- und C-Typ Lamine werden initial ebenfalls farnesyliert, um sie zur Kernmembran zu dirigieren (Holtz et al., 1989; Nigg et al., 1992; Firmsbach-Kraft und Stick, 1995; Mical et al., 1998), die modifizierte Region wird dann später aber abgespalten.

Lamin-Monomere weisen je eine globuläre Kopf- (head-) und Schwanz- (tail-) Domäne auf, die durch eine helicale Stab- (rod-) Domäne miteinander verbunden sind (Nigg, 1992). Die Lamine dimerisieren über Bildung einer coiled-coil-Struktur ihrer Stabdomänen und bilden in einer Selbst-

Assemblierung über Kopf-zu-Schwanz-Interaktionen ein zweidimensionales parakristallines orthogonales Protein-Netzwerk aus. Dieses Netzwerk kleidet die innere Kernmembran auf der nukleoplasmatischen Oberfläche aus (im Überblick bei Nigg, 1992; Stuurman et al., 1998). Lamine interagieren außer mit Proteinen der inneren Kernmembran mit Chromatin (Glass und Gerace, 1990; im Überblick bei Gant und Wilson, 1997; Chu et al., 1998). Dabei bilden sie nicht nur ein strukturelles Gerüst für die Verankerung von Chromatin, sondern beeinflussen auch die DNA-Replikation: Im zellfreien Kernassemblierungssystem bei *Xenopus laevis* bilden sich nach Depletion von Laminen zwar Kernhüllen, aber die entstehenden Kerne sind nicht replikationskompetent (Jenkins et al., 1993). Die Störung der Laminastruktur durch eine dominant-negative Lamin A-Mutante in dem gleichen experimentellen System bewirkt darüberhinaus eine abnorme Verteilung von Replikationsfaktoren (Spann et al., 1997). Wenige Nicht-Lamin-Komponenten der Kernlamina sind bekannt, darunter die MAN-Proteine (Paulin-Levasseur et al., 1996). Ihre Funktion ist jedoch bislang nicht bekannt.

1.2.2 Dynamische Struktur der Kernhülle

1.2.2.1 Zellzyklus

Zum Verständnis der Dynamik, der die Strukturen von Kernlamina und Kernhülle unterliegen (siehe Absch. 1.2.2.2), wird an dieser Stelle ein kurzer Überblick über den Zellzyklus von *Mammalia*-Zellen gegeben. Sofern sie nicht in einem Zustand sind, in dem keine Zellteilung mehr stattfindet, durchlaufen diese Zellen einen Zyklus mit Verdoppelung der DNA, Zunahme der Zellmasse sowie Mitose mit Zytokinese, aus der zwei Tochterzellen hervorgehen.

Der Zellzyklus läßt sich in mehrere funktionelle Phasen einteilen: die G1-Phase, in der RNA synthetisiert wird, aber keine DNA-Replikation stattfindet, die S-Phase mit DNA-Replikation und Zunahme der Zellmasse, die G2-Phase nach Abschluß der DNA-Replikation mit zwei diploiden Chromosomensätzen und die M- (Mitose-) Phase, in der das Chromatin zu Chromosomen kondensiert, Kernlamina und Kernmembran deassemblieren, Mitosespindeln ausgebildet werden und das Zytoskelett für die Zytokinese reorganisiert wird. In der Mitose werden die beiden diploiden Chromosomensätze voneinander getrennt, es bilden sich zwei Tochterkerne. Die Zytokinese vollendet die Zellteilung (zur Übersicht Lewin, 1994).

Die Motoren, die die Zelle durch die Phasen des Zellzyklus treiben, sind heterodimere Komplexe aus je einer katalytischen Untereinheit, einer Cyclin-abhängigen Proteinkinase, und einer regulatorischen Untereinheit, einem Cyclin. Ihre Aktivität wird durch Proteinphosphorylierung vor allem der katalytischen Untereinheit sowie durch regulierte Synthese und proteolytische Degradation, aber auch durch Kernimport der regulatorischen Untereinheiten gesteuert (Morgan, 1997). Während des Zellzyklus gibt es Kontrollpunkte ("checkpoints"), an denen über den Eintritt der Zelle in die S-Phase (G1/S-checkpoint, Beginn der DNA-Replikation) oder in die M-Phase (G2/M-checkpoint, Eintritt in die Mitose) entschieden wird. Vor allem in der frühen G1-Phase können extrazelluläre Signale in den Fortgang des Zellzyklus eingreifen und darüber entscheiden, ob eine neue Runde der DNA-Replikation eingeleitet wird (Lewin, 1994).

Auf die Mechanismen, die den jeweiligen "Zellzyklus-Motoren" das Signal geben, daß die Aktivierung zum Überschreiten der Kontrollpunkte erfolgen kann (z.B. Kontrolle der Vollständigkeit der DNA-Replikation, Kontrolle möglicher DNA-Schäden vor Eintritt in die Mitose, Kontrolle des Abschlusses der Mitose oder der Reassemblierung der Kernhülle vor Eintritt in die S-Phase), soll an dieser Stelle nicht detailliert eingegangen werden. Die Motoren, die das Überschreiten der G1/S-bzw. G2/M-Kontrollpunkte bewirken, haben (in Säugerzellen) als katalytische Untereinheiten p33^{Cdk2} bzw. p34^{cdc2} (Morgan, 1997). Diese Kinasen sind Prolin-gerichtet, ihre Phosphorylierungs-Konsensussequenz ist X-S/T-P-X-K/R (Songyang et al., 1994; X steht dabei für eine beliebige Aminosäure). Viele Proteine im Zellkern und in der Kernhülle weisen solche Phosphorylierungs-Konsensussequenzen auf.

1.2.2.2 Deassemblierung und Reassemblierung der Kernhülle

Kernhülle und Kernlamina werden zu Beginn der Mitose deassembliert (Gerace et al., 1980). Nach Beendigung der Mitose findet eine Reassemblierung der Kernhülle durch sequentielle Bindung membranständiger Kernhüllenproteine an die Chromosomen statt. Nach Bildung einer kontinuierlichen Kernmembran folgt eine Phase des Wachstums von Kernhülle und Kernlamina unter Kernimport von Laminen und Assemblierung der Kernlamina (zusammengefaßt bei Nigg, 1992; Marshall und Wilson, 1997).

Die Deassemblierung von Lamina und Kernhülle zu Beginn der Mitose wird durch Proteinphosphorylierung initiiert: gezeigt wurden die Depolymerisation von A-Typ-Lamin-

Polymeren durch Zellzyklus-abhängige Kinase p34^{cdc2} (Peter et al., 1990; Enoch et al., 1991) sowie von B-Typ-Laminen durch p34^{cdc2} (ebd.) und durch Proteinkinase C β II (Collas et al., 1997), ebenso die Aufhebung von Interaktionen zwischen den Laminen und dem Chromatin. Die Dephosphorylierung von Laminen ist eine der Voraussetzungen zur Reassemblierung der Kernhülle nach der Mitose. Eine wesentlich daran beteiligte Proteinphosphatase ist die Protein-Phosphatase 1 (Thompson et al., 1997).

Auch eine mitotische Phosphorylierung verschiedener Proteine des Kernporenkomplexes wurde beobachtet (Macaulay et al. 1995; Favreau et al., 1996). Dies spricht dafür, daß die Deassemblierung der Kernporenkomplexe in verschiedene Subkomplexe, die während der Mitose beobachtet werden können (McCaulay und Forbes, 1996; Matsuoka et al., 1999), in konzertierter Weise mit der Deassemblierung der anderen Bestandteile der Kernhülle gesteuert wird.

Zu Beginn der Mitose wird auch der Verlust von Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen der inneren Kernmembran und den Laminen und dem Chromatin von Phosphorylierungen der betreffenden Kernmembranproteine begleitet, wenn nicht induziert (z.B. Courvalin et al., 1992; Foisner und Gerace, 1993; Collas, 1999).

Für den Verbleib der Kernhüllenproteine gibt es zwei Modellvorstellungen: Eine geht davon aus, daß die Kernhüllenproteine auf verschiedene Populationen mitotischer Vesikel verteilt werden, die nach Abschluß der Mitose wieder sequentiell an die Chromosomen binden und die neue Kernhülle assemblieren. Das Modell wird dadurch gestützt, daß in Größe und Proteinzusammensetzung unterschiedliche mitotische Vesikel mit Kernhüllenproteinen beobachtet worden sind (Lourim und Krohne, 1993; Chaudhary und Courvalin, 1993; Collas und Poccia, 1996; Buendia und Courvalin, 1997), daß unterschiedliche Vesikel mit Kernhüllenproteinen wie dem Lamin-B-Rezeptor *in vitro* sequentiell an die Chromosomen binden können und daß es in Gegenwart des nichthydrolysierbaren GTP-Analogons GTP γ S wie bei bekannten anderen Modellen der Vesikelfusion nicht zur Ausbildung einer vollständigen Kernhülle kommt (Gant und Wilson, 1997). Die meisten Befunde dieser Art stammen aus zellfreien Kernassemblierungssystemen unter Verwendung von Extrakten aus *Xenopus laevis*-Oocyten (im Überblick bei Wilson und Wiese, 1996; Gant und Wilson, 1997). Das andere Modell besagt, daß Kernhüllenproteine während der Mitose diffus in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums verteilt sind. Dies wurde in Experimenten mit rekombinanten Fusionproteinen aus

Kernhüllenproteinen und dem Grünen Fluoreszierenden Protein (GFP) aus *Aequoria victoria* in lebenden Zellen beobachtet (Yang et al., 1997; Ellenberg et al., 1998).

1.3 Signaltransduktion und Kernmembran

In diesem Abschnitt soll dargestellt werden, was über in der Kernhülle lokalisierte Komponenten aus Signaltransduktionswegen bekannt ist. Biochemische Vorgänge, die während des Zellzyklus unabhängig von extrazellulären Signalen stattfinden, werden, abgesehen von der Rolle intranukleärer Protein-Tyrosinkinasen, von der Darstellung ausgespart.

1.3.1. Signaltransduktion zum Zellkern

Extrazelluläre Signale, z.B. vermittelt über die Bindung von Wachstumsfaktoren an ihre Rezeptoren in der Plasmamembran, die zu Änderungen der funktionellen Charakteristik in den Zielzellen führen (etwa in Richtung auf positive oder negative Regulierung der Proliferation oder der Differenzierung), können über die Kerntranslokation von Komponenten des Signalweges eine Veränderung intranukleärer Prozesse bewirken. Ein bekanntes Beispiel dafür ist die Veränderung der Genexpression infolge der Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren durch in den Kern translozierte Proteinkinasen, der ERKs (extracellular signal regulated kinases) oder infolge einer signalabhängigen Kerntranslokation von Transkriptionsfaktoren (JAK/STAT-Signalweg, NFκB, Steroidhormon-Rezeptoren). Die Kernhülle spielt nach heutigem Wissensstand dabei insofern eine Rolle, daß die translozierenden Proteine auf dem Weg von der Plasmamembran oder aus dem Zytosol zum Kerninneren die Kernporenkomplexe passieren müssen.

Neben diesen direkten Effekten auf die Transkription gibt es aber weitere durch extrazelluläre Signale regulierbare Phänomene, die eine differenziertere intranukleäre signalinduzierte Kommunikation erfordern oder die Existenz intranukleärer Signalkaskaden implizieren:

1. Transkriptionsfaktoren sind nicht die einzigen nukleären Substrate für in den Kern translozierte Proteinkinasen. Beispielsweise finden sich bei einigen Krebsarten, bei denen pathologische Veränderungen in intrazellulären Signalkaskaden auftreten, Strukturveränderungen in der Kernmatrix (Nickerson, 1998). Das RNA-Spleißen ist häufig infolge der Wirkung von

Wachstumsfaktoren verändert, signalabhängige Modifikationen erfolgen hier also posttranskriptionell.

2. Einige Proteinkinasen, z.B. Isoformen der Proteinkinase C, translozieren auf Signale hin auch innerhalb des Zellkerns, was eine differentielle Regulation von möglichen Effektorproteinen in verschiedenen Kern-Subkompartimenten nahelegt (Buchner, 1995; Buchner et al., 1997).

3. Die Zellzyklus-Regulation durch extrazelluläre Prozesse kann auch durch Cyclin-Import und andere transkriptionsunabhängige Prozesse erfolgen (Morgan, 1997).

4. Es können auch Signalproteine im Zellkern oder an dessen Hülle akkumuliert werden, die sekundäre Botenstoffe intranukleär generieren (D'Santos et al., 1998). Dazu kann auch die Translokation von Wachstumsfaktor- oder Hormonrezeptoren zur Kernhülle oder in den Zellkern gehören (Peters-Golden, 1998; Keresztes und Boonstra, 1998; Jans und Hassan, 1998).

5. Calcium kann im Zellkern freigesetzt werden (Santella und Carafoli, 1997).

1.3.2 Komponenten von Signaltransduktionswegen in der Kernhülle

Was ist über Elemente von Signaltransduktionskaskaden an oder in der Kernhülle bekannt ?

Im Folgenden sollen Aspekte nukleärer Signaltransduktion näher betrachtet werden, die eine Einbeziehung der Kernhülle implizieren oder zumindest einschließen könnten, wie nukleäre Lipid-Signale oder die Generierung eines intranukleären Calcium-Signals. Danach werden im Hinblick auf die Fragestellung der vorliegenden Arbeit Befunde über die möglichen Funktionen nukleärer Protein-Tyrosinkinasen aufgeführt.

1.3.2.1 Lipid-Signale in der Kernhülle und in der Kernmatrix

Verschiedene Enzyme aus Lipid-Signalwegen sind nicht nur an der Plasmamembran, sondern auch im Zellkern lokalisiert. Dazu gehören Lipidbotenstoff-generierende Proteine wie Phospholipasen, PI₃-Kinase, Inositolpolyphosphat-1-Phosphatase und weitere mehr (im Überblick bei D'Santos et al., 1998). Die Proteine sind offenbar nicht nur mit der Kernmembran assoziiert: Nach Detergenzextraktion von Kernen wurde vielfach eine Assoziation dieser Proteine mit der Kernmatrix beobachtet. Darüberhinaus wurde gefunden, daß Lipide verschiedener Klassen, vor allem Phosphoinositide, ebenfalls intranukleär vorkommen. Im Fall von

Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat sowie der Phosphatidyl-Inositolphosphat-Kinasen, die den letzten Schritt der Synthese von PIP_2 katalysieren, wurde eine Kollokalisierung mit nukleären "speckles", an denen ansonsten Spleißfaktoren lokalisiert sind, beschrieben (Boronenkov et al., 1998). Signalinduziert durch Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) kommt es in Swiss 3T3-Fibroblasten nicht nur zur Kerntranslokation von Proteinkinase $C\alpha$, sondern auch zu einer Erhöhung der intranukleären Phospholipase-Aktivität und zu einem Anstieg der Konzentration von Diacylglycerol (DAG) (Dicheva et al., 1991; Neri et al., 1994). Neben DAG kann auch Phosphatidylglycerol aus der Kernmembran nukleäre Isoformen der PKC aktivieren (Murray und Fields, 1998). In PC 12- Zellen, die auf Nervenwachstumsfaktor- (NGF-) Stimulierung hin differenzieren, wurde eine Kerntranslokation der regulatorischen p85-Untereinheit der PI_3 -Kinase beobachtet (Neri et al., 1994). Verschiedene Phospholipasen wie PLD, PLC β 1 und PLC γ 1 wurden neben ihrer extranukleären Lokalisation auch als im Kern lokalisiert gefunden (zusammengefaßt bei D'Santos et al., 1998).

All diese Befunde legen nahe, daß es im Zellkern und – aufgrund der Beteiligung Lipid-metabolisierender Proteine, die an der Plasmamembran gut charakterisierte Rollen in Signaltransduktionskaskaden spielen – vermutlich in der Kernmembran Voraussetzungen zur Generierung sekundärer Botenstoffe gibt, die die Aktivität nukleärer Proteine modulieren könnten. Inositolphosphate könnten z.B. die Ionenkanäle von IP_3 -Rezeptoren in der Kernmembran (siehe nächster Abschnitt) öffnen, was einen Anstieg der intranukleären Ca^{2+} -Konzentration zur Folge hätte. Lipidbotenstoffe könnten nukleäre Proteinkinase C (PKC) aktivieren. Über nukleäre Isoformen der PKC ist bislang bekannt, daß sie eine Rolle bei der Progression oder beim Anhalten des Zellzyklus, vermutlich abhängig von Art der Zelle und der Isoform der Kinase (Buchner, 1995; Livneh et al., 1997), spielen. Außerdem ist ihre Aktivität bei der Deassemblierung der Kernhülle zur Mitose hin notwendig (Collas et al., 1997; Collas, 1999; siehe Abschn. 1.2.2). Allerdings ist davon auszugehen, daß längst nicht alle nukleären PKC-Substrate bekannt sind.

Elemente des Lipoxygenase-Stoffwechsels wurden in der Kernhülle gefunden, in einigen Fällen nach Translokation zur Kernhülle nach Kernimport der Proteine oder nach Translokation von im Nukleoplasma lokalisierten Proteinen. Dazu gehören die Phospholipase A_2 , die 5-Lipoxygenase und das 5-Lipoxygenase-aktivierende Enzym (FLAP, im Überblick bei Peters-Golden, 1998). Auch Prostaglandin-Rezeptoren wurden an der Kernhülle, unter anderem in der inneren Kernmembran, elektronenmikroskopisch lokalisiert (Bhattacharya et al., 1998; Bhattacharya et

al., 1999). Diese metabotropen Rezeptoren könnten ebenfalls die Bildung sekundärer Botenstoffe im Zellkern beeinflussen.

Auch wenn es sich bei einigen der zitierten Beobachtungen bislang um Einzelbefunde handelt, ist die Existenz von in der Kernhülle lokalisierten Komponenten von Signaltransduktionskaskaden wahrscheinlich.

1.3.2.2 Ca^{2+} im Zellkern

Trotz des Vorliegens einer umfangreichen Literatur über intranukleäre Ca^{2+} -Signale ist nach wie vor noch nicht geklärt, ob die Ca^{2+} -Konzentration im Zellkern unabhängig von der im Zytosol reguliert werden kann (siehe dazu Malviya und Rogue, 1998). Ungeachtet dessen sind zahlreiche Ca^{2+} -regulierte Prozesse in Zellkernen bekannt, u.a. eine Regulation der Funktion der Kernporen (z.B. bei Panté und Aebi, 1996) und Effekte auf die Aktivität von Transkriptionsfaktoren (zum Überblick Santella und Carafoli, 1997).

Da der Perinuklearraum kontinuierlich mit dem Lumen des Endoplasmatischen Retikulums ist und für die freie Diffusion von Ca^{2+} zwischen diesen beiden Kompartimenten keine Barriere existiert (Subramanian und Meyer, 1997), kommt der Perinuklearraum als Ca^{2+} -Speicher für intranukleäre Signale in Frage. Es ist mittlerweile allgemein akzeptiert, daß einige signalabhängig regulierte Proteine, die die Ca^{2+} -Homöostase zwischen intrazellulären Ca^{2+} -Speichern und Zytosol (und Nukleoplasma) steuern, in der inneren und in der äußeren Kernmembran vorkommen. Darunter sind eine Ca^{2+} -ATPase in der äußeren Kernmembran (Kulikova et al., 1982; Nicotera et al., 1989), sowie Inositoltrisphosphat- (IP_3 -) Rezeptoren und Ryanodinrezeptoren sowohl in der äußeren als auch in der inneren Kernmembran (Gerasimenko et al., 1995; Humbert et al., 1996). Über beide Rezeptortypen kann signalinduziert ein Ca^{2+} -Ausstrom aus intrazellulären Speichern erfolgen. Ca^{2+} -Transport zwischen Zytoplasma und Nukleoplasma kann auch über die Kernporen erfolgen (Panté und Aebi, 1996).

Bestandteil eines nukleären Ca^{2+} -Signals ist auch die Kerntranslokation von Ca^{2+} -bindenden Proteinen wie Calmodulin (Santella und Carafoli, 1997). Das Ca^{2+} -Signal kann beispielsweise durch Aktivierung von nukleärer CaMKinase IV zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors CREB führen. (Sheng et al. 1991; Matthews et al., 1994). Die Struktur des Kernporenkomplexes ist dynamisch in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration (Stoffler et al.,

1999), damit könnte der Im- und Export von Makromolekülen über die Kernporen einer Kontrolle durch die intranukleäre Ca^{2+} -Konzentration unterliegen. Potentielle Substrate für Ca^{2+} -abhängige Proteinkinasen in der Kernhülle sind bislang wenig untersucht.

Das Ca^{2+} -Signal könnte auch nukleäre "klassische" Isoformen der Proteinkinase C, die u.a. Lamine phosphorylieren kann (s. Abschn. 1.2.2.2), aktivieren.

1.3.3 Nukleäre Tyrosinkinasen

Protein-Tyrosinkinasen regulieren im Zellkern verschiedene Prozesse, aber nur in wenigen Fällen sind eindeutige Aktivitäts-Funktionsbeziehungen klar. Bei einigen Plasmamembran-ständigen Rezeptortyrosinkinasen wie Trk A (Nervenwachstumsfaktor-(NGF-) Rezeptor) oder dem Epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) wurde zwar beobachtet, daß eine Internalisierung in funktionellem Zustand und ein Transport in Richtung des Zellkörpers (für NGF/TrkA bei Neuronen) oder des Zellkerns (im Fall des EGFR oder auch des Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptors (FGFR)), stattfindet (Jans und Hassan, 1998; Keresztes und Boonstra, 1999). Welche intrazellulären Signale davon ausgehen, ist jedoch unklar. In einem Fall wurde die Rezeptortyrosinkinase Byk (identisch mit Sky/Tyro 3, Rezeptor für das growth arrest specific gene 6, Gas6, Ohashi et al., 1994; Ohashi et al., 1995) unter Anwendung der Elektronenmikroskopie in der Kernhülle gefunden (Kaji et al., 1996), andererseits ist sonst nur die Plasmamembran-Lokalisation dieser Rezeptortyrosinkinase bekannt.

Einschränkend ist anzumerken, daß es sich bei den meisten Befunden über die Anwesenheit von Rezeptortyrosinkinasen in der Kernhülle um Einzelbefunde handelt, die kaum in der sonstigen Literatur über die jeweiligen Rezeptoren aufgegriffen werden. Eine funktionelle Rolle dieser Proteine in oder an der Kernhülle scheint daher bislang nicht allgemein akzeptiert zu sein.

Darüberhinaus gibt es Onkoproteine als Fusionsproteine aus den Kinasedomänen von Rezeptortyrosinkinasen mit anderen Proteinen, z.B. mit dem Protein des Kernporenkomplexes Tpr (Mitchell und Cooper, 1992; Greco et al., 1997), die eventuell im Kern aktiv sein könnten.

Eindeutig im Zellkern identifiziert sind ausschließlich lösliche oder Membran-assoziierte Protein-Tyrosinkinasen wie Wee, c-Abl, Fer und Rak (zusammengefaßt bei Pendergast, 1996). Die Tyrosinkinase Wee inaktiviert den Komplex aus Cyclin B/Cdc2, der die Mitose initiiert, durch Phosphorylierung von Cdc2 an Tyr 15. Die Tyrosinkinase c-Abl, die an ihrem C-Terminus

myristoyliert ist und damit mit Membranen, DNA oder dem Zytoskelett assoziiert, pendelt zwischen Zytosol und Nukleoplasma hin und her (Taagepera et al., 1998). Neben einer Zellzyklus-abhängigen Aktivitätsregulation spielt c-Abl eine Rolle bei der Auslösung des nukleären Signals zur DNA-Reparatur nach einer Zellschädigung durch UV-oder ionisierende Strahlung. Im Kern kann sie die RNA-Polymerase II durch Phosphorylierung an deren C-terminaler Domäne aktivieren. Weitere Substrate, darunter die in DNA-Reparaturvorgänge involvierten Proteine Rad 51 und DNA-abhängige Proteinkinase, sowie Bindeproteine (zum Beispiel das Genprodukt des Tumorsuppressorgens p53) wurden ebenso identifiziert wie eine aktivierende Kinase (ATF; für eine neuere Übersicht der nukleären Funktion von c-Abl siehe Van Etten, 1999). Das einzige bekannte nukleäre Substrat für Fer ist der Transkriptionsfaktor TMF (Schwartz et al., 1998).

Es ist allerdings bislang kein Tyrosinkinasesubstrat in der Kernhülle eindeutig identifiziert worden. Der Versuch der Identifizierung solcher Tyrosinkinasesubstrate stand im Mittelpunkt der Experimente, die in der vorliegenden Arbeit dargestellt sind. Der proteinchemische Ansatz der funktionellen Proteomanalyse, dessen Anwendungsgebiet im folgenden Abschnitt aufgezeigt wird, erschien für die Untersuchung tyrosinphosphorylierter Proteine der Kernhülle als Strategie der Wahl.

1.4 Proteom-Untersuchungen zur Aufklärung funktioneller Zusammenhänge in Zellen auf Proteinebene

Der Begriff Proteom, der zunächst die Gesamtheit tatsächlich vorhandener Proteine in einem gegebenen System (z.B. in einer Säugerzelle oder in einem Mikroorganismus) als Komplementärbegriff zum Genom, der Gesamtheit der Erbinformation, beschreibt, wurde 1995 von Wasinger et al. eingeführt.

In den letzten Jahrzehnten haben DNA-Technologien den größten Anteil an der Identifizierung neuer Proteine, und sie haben darüberhinaus (durch die Möglichkeit der Herstellung rekombinanter Proteine) zur Gewinnung weitreichender Erkenntnisse über die Funktion und Regulation neuer Proteine beigetragen, wenn auch in vielen Fällen initial eine aufwendige Isolierung einer durch den Edman-Abbau sequenzierbaren Menge von endogenem Protein nötig war. Durch die Einführung der Polymerase-Kettenreaktion in Kombination mit der Etablierung von cDNA-Bibliotheken ist es zudem möglich geworden, bei einer extrem niedrigen Nachweisgrenze signalvermittelte Änderungen der Genexpression auf der Ebene der Boten-RNA nachzuweisen. Die Grenzen des Potentials von DNA-Technologien für die Charakterisierung von Proteinen liegen aber darin, daß funktionell kritische Vorgänge wie posttranslationale Modifikationen aufgrund der von der cDNA abgeleiteten Protein-Primärstruktur nicht oder nur auf der Basis eines "educated guess" vorhergesagt werden können. Dies gilt auch für posttranskriptionelle Modifikationen, die Regulation der subzellulären Lokalisierung von Proteinen und die Zusammensetzung von Multiproteinkomplexen. Für einzelne Komponenten eines Systems können zwar solche Aspekte mit rekombinanten Proteinen untersucht werden, aber direkte proteinchemische Analysen wären im Hinblick auf die Verhältnisse *in vivo* aussagekräftiger.

Auf der anderen Seite wurde es durch die Einführung massenspektrometrischer Methoden in die Proteinchemie möglich, zelluläre Strukturen und Prozesse auf der Ebene endogener Proteine auch weitgehend ohne aufwendige und für Artefakte anfällige Proteinisolierungsprozeduren zu untersuchen. Die wichtigsten Methoden dabei sind die Matrix-unterstützte Laserdesorption/ionisations-Massenspektrometrie (MALDI, Karas und Hillenkamp, 1988) sowie die Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS, Yamashita und Fenn, 1984).

Unterstützt wird dieses neue Potential der Proteinchemie durch das Anwachsen von Proteindatenbanken, vor allem auch durch den Fortschritt bei den Sequenzierungsprojekten zur Entschlüsselung der vollständigen DNA-Sequenz ganzer Organismen. Damit wird eine

Proteinidentifizierung mittels Massenspektrometrie auch mit einer Datenqualität unterhalb der Ebene der Identifizierung von langen Abfolgen von Aminosäuren möglich (Mann und Wilm, 1994; Shevchenko et al., 1996; im Überblick bei Lamond und Mann, 1997; Blackstock und Weir, 1999). Es gibt zunehmend Beispiele für die Identifizierung neuer Proteine allein aufgrund von auf massenspektrometrischen Daten beruhenden Datenbankrecherchen (z.B. im Falle des Spleißosoms: Neubauer et al., 1998), die darüberhinaus in ihrem subzellulären Zusammenhang beschrieben werden können.

Die am häufigsten verfolgte Proteom-Strategie versucht die möglichst vollständige Visualisierung aller Proteinkomponenten eines gegebenen Systems (einer Zelle, eines Gewebes, eines Mikroorganismus) mit Hilfe hochauflösender zweidimensionaler Gelelektrophorese (O'Farrell, 1975; Klose, 1975) mit anschließender massenspektrometrischer Identifizierung der Proteine (Shevchenko et al., 1996; Jungblut und Thiede, 1997), meist im Vergleich des Systems zwischen einem Kontrollzustand und beispielsweise einem pathologischen Zustand oder einem Zustand unter geänderten physiologischen Bedingungen.

Aufgrund verschiedener prinzipieller Nachteile dieser Strategie (schlechte Auftrennung von Membranproteinen, unvollständiges Einwandern der Proteine ins Gel, schlechte bis fehlende Detektion von Proteinen in niedriger Kopienzahl, Patton, 1998) gewinnt die Strategie, Proteine definierter subzellulärer Fraktionen hochauflösend aufzutrennen und zu identifizieren, zunehmend an Bedeutung. Mit dieser Strategie können Informationen über die subzelluläre Lokalisierung von Proteinen oder, im Fall der Identifizierung der Komponenten von Proteinkomplexen, Hinweise für eine funktionelle Rolle der Proteine gewonnen werden (für die Analyse nukleärer Multiproteinkomplexe: Neubauer et al. (1998); Siniosoglou et al. (1998)). Aufgrund dieses analytischen Potentials wird diese Strategie auch "funktionelle Proteom-Analyse" genannt (Patton, 1998; Blackstock und Weir, 1999).