

## 2. Ergebnisse

### 2.1. Expression verschiedener PKC $\alpha$ 's in Insektenzellen

In einem ersten Versuch sollten verschiedene PKC $\alpha$ -Proteine heterolog exprimiert und anschließend gereinigt werden. Das Fusionsprotein GFP-PKC $\alpha$  sollte später für einen *in vitro* Transporttest benutzt werden, während GST-His<sub>6</sub>-PKC $\alpha$  bei der Suche nach Interaktionspartnern bzw. *in vitro* Substraten von PKC $\alpha$  Verwendung finden kann.

Zunächst wurde versucht, funktionell aktive PKC $\alpha$  in *E. coli* herzustellen. Die Expression einer verkürzten PKC $\alpha$  (189-672) mit einem C-terminalen His<sub>6</sub>-Reinigungs-Tag erfolgte im *E. coli* Stamm M 15. Eine partielle Reinigung des Fusionsproteins wurde mit Hilfe einer Ni<sup>2+</sup>-Affinitätssäule durchgeführt. Obwohl die erfolgreiche Expression mittels SDS-Page und Western-Blot nachgewiesen wurde (Daten hier nicht gezeigt), konnte in einem Aktivitätstest keine katalytische Aktivität gefunden werden. Versuche das Fusionsprotein mittels Denaturierung mit Guanidiniumhydrochlorid und anschließender Renaturierung durch Dialyse bzw. durch Inkubation mit Retikulozytenlysat katalytisch aktiv zu machen, blieben erfolglos. Da das katalytisch inaktive Fusionsprotein für weitere Versuche ungeeignet war, wurde im folgenden ein eukaryontisches Expressionssystem - das Sf9-Insektenzellsystem - benutzt.

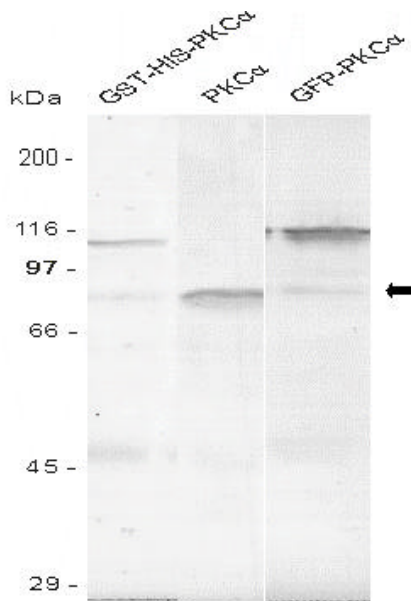
Zur Expression in Sf9-Insektenzellen wurden zunächst Baculo-Transfervektoren hergestellt, die die spätere Expression von PKC $\alpha$ , GST-His<sub>6</sub>-PKC $\alpha$  und GFP-PKC $\alpha$  ermöglichen sollten (Tabelle 1):

Tabelle 1: Baculotransfervektoren

Baculotransfektor	Protein
pVL1392+PKC $\alpha$	PKC $\alpha$
pAcGHLT-A+PKC $\alpha$	GST-His <sub>6</sub> -PKC $\alpha$
pVL1393+GFP-PKC $\alpha$	GFP-PKC $\alpha$

Die Baculo-Transfervektoren wurden zur Cotransfektion von Sf9-Insektenzellen mit linearisierter Baculovirus-DNA verwendet. Infizierte Zellen mit rekombinanter Baculovirus-DNA wurden als sogenannte Plaques (Zelltrümmer) isoliert und die Viruskonzentration durch drei Amplifikationsschritten erhöht. Nach dem zweiten Amplifikationsschritt wurde mittels Western-Blot die erfolgreiche Expression von PKC $\alpha$ , GST-His<sub>6</sub>-PKC $\alpha$  und GFP-PKC $\alpha$  nachge-

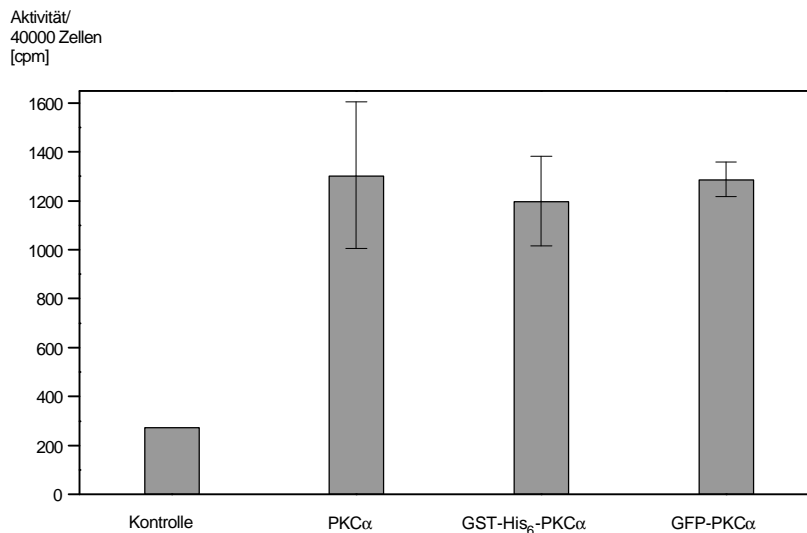
wiesen. Im Fall der Fusionsproteine ist zudem eine schwache Bande um 80 kDa, welche die endogene PKC $\alpha$  der Insektenzellen darstellt, sichtbar (Abb. 4, Pfeil).



**Abb. 4: Western Blot zum Nachweis der Expression verschiedener PKC $\alpha$ -Proteine in Sf9-Insektenzellen**

Pro Spur wurden ca. 40  $\mu$ g Zelllysate der mit rekombinanten Viren der zweiten Amplifikation infizierten Sf9-Insektenzellen aufgetragen, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit einem monoklonalen PKC $\alpha$ -Antikörper nachgewiesen. Endogene PKC $\alpha$  der Insektenzellen ist mit einem Pfeil markiert.

Der Vergleich der PKC-Aktivitäten von infizierten und nichtinfizierten Insektenzellen zeigt, daß katalytisch aktive PKC $\alpha$ -Proteine exprimiert wurden (Abb. 5). Dabei weisen die PKC $\alpha$ -Fusionsproteine GST-His<sub>6</sub>-PKC $\alpha$  und GFP-PKC $\alpha$  eine Aktivität auf, die sich nicht signifikant von der der PKC $\alpha$  unterscheidet. Daraus kann geschlossen werden, daß weder GFP noch GST-His<sub>6</sub> die katalytische Aktivität von PKC $\alpha$  beeinflussen.



**Abb. 5: Aktivitäten verschiedener PKC $\alpha$ -Proteine aus Sf9-Insektenzellen**

Pro Einzeltest wurden Zelllysate von 40000 Sf9-Insektenzellen benutzt. Für die PKC-Aktivitäten der Zelllysate wurden jeweils Dreifachwerte bestimmt. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichungen für PKC $\alpha$  (4 verschiedene Zelllysate), GST-His<sub>6</sub>-PKC $\alpha$  (5 verschiedene Zelllysate) und GFP-PKC $\alpha$  (5 verschiedene Zelllysate). Als Kontrolle wurden nichtinfizierte Zellen verwendet.

Nach dem letzten Amplifikationsschritt wurden die Virustiter der zweiten und dritten Amplifikation mit Hilfe eines Plaque-Assays bestimmt (Tab. 2).

Tabelle 2: Virustiter

<b>Virus (Protein)</b>	<b>2. Amplifikation</b>	<b>3. Amplifikation</b>
PKC $\alpha$	3,54x10 <sup>7</sup> pfu/ml	5,31x10 <sup>7</sup> pfu/ml
GST-His <sub>6</sub> -PKC $\alpha$	2,21x10 <sup>7</sup> pfu/ml	6,20x10 <sup>7</sup> pfu/ml
GFP-PKC $\alpha$	2,88x10 <sup>7</sup> pfu/ml	7,97x10 <sup>7</sup> pfu/ml

Durch Variation der Expressionszeit und des Virus/Zellzahl-Verhältnisses (*multiplicity of infection*, MOI) wurden die Parameter für eine maximale Expression katalytisch aktiver PKC $\alpha$ -Proteine ermittelt. Danach wurde eine maximale Expression innerhalb eines Zeitraums von 64 bis 72 h nach Infektion mit einem MOI-Wert von 7 bis 10 erzielt. Zur Expression von GFP-PKC $\alpha$  und GST-His<sub>6</sub>-PKC $\alpha$  wurden die Zellen deshalb mit einem MOI-Wert von 10 infiziert und nach 72 h geerntet. Die Reinigung erfolgte für GFP-PKC $\alpha$  in zwei Schritten mit einer Anionenaustauscher- und einer hydrophoben Interaktionssäule. GST-His<sub>6</sub>-PKC wurde durch Bindung des GST-Tags an Glutathion-Sepharose und anschließende Elution mit Glutathion isoliert. Die Reinheit der PKC-Fusionsproteine wurde mittels SDS-PAGE auf 50-90 % für GFP-PKC $\alpha$  und ca. 95 % für GST-His<sub>6</sub>-PKC $\alpha$  abgeschätzt. Ein PKC-Aktivitätstest mit dem Peptid GS als Substrat und Diacylglycerol und Phosphatidylserin als PKC-Aktivatoren ergab folgendes Ergebnis:

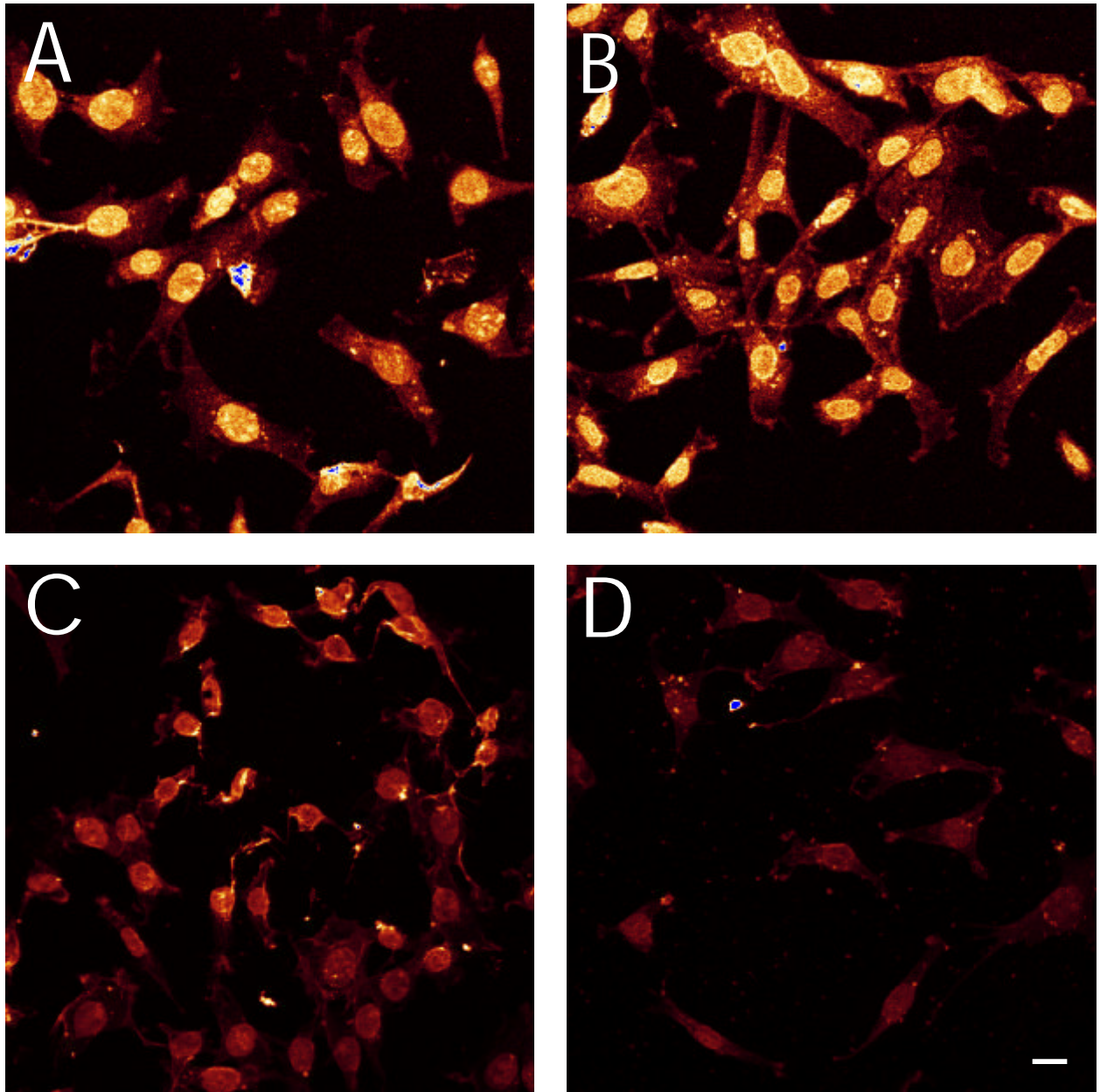
Tabelle 3: Spezifische PKC-Aktivitäten

<b>Protein</b>	<b>Aktivität [pmol/<math>\mu</math>g min]</b>
GFP-PKC $\alpha$	114
GST-His <sub>6</sub> -PKC $\alpha$	116
PKC aus Rinderhirn (Rosenberger)	419

## 2.2. *In vitro* Transporttest mit GFP-PKC $\alpha$

Zur Charakterisierung des PKC $\alpha$ -Kerntransports wurde das gereinigte GFP-PKC $\alpha$  aus Sf9-Insektenzellen in einem *in vitro* Transporttest nach Adam et al. (1990) verwendet. Zu Vergleichszwecken wurde BSA-NLS-TRITC (Schmalz, 1998) als ein "klassisches" Transportsubstrat benutzt. Der Kerntransport von GFP-PKC $\alpha$  verläuft im Gegensatz zu dem von BSA-NLS-TRITC (Daten nicht gezeigt) ohne zusätzliche Zugabe von Retikulozytenlysat oder eines Energie-regenerierenden Systems (Abb. 6A). Interessanterweise ist die Kernakkumulation von GFP-PKC $\alpha$  unabhängig von einer vorherigen PKC-Aktivierung mit PMA. Diese bewirkt zusätzlich eine Bewegung zur Plasmamembran, ohne daß sich die Intensität des Fluoreszenzsignals im Kern ändert (Abb. 6B).

Um den Einfluß von (unbekannten) PKC-Interaktionspartnern auf den Kerntransport von GFP-PKC $\alpha$  in permeabilisierten Zellen zu testen, wurde GFP-PKC $\alpha$  mit dem Cytosol-Ersatz Retikulozytenlysat präinkubiert. Überraschenderweise führte eine 5-minütige Präinkubation zu einer deutlichen Abschwächung des Fluoreszenzsignals im Kern (Abb. 6D). Die Präinkubation mit einer wesentlich größeren Proteinmenge BSA als Kontrolle für unspezifische Bindung von GFP-PKC $\alpha$  hat dagegen einen geringeren inhibitorischen Effekt auf die Kerntranslokation von GFP-PKC $\alpha$  (Abb. 6C).

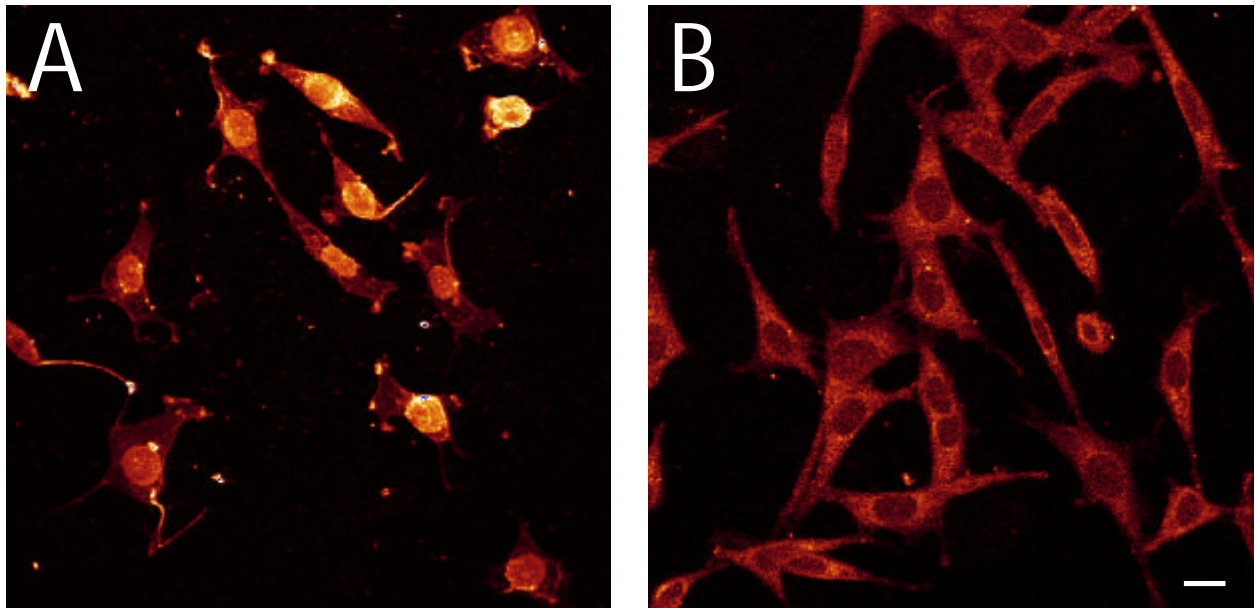


**Abb. 6: *In Vitro* Transporttest mit GFP-PKC $\alpha$  in Digitonin-permeabilisierten NIH 3T3-Fibroblasten**

Die Abbildungen zeigen mittels konfokaler Laser-Scanning-Mikroskopie detektierte GFP-PKC $\alpha$  nach Zugabe zu Digitonin-permeabilisierten NIH 3T3-Fibroblasten. GFP-PKC $\alpha$  akkumuliert bereits ohne den PKC-Aktivator PMA, ein Energie-regenerierendes System und den Cytosolersatz Retikulozytenlysat im Kern (A). PMA-Zugabe führt zusätzlich zu einer schwachen Translokation zur Plasmamembran (B). Präinkubation von GFP-PKC $\alpha$  mit Retikulozytenlysat bewirkt eine starke Abschwächung der Kernakkumulation (D versus A), während die Präinkubation mit BSA einen deutlich geringeren Effekt auf die Kernakkumulation ausübt (C versus A). Der Balken entspricht 10  $\mu$ m.

Um auszuschließen, daß es sich bei der Kerntranslokation von GFP-PKC $\alpha$  um simple Diffusion mit anschließender Retention im Kern handelt, wurde der Transporttest bei 0° C auf Eis durchgeführt. Während GFP-PKC $\alpha$  bei 25° C im Kern akkumulierte (Abb 7A), lag das Fusionspro-

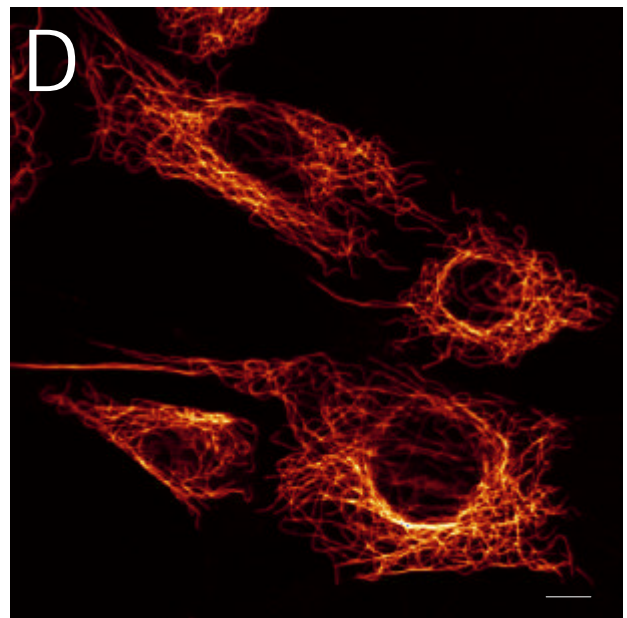
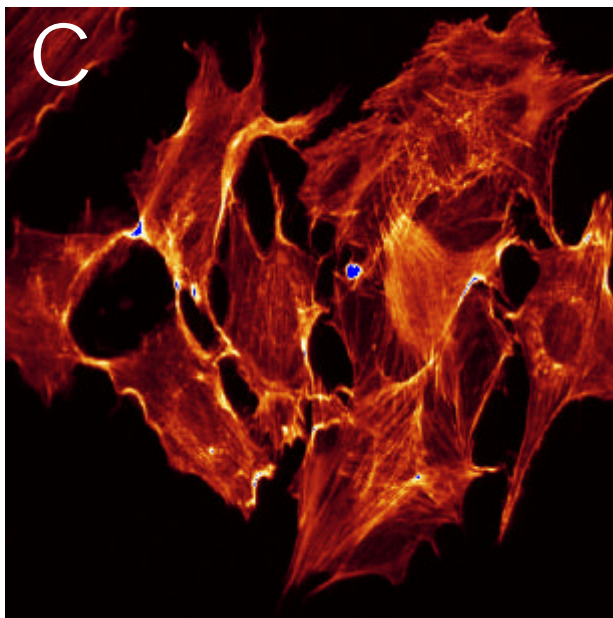
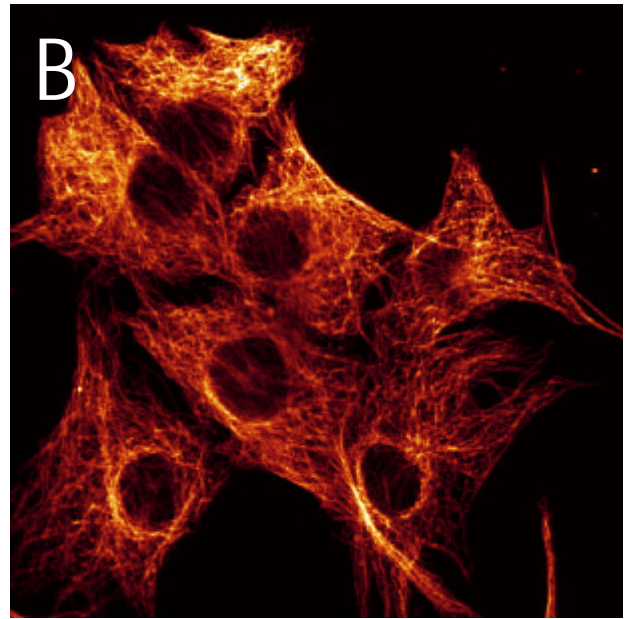
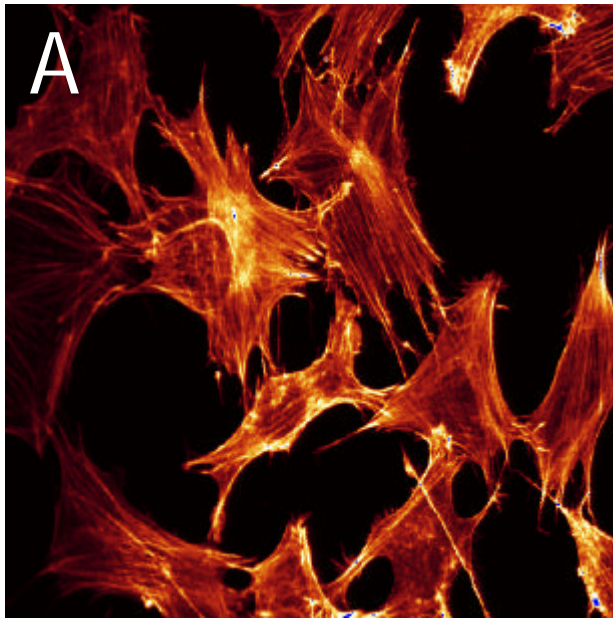
tein bei Inkubation auf Eis in geringer Konzentration perinucleär vor, und es erfolgte keine Kerntranslokation. (Abb 7B).



**Abb. 7: Temperaturabhängigkeit des Kerntransports von GFP-PKC $\alpha$  in Digitonin-permeabilisierten NIH 3T3-Fibroblasten**

GFP-PKC $\alpha$  akkumuliert bei 25° C in den Kernen permeabilisierter NIH 3T3-Fibroblasten (A), während die Inkubation auf Eis den Kerntransport verhindert (B). Der Balken entspricht 10  $\mu$ m.

Aus früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe ist bekannt, daß der Kerntransport von PKC $\alpha$  abhängig von einem intakten Cytoskelett ist (Schmalz et al, 1996). Um einen möglichen Effekt auf den Kerntransport von GFP-PKC $\alpha$  beim Permeabilisierungstest abschätzen zu können, wurde deshalb die Integrität des Cytoskeletts überprüft. Immunfluoreszenz-Markierungen der Aktin-Fasern und der Mikrotubuli zeigten die völlige Intaktheit des Cytoskeletts nach Permeabilisierung der Zellen (Abb. 8A,B). Die anschließende halbstündige Inkubation auf Eis führte zu einer Verringerung der Anzahl der Mikrotubuli, während die Aktin-Filamente unverändert blieben (Abb. 8C,D). Es erscheint jedoch wenig plausibel, die Reduzierung der Mikrotubuli für die Inhibition des Kerntransports von GFP-PKC $\alpha$  nach halbstündiger Inkubation auf Eis verantwortlich zu machen, da die immer noch vorhandenen Mikrotubuli zumindest eine partielle Kernakkumulation ermöglichen sollten.

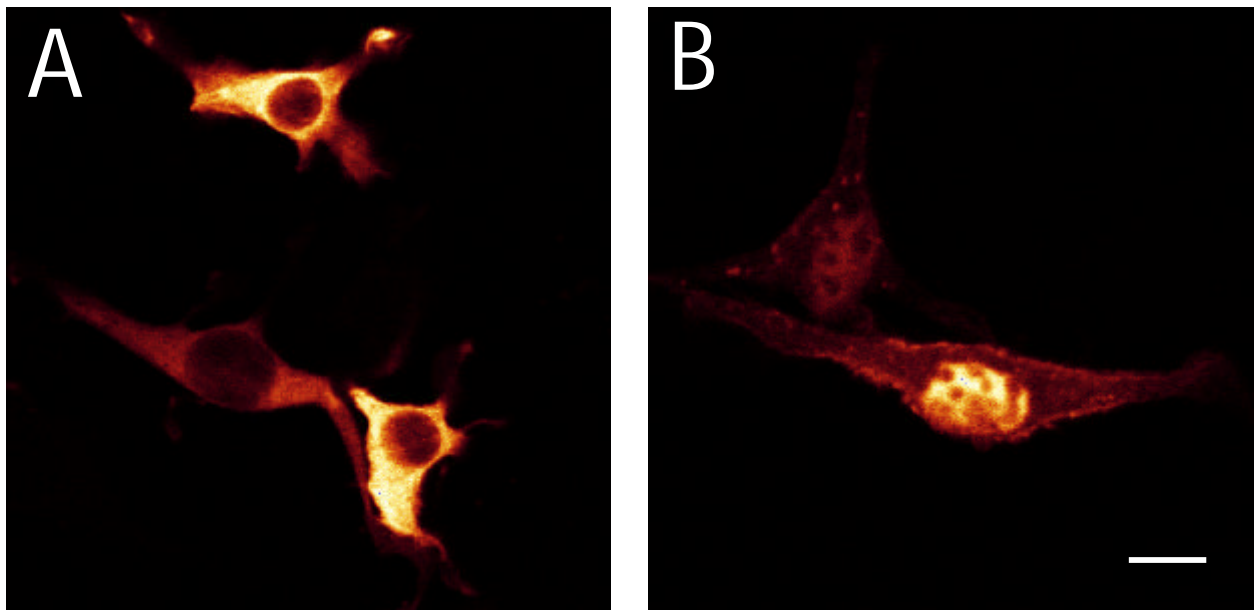


**Abb. 8: Einfluß von Permeabilisierung und halbstündiger Inkubation auf Eis auf das Cytoskelett von NIH 3T3-Fibroblasten**

Die Actin-Filamente werden weder durch Permeabilisierung (A) noch durch Inkubation auf Eis (C) beeinflusst. Im Gegensatz dazu bewirkt die Inkubation auf Eis eine Verringerung der Anzahl der Mikrotubuli (D) im Vergleich zu Zellen, die nur permeabilisiert wurden (B).

### 2.3. Digitonin-Permeabilisierung transfizierter NIH 3T3-Fibroblasten

Die Ergebnisse des *in vitro* Transporttests deuteten an, daß die Permeabilisierung an der Kerntranslokation von GFP-PKC $\alpha$  beteiligt sein könnte. Frühere Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe ergaben zudem, daß die Digitonin-Permeabilisierung von NIH 3T3-Fibroblasten zu einer starken Kernakkumulation von endogener PKC $\alpha$  führt (Schmalz, 1995). Um zu überprüfen, ob dies auch für GFP-PKC $\alpha$  gilt, wurde das Fusionsprotein GFP-PKC $\alpha$  nach Transfektion in NIH 3T3-Fibroblasten überexprimiert und die Zellen mit Digitonin permeabilisiert. Abb. 9B kann entnommen werden, daß in permeabilisierten Zellen, die GFP-PKC $\alpha$  überexprimieren, das Fusionsprotein stark im Kern angereichert ist. Daneben kann noch eine leichte Translokation zur Plasmamembran beobachtet werden. Im Gegensatz dazu führt eine bloße Inkubation in Transportpuffer auf Eis zu keiner Veränderung der subzellulären Verteilung von GFP-PKC $\alpha$ ; das Fusionsprotein verbleibt im Cytoplasma und die Kerne weisen kein GFP-PKC $\alpha$  auf (Abb. 9A). Somit ist die Permeabilisierung mit Digitonin offenbar hinreichend, eine Kerntranslokation von (GFP-) PKC $\alpha$  zu induzieren.



**Abb. 9: Digitonin-Permeabilisierung transfizierter NIH 3T3-Fibroblasten**

Die Digitonin-Permeabilisierung von GFP-PKC $\alpha$ -exprimierenden transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten auf Eis bewirkt eine Translokation zum Kern und in geringerer Konzentration zur Plasmamembran (B). Im Gegensatz dazu führt die Inkubation in Transportpuffer ohne Digitonin zu keiner Veränderung der cytoplasmatischen Lokalisation von GFP-PKC $\alpha$  (A). Der Balken entspricht 10  $\mu$ m.

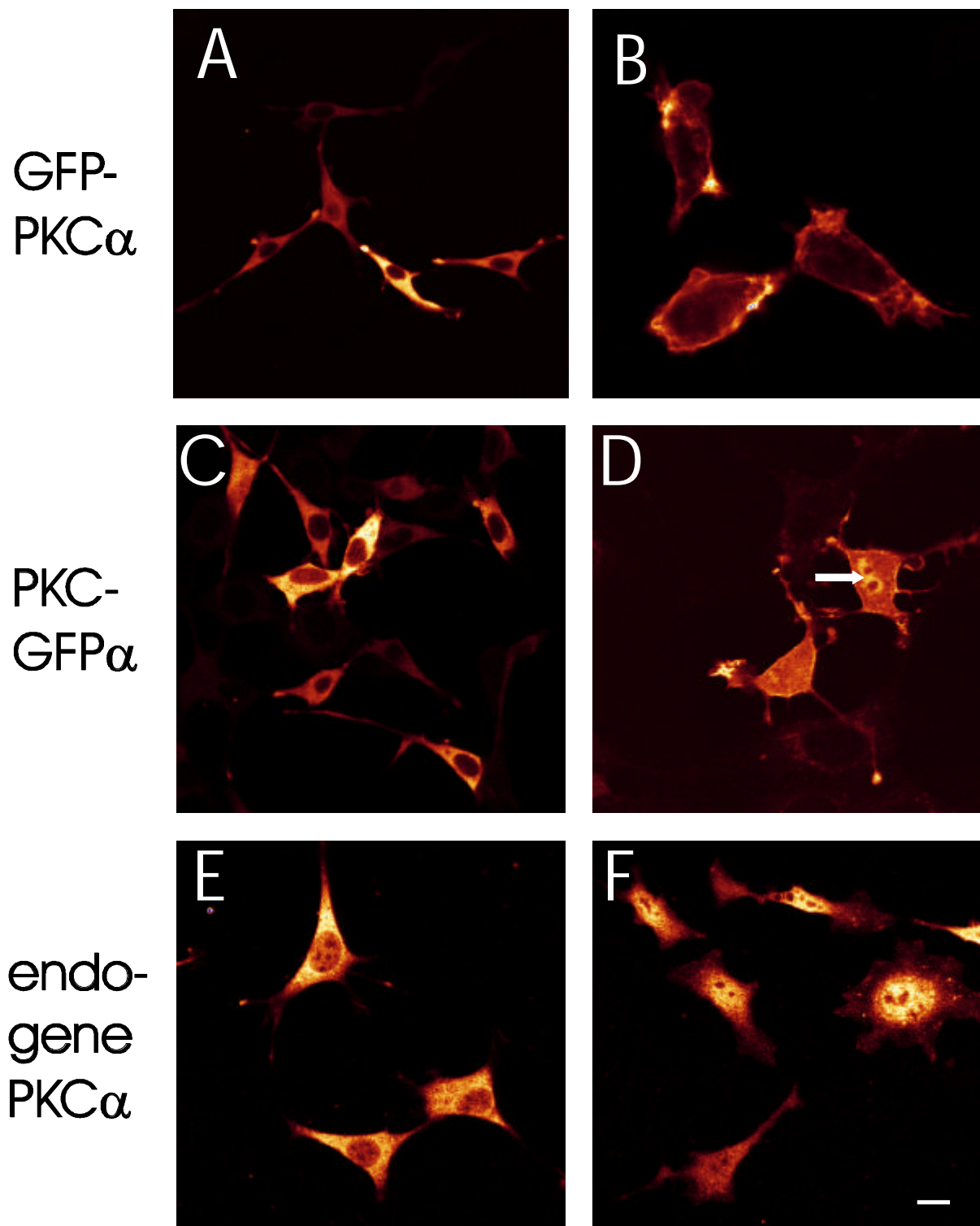


## 2.4. Subzelluläre Verteilung in transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten

### 2.4.1. GFP-PKC $\alpha$ und PKC $\alpha$ -GFP

Zur Untersuchung der subzellulären Verteilung von PKC $\alpha$  wurden NIH 3T3-Fibroblasten mit Plasmiden transfiziert, welche die codierenden DNA-Sequenzen für GFP-PKC $\alpha$ -Fusionsproteine enthielten. Die zu exprimierende DNA stand jeweils unter der Kontrolle eines Cytomegalovirus-Promoters, so daß eine starke konstitutive Expression der Fusionsproteine erzielt wurde.

Zunächst wurden die Zellen mit einem Plasmid transfiziert, das für das Fusionsprotein GFP-PKC $\alpha$  mit GFP am N-Terminus codiert. Abb. 10A zeigt, daß sich GFP-PKC $\alpha$  ohne PKC $\alpha$ -Aktivierung ausschließlich im Cytoplasma befindet, während der Zellkern kein Fusionsprotein enthält. Die Aktivierung von PKC mit dem Phorbolester PMA führt zu einer starken Translokation zur Plasmamembran (Abb. 10B). Die erwartete Translokation vom Cytoplasma zum Kern, die man nach Aktivierung bei endogener PKC $\alpha$  beobachtet (Abb. 6E, F) (Leach, 1989; Schmalz, 1995), war dagegen stark eingeschränkt. Um einen inhibierenden Einfluß der N-terminalen GFP-Fusionierung auf die Kerntranslokation ausschließen zu können, wurde das reverse Fusionsprotein PKC $\alpha$ -GFP mit GFP am C-Terminus verwendet. Es zeigte sich jedoch, daß auch PKC $\alpha$ -GFP unter nichtstimulierenden Bedingungen ausschließlich im Cytoplasma vorliegt (Abb. 10C) und nach PKC-Aktivierung mit PMA eine Translokation zur Plasmamembran (Abb. 10D) erfährt. Nur in wenigen Zellen (ca. 5 %) konnte zusätzlich zur Bewegung zur Plasmamembran eine Kerntranslokation von PKC $\alpha$ -GFP beobachtet werden (Abb. 10D, Pfeil). Immunfluoreszenz-Markierungen der Aktin-Fasern und der Mikrotubuli zeigten die Unversehrtheit des Cytoskeletts in transfizierten Zellen (Daten nicht gezeigt), so daß die verringerte Kerntranslokation nicht auf ein verändertes Cytoskelett zurückzuführen ist.



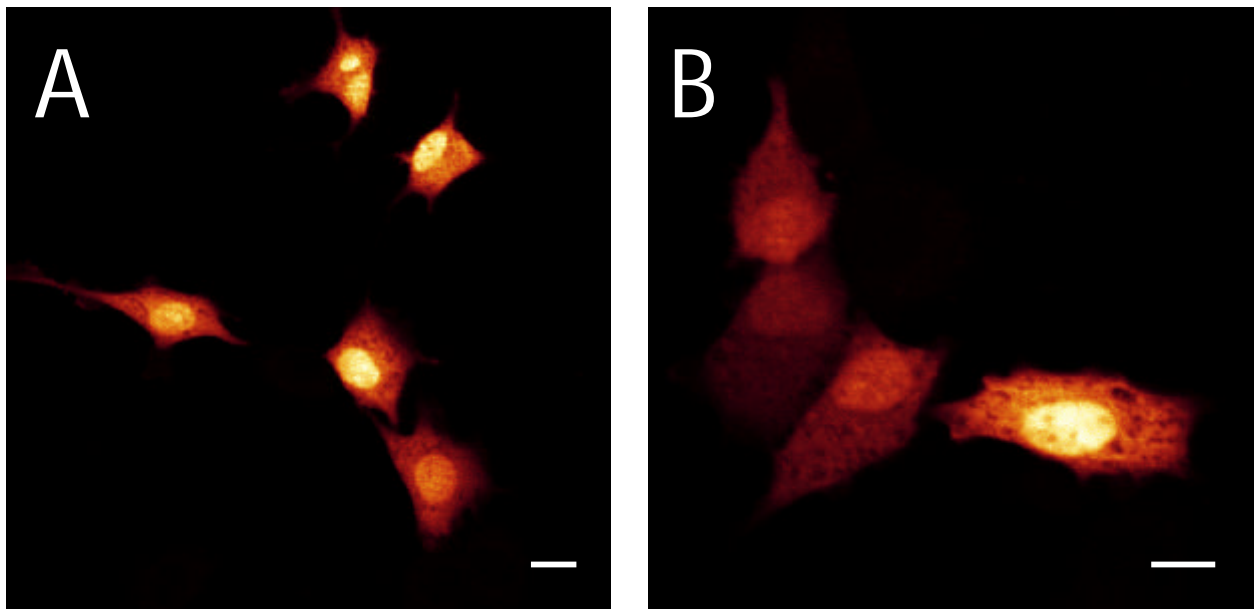
**Abb. 10: Lokalisation von GFP-PKC $\alpha$  und PKC $\alpha$ -GFP in transfizierten und endogener PKC $\alpha$  in nicht-transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten.**

Die Fusionsproteine GFP-PKC $\alpha$  (A, B) und PKC $\alpha$ -GFP (C, D) befinden sich in transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten zunächst im Cytoplasma (A, C) bevor sie nach PKC-Aktivierung mit PMA zur Plasmamembran translozieren (B, D). Bei PKC $\alpha$ -GFP erfolgt in ca. 5 % der Zellen auch eine Akkumulation im Kern (D, Pfeil). Die Abb. E und F zeigen endogene PKC $\alpha$ , die mittels Immunfluoreszenz mit einem monoklonalen Antikörper detektiert wurde. Die Aktivierung mit PMA bewirkt die Translokation der zunächst cytoplasmatisch vorliegenden PKC $\alpha$  (E) zum Kern (F). Der Balken entspricht 10  $\mu$ m.

### 2.4.2. Einfluß von GFP auf die PKC $\alpha$ -Translokation

Wie oben dargestellt, unterscheidet sich die subzelluläre Verteilung der GFP-PKC $\alpha$ -Fusionsproteine in transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten von der der endogenen PKC $\alpha$ . Zur Abschätzung des GFP-Anteils an dieser Veränderung wurde deshalb die Verteilung von GFP allein in transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten untersucht.

Abbildung 11 kann entnommen werden, daß GFP in der gesamten Zelle auftritt, jedoch insbesondere im Zellkern akkumuliert. Die Zugabe des PKC-Aktivators PMA bewirkt wie erwartet keine Veränderung in der subzellulären Verteilung von GFP (Abb. 11B). GFP per se hat also keine Affinität zur Plasmamembran und wirkt selbst nicht inhibierend auf eine Kerntranslokation, da es sich stark angereichert im Kern befindet.



**Abb. 11: Lokalisation von GFP in transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten**

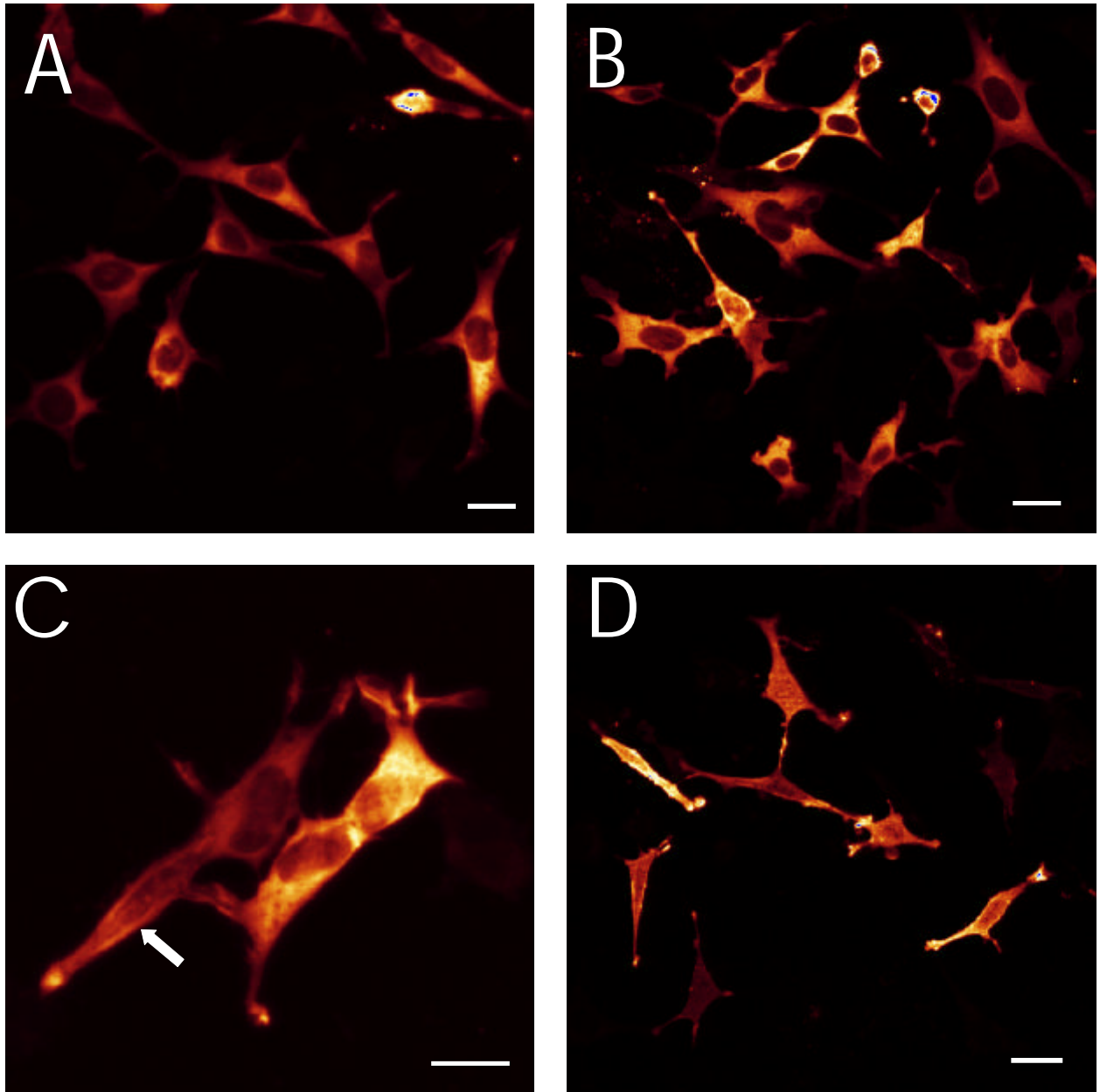
GFP liegt in transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten stark angereichert im Kern vor (A). Die Zugabe des PKC-Aktivators PMA verändert die subzelluläre Verteilung von GFP nicht (B). Die Balken entsprechen 10  $\mu$ m.

### 2.4.3. Einfluß von Punktmutationen in GFP-PKC $\alpha$ auf die subzelluläre Verteilung

Transfizierte Zellen mit GFP-PKC $\alpha$ -Fusionsproteinen enthalten aufgrund der Überexpression einen signifikanten Überschuß an PKC $\alpha$  verglichen mit nichttransfizierten Zellen. Um einen möglichen Einfluß des erhöhten PKC-Phosphorylierungspotentials in transfizierten Zellen auf die subzelluläre Verteilung zu untersuchen, wurde eine katalytisch inaktive PKC-Mutante verwendet. Dazu wurde innerhalb der katalytischen Domäne von PKC $\alpha$  das für die katalytische Aktivität essentielle Lysin<sub>368</sub> gegen Arginin (Ohno et al., 1990) ausgetauscht.

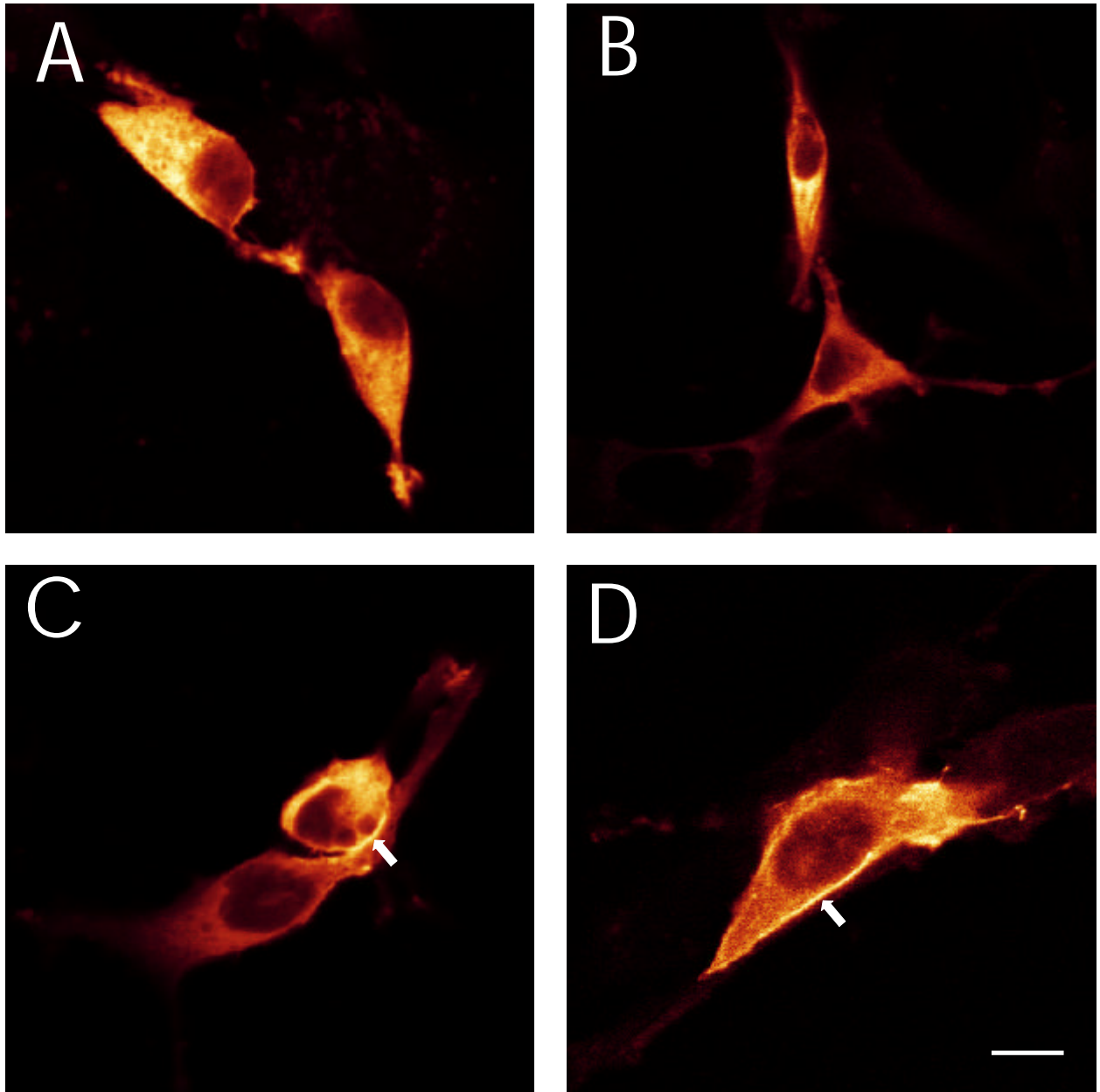
Überraschenderweise unterscheiden sich die Fusionsproteine GFP-PKC $\alpha$  (K368R) und PKC $\alpha$  (K368R)-GFP von ihren nichtmutierten Pendanten, besitzen sie doch eine erhöhte Affinität zur Membran. Die katalytisch inaktiven GFP-PKC $\alpha$  (K368R) und PKC $\alpha$  (K368R)-GFP befinden sich bereits ohne Zugabe von PMA in etwa 30 % der Zellen an der Plasmamembran, während in den restlichen Zellen die cytoplasmatische Lokalisation der nichtmutierten Fusionsproteine gleich (Abb. 12A und C; 13A und C). Noch deutlicher wird der Unterschied zwischen katalytisch inaktiven und aktiven GFP-PKC $\alpha$ -Fusionsproteinen nach PKC-Stimulation mit dem schwachen PKC-Aktivator Phorbol-12-Myristat-13-Acetat-4-O-Methyl-Ether (MPMA). Während die katalytisch aktiven Fusionsproteine ohne Veränderung vollständig im Cytoplasma verbleiben (Abb. 12B; 13B), translozieren GFP-PKC $\alpha$  (K368R) und PKC $\alpha$  (K368R)-GFP in fast allen Zellen zur Plasmamembran (Abb. 12D; 13D). Nach Zugabe des starken PKC-Aktivators PMA konnte dagegen kein Unterschied zwischen mutierten und nichtmutierten GFP-PKC $\alpha$ -Fusionsproteinen festgestellt werden; es erfolgte meist eine vollständige Bewegung zur Plasmamembran, während Akkumulation im Kern nur selten beobachtet wurde (Daten hier nicht gezeigt). Dies zeigt, daß die verstärkte Translokation von GFP-PKC $\alpha$  zur Plasmamembran nicht auf einer erhöhten Phosphorylierung von PKC $\alpha$ -Substraten beruht.

Ähnliche Ergebnisse wie für GFP-PKC $\alpha$  (K368R) und PKC $\alpha$  (K368R)-GFP wurden für die als konstitutiv aktiv beschriebene PKC-Mutante A25E (Ueberall et al, 1997) in Form von GFP-PKC $\alpha$  (A25E) erhalten. GFP-PKC $\alpha$  (A25E) befindet sich in transfizierten Zellen zunächst im Cytoplasma, wobei einige Zellen (ca. 15 %) bereits eine erhöhte Affinität zur Plasmamembran zeigen (Abb. 14A). Aktivierung mit MPMA bewirkt in ca. 50 % der Zellen eine Translokation zur Membran; die andere Hälfte der Zellen weist keine deutliche Veränderung im Vergleich mit unstimulierten Zellen auf (Abb. 14B). Die Zugabe von PMA ergibt schließlich wie bei allen anderen GFP-PKC $\alpha$ -Fusionsproteinen eine vorrangige Membrantranslokation (Daten hier nicht gezeigt).



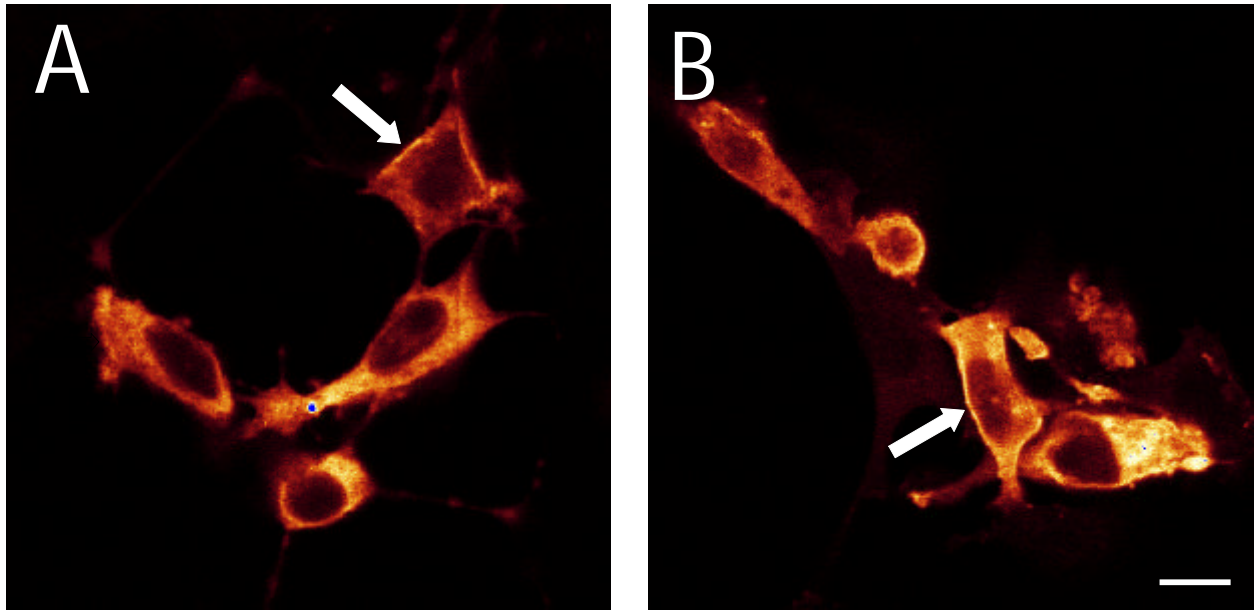
**Abb 12: Lokalisation von GFP-PKC $\alpha$  und GFP-PKC $\alpha$  (K368R) in transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten**

Das katalytisch inaktive Fusionsprotein GFP-PKC $\alpha$  (K368R) befindet sich bereits im unstimulierten Zustand im Gegensatz zum ausschließlich cytoplasmatisch vorliegenden GFP-PKC $\alpha$  (A) verstärkt an der Plasmamembran (C). Die Zugabe des schwachen PKC-Aktivators MPMA induziert bei der katalytisch inaktiven GFP-PKC $\alpha$  (K368R) eine weitgehende Translokation zur Plasmamembran (D), während GFP-PKC $\alpha$  im Cytoplasma verbleibt (B). Die Balken entsprechen 10  $\mu$ m.



**Abb 13: Vergleich der Lokalisation von PKC $\alpha$ -GFP und PKC $\alpha$ -GFP (K368R) in transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten**

Das katalytisch inaktive Fusionsprotein PKC $\alpha$  (K368R)-GFP befindet sich bereits im unstimulierten Zustand im Gegensatz zum ausschließlich cytoplasmatisch vorliegenden PKC $\alpha$ -GFP (A) verstärkt an der Plasmamembran (C, Pfeil). Die Zugabe des schwachen PKC-Aktivators MPMA induziert bei der katalytisch inaktiven PKC $\alpha$  (K368R)-GFP eine weitgehende Translokation zur Plasmamembran (D, Pfeil), während PKC $\alpha$ -GFP weiterhin im Cytoplasma verbleibt (B). Der Balken entspricht 10  $\mu$ m.



**Abb 14: Lokalisation von GFP-PKC $\alpha$  (A25E) in transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten**

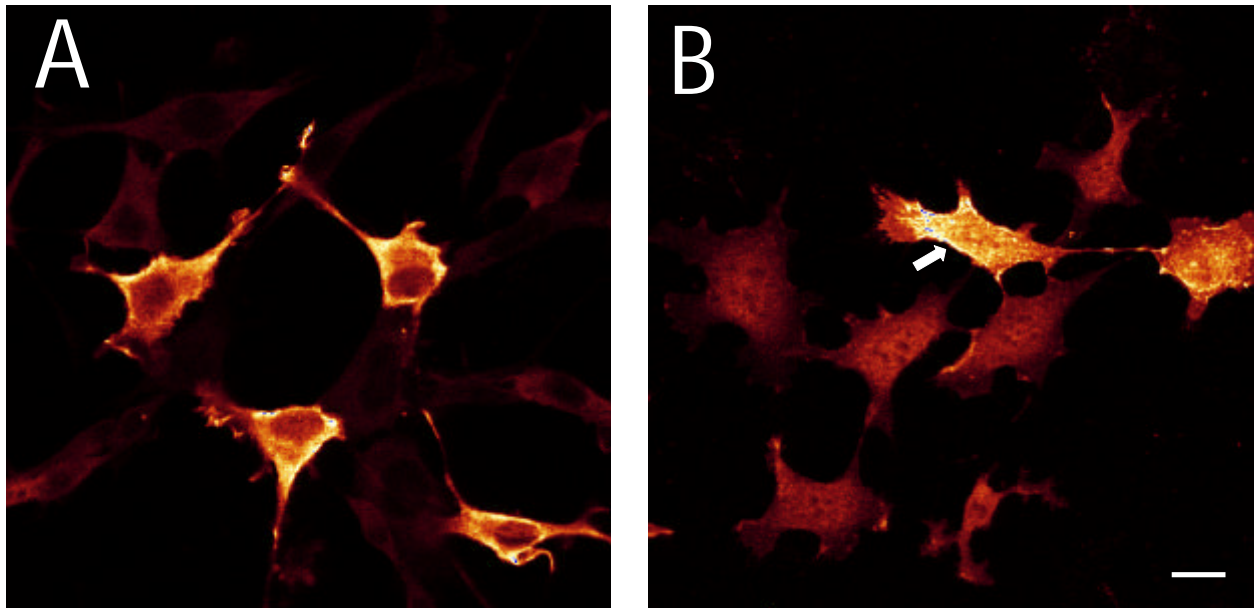
Das Fusionsprotein GFP-PKC $\alpha$  (A25E) mit erhöhter PKC-Aktivität liegt verglichen mit nichtmutierter GFP-PKC $\alpha$  (siehe Abb. 10A) verstärkt an der Plasmamembran vor (A, Pfeil). Die Zugabe des schwachen PKC-Aktivators MPMA bewirkt bei etwa der Hälfte der Zellen eine Translokation zur Plasmamembran (B, Pfeile). Der Balken entspricht 10  $\mu$ m.

#### 2.4.4. Einfluß der Überexpression auf die PKC $\alpha$ -Translokation

Die oben beschriebenen Ergebnisse mit GFP-PKC $\alpha$ -Fusionsproteinen in transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten zeigen einen deutlichen Unterschied zur subzellulären Verteilung endogener PKC $\alpha$  auf. Da dieser Unterschied bisher nicht eindeutig auf die GFP-Fusion zurückgeführt werden konnte, sollte im folgenden der Einfluß der Überexpression an sich untersucht werden. Zur Transfektion der Fibroblasten wurde der bicistronische Vektor pIRES-EGFP (Clontech) mit eingefügter PKC $\alpha$ -cDNA verwendet. Dieser Vektor ermöglicht die gleichzeitige Translation von GFP und PKC $\alpha$  als einzelne, voneinander getrennte Proteine ausgehend von einer bicistronischen mRNA. Der große Vorteil des Vektors liegt darin, daß transfizierte Zellen zunächst mit Hilfe der GFP-Fluoreszenz identifiziert und danach auf ihre PKC $\alpha$ -Lokalisation mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz untersucht werden können. Somit kann eindeutig zwischen nichttransfizierten Zellen, die ausschließlich endogene PKC $\alpha$  enthalten, und transfizierten Zellen mit zusätzlicher Vektor-codierter PKC $\alpha$  unterschieden werden.

Überexprimierte unstimulierte PKC $\alpha$  in transfizierten Zellen liegt zunächst genau wie die endogene PKC $\alpha$  in nichttransfizierten Zellen (mit schwächerer Fluoreszenz) ausschließlich im Cytoplasma vor (Abb. 15A). Aktivierung mit PMA führt dann zu einer starken Translokation

zur Plasmamembran (Abb. 15B, Pfeil) und häufig zur völligen Deformation der Zellmorphologie (Daten nicht gezeigt). In den meisten Zellen findet man überexprimierte PKC $\alpha$  auch in Cytoplasma und Kern, ohne daß man allerdings eine verstärkte Kernakkumulation wie bei endogener PKC $\alpha$  in nichttransfizierten Zellen beobachtet (Abb. 10F und Abb. 15B [Zellen mit schwächerer Fluoreszenzintensität]). Zellen mit überexprimierter PKC $\alpha$  weisen also ein verändertes Verteilungsmuster gegenüber nichttransfizierten Zellen mit endogener PKC $\alpha$  auf.



**Abb. 15: Vergleich der Lokalisation von überexprimierter PKC $\alpha$  in transfizierten und endogener PKC $\alpha$  in nichttransfizierten NIH 3T3-Fibroblasten**

Überexprimierte PKC $\alpha$  liegt in transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten genau wie endogene PKC $\alpha$  (mit schwächerer Fluoreszenz) in nichttransfizierten Zellen im Cytoplasma vor (A). PKC-Aktivierung mit PMA führt dann bei nichttransfizierten Zellen zu einer Kerntranslokation, während sich die überexprimierte PKC $\alpha$  in den transfizierten Zellen hauptsächlich an der Plasmamembran befindet (B, Pfeil). Der Balken entspricht 10  $\mu$ m.

#### **2.4.5. Eingrenzung der Kernlokalisationssequenzen von PKC $\alpha$ mit GFP-PKC $\alpha$ - Deletionsmutanten**

Die ausschließlich cytoplasmatische Lokalisation nichtstimulierter vollständiger PKC $\alpha$  legt eine intramolekulare Maskierung der Bereiche nahe, die Kerntranslokation vermitteln. Vermutlich ist die PMA-Aktivierung bei überexprimierter PKC $\alpha$  nicht geeignet diese intramolekulare Maskierung aufzuheben, da überexprimierte PKC $\alpha$  evtl. unvollständig prozessiert vorliegt (siehe Diskussion). Die Verwendung von Deletionsmutanten bietet eine gute Möglichkeit dieses



Problem zu überwinden und sollte die Bestimmung von solchen (dann unmaskierten) Bereichen von PKC $\alpha$  ermöglichen, die ohne Aktivierung mit PMA im Kern akkumulieren. Im Idealfall sollten so durch sukzessive Verkleinerung minimale, Kerntranslokation-vermittelnde Sequenzen bestimmt werden können. Zu beachten ist allerdings, daß Proteine mit einer Größe von weniger als 45 kDa frei durch die Kernhülle diffundieren können, so daß Kernakkumulation kein Beweis für einen aktiven Transportmechanismus ist, da ggf. nur eine Retention im Kern vorliegt.

Tabelle 4: Subzelluläre Verteilung von GFP-PKC $\alpha$ -Deletionsmutanten

		<b>subzelluläre Lokalisation</b>	
<b>Protein</b>	<b>Größe [kDa]</b>	<b>unstimuliert</b>	<b>+PMA</b>
GFP-47*- $\Delta$ PKC $\alpha$ (1-187)	52	Kern	KM + PM
$\Delta$ PKC $\alpha$ (1-187)-6*-GFP	48	ganze Zelle	PM
GFP-47*- $\Delta$ PKC $\alpha$ (1-252)	60	Kern	KM + PM
$\Delta$ PKC $\alpha$ (1-252)-7*-GFP	56	ganze Zelle	KM
GFP-12*- $\Delta$ PKC $\alpha$ (1-289)	60	ganze Zelle u. PM	KM + PM
$\Delta$ PKC $\alpha$ (1-289)-12*-GFP	60	ganze Zelle u. PM	KM + PM
GFP-47*- $\Delta$ PKC $\alpha$ (1-311)	66	PM	PM + KM
$\Delta$ PKC $\alpha$ (1-311)-6*-GFP	62	Cytoplasma	PM
GFP-14*- $\Delta$ PKC $\alpha$ (326-672)	66	Cytoplasma	Cytoplasma
$\Delta$ PKC $\alpha$ (342-672)-20*-GFP	65	Cytoplasma	Cytoplasma
$\Delta$ PKC $\alpha$ (1-660)-8*-GFP	104	Cytoplasma	PM + KM
NLS-27*- $\Delta$ PKC $\alpha$ (1-660)-8*-GFP	107	Kern	KM

KM - Kernmembran

PM - Plasmamembran

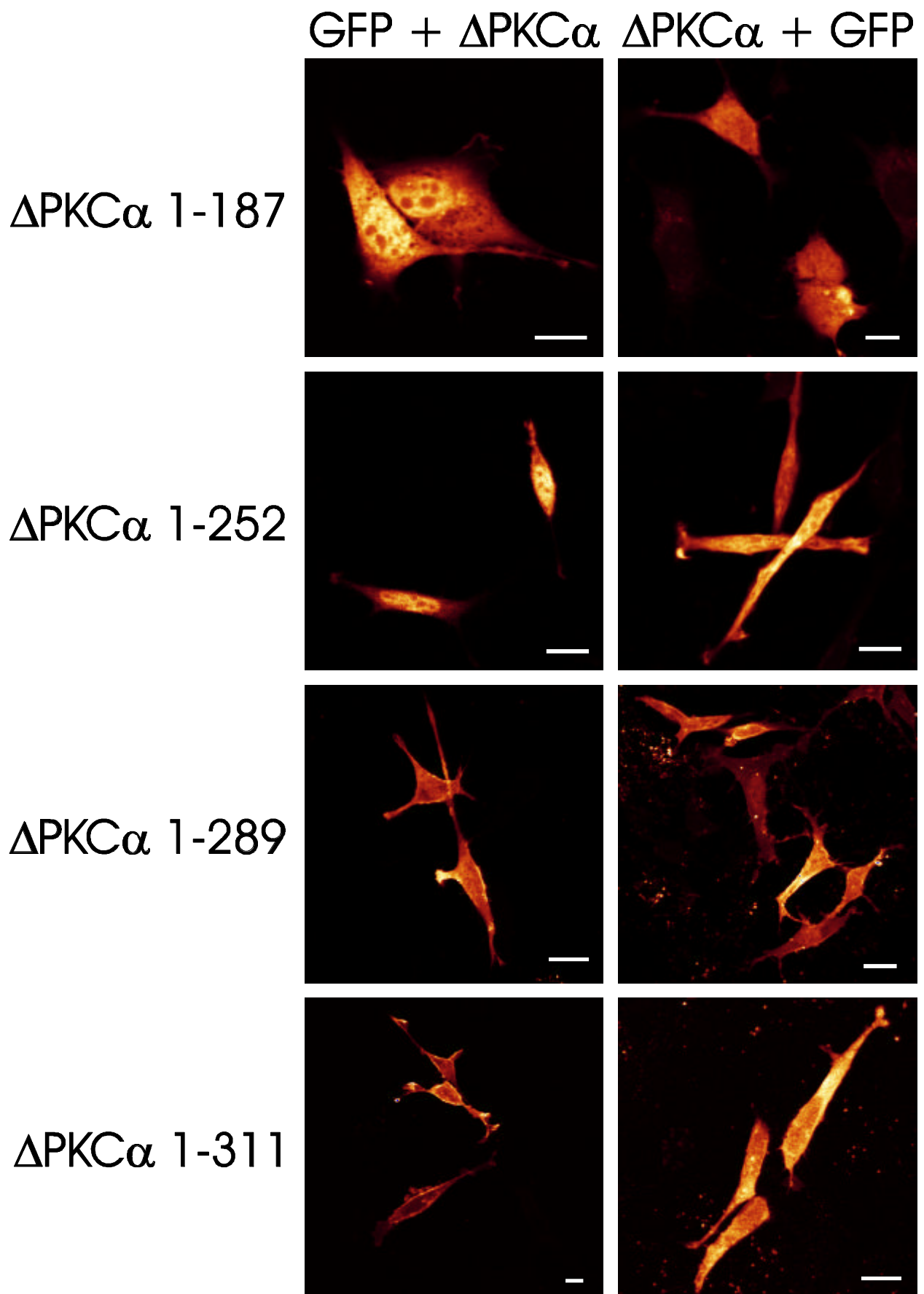
\* Anzahl der unspezifischen AS, die als Linker zwischen GFP und PKC bzw. dem NLS liegen.

Die subzelluläre Verteilung der GFP-PKC $\alpha$ -Deletionsmutanten vor und nach Aktivierung mit PMA ist in Tabelle 4 dargestellt. In der Regel wurden die PKC $\alpha$ -Deletionsmutanten einmal N- und einmal C-terminal mit GFP fusioniert. Es wurden vier verschiedene Deletionsmutanten mit verschiedenen Anteilen der regulatorischen Domäne (1-187; 1-252, 1-289; 1-311), jeweils eine

Deletionsmutante mit der katalytischen Domäne (326-672 bzw. 342-672) sowie eine Deletionsmutante mit deletierter V5-Region (1-660) verwendet.

Bei den N-terminal mit GFP fusionierten Deletionsmutanten 1-187 und 1-252 wurde eine starke Anreicherung im Kern beobachtet (Abb. 16). Interessanterweise führt die C-terminale GFP-Fusion an die gleichen Deletionsmutanten jedoch zu einer anderen subzellulären Verteilung; die Fusionsproteine befinden sich annähernd gleichverteilt sowohl im Cytoplasma als auch im Kern (Abb. 16). Für die Deletionsmutante 1-289 mit der gesamten regulatorischen Domäne konnte dagegen kein Unterschied in Abhängigkeit von der GFP-Fusion gefunden werden. Sie liegt annähernd gleichverteilt in der gesamten Zelle vor, wobei eine erhöhte Konzentration an der Plasmamembran auftritt (Abb. 16). Die beiden Deletionsmutanten 1-311 weisen unterschiedliche Verteilungen auf. Für die Deletionsmutante 1-311 mit dem N-terminalen GFP ist eine starke Konzentration an der Plasmamembran zu beobachten (Abb. 16), während das Pendant mit C-terminalen GFP vorrangig im Cytoplasma lokalisiert ist (Abb. 16). Die Zugabe von PMA bewirkt in allen Deletionsmutanten mit Anteilen der regulatorischen Domäne (1-187; 1-252, 1-289; 1-311) eine Bewegung zur Kern- und Plasmamembran (Abb. 17), was die hohe Membranaffinität der regulatorischen Domäne nach Phorbolsterbindung betont. Ausnahmen stellen  $\Delta$ PKC(1-187)-6-GFP und  $\Delta$ PKC(1-311)-6-GFP dar, bei denen lediglich eine Translokation zur Plasmamembran stattfindet (Abb. 17).

Die Deletionsmutanten mit der katalytischen Domäne (326-672 bzw. 342-672) befinden sich größtenteils im Cytoplasma der Zellen (Abb. 18A, B). Dies deutet an, daß die katalytische Domäne nicht direkt an der Kerntranslokation von PKC $\alpha$  beteiligt ist, wenngleich die Kerne im Gegensatz zu den Fusionsproteinen mit der gesamten PKC $\alpha$  (siehe Abb. 10A und C) nicht völlig leer sind und in einigen Zellen auch eine Gleichverteilung zwischen Cytoplasma und Kern auftritt. Die Zugabe von PMA ergibt wie erwartet keine Veränderung (Abb. 18C, D), da sich die entsprechende Bindungsstelle in der fehlenden regulatorischen Domäne befindet.



**Abb. 16: Lokalisation von GFP-PKC $\alpha$ -Deletionsmutanten der regulatorische Domäne in transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten.**

Die Balken entsprechen 10  $\mu$ m.

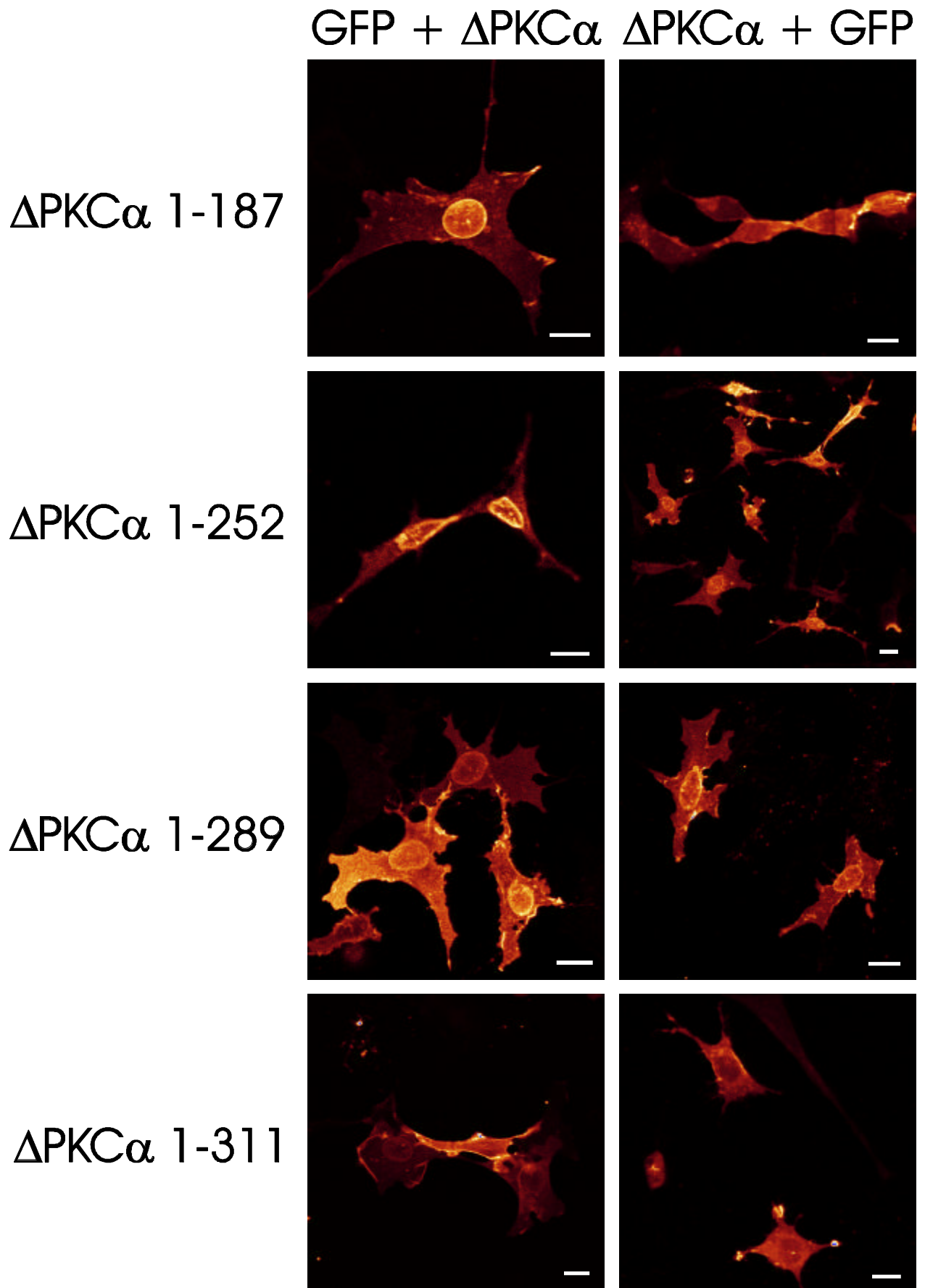
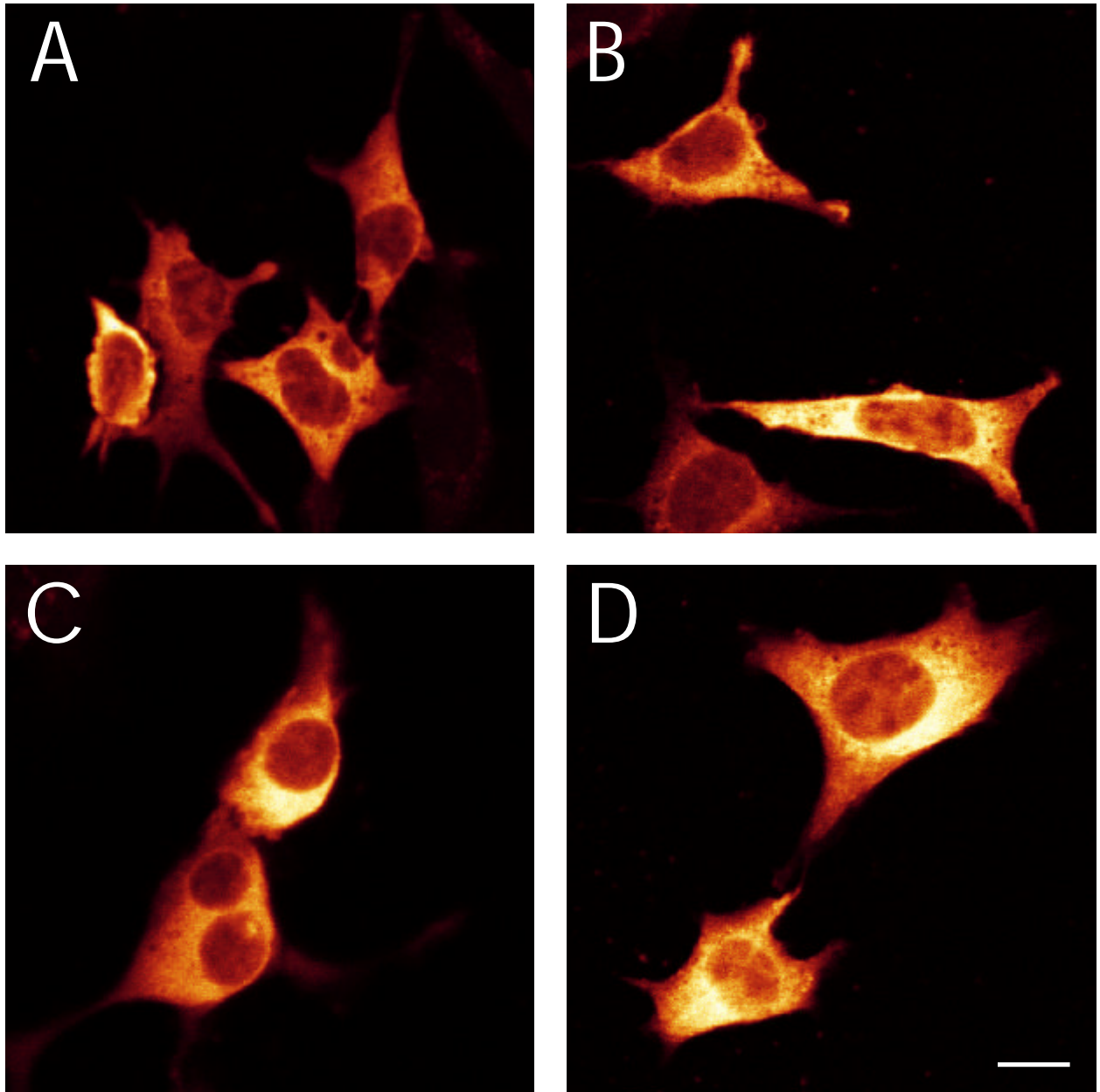


Abb. 17: Lokalisation von GFP-PKC $\alpha$ -Deletionsmutanten der regulatorischen Domäne in transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten nach PMA-Aktivierung.

Die Balken entsprechen 10  $\mu$ m.

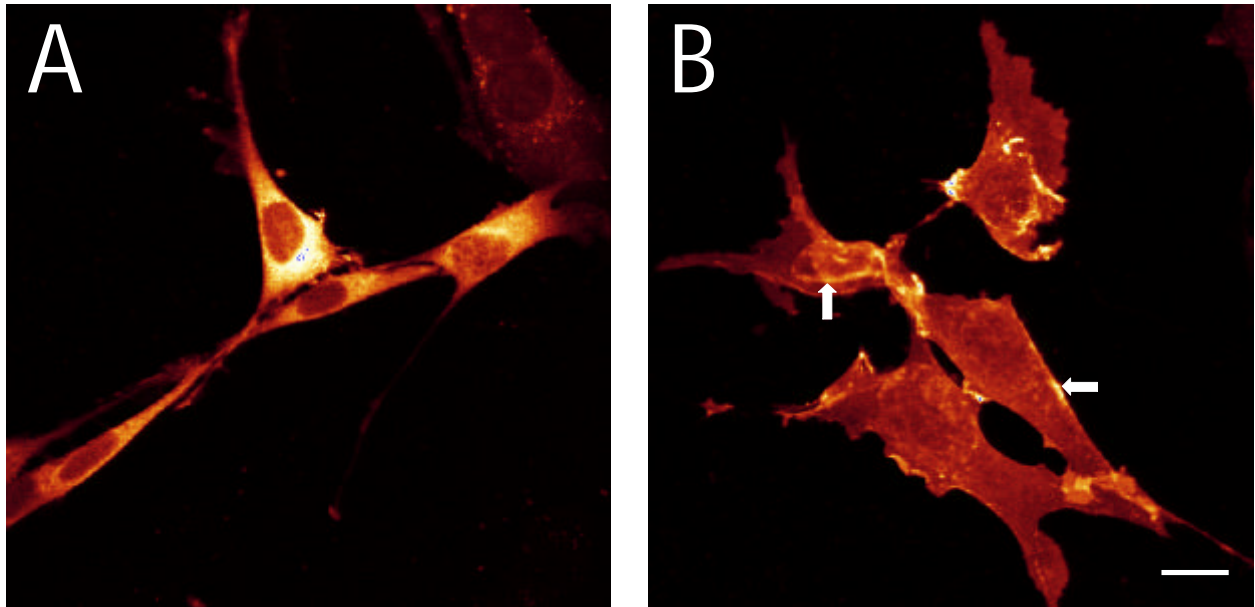


**Abb. 18: Lokalisation der GFP-fusionierten katalytischen Domäne von PKC $\alpha$  in transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten**

GFP-PKC $\alpha$  (326-672) (A, C) und PKC $\alpha$  (342-672)-GFP (B, D) liegen sowohl vor (A, B) als auch nach (C, D) Zugabe von PMA vorwiegend im Cytoplasma vor.

Konventionelle PKCs unterscheiden sich strukturell nur in den V-Regionen, so daß diese auch für Unterschiede in der subzellulären Lokalisation verantwortlich sein sollten. Besonders interessant scheint dabei die V5-Region am C-Terminus zu sein, die z. B. bei PKC $\beta$  Kerntranslokation in K562 Erythroleukämie-Zellen vermittelt (Gökmen & Fields, 1998). Um den Einfluß von V5 bei PKC $\alpha$  zu testen, wurde für die Transfektion ein Plasmid verwendet, welches das um zwölf Aminosäuren verkürzte  $\Delta$ PKC $\alpha$  (1-660)-GFP-Fusionsprotein generiert. Abb. 19 zeigt,

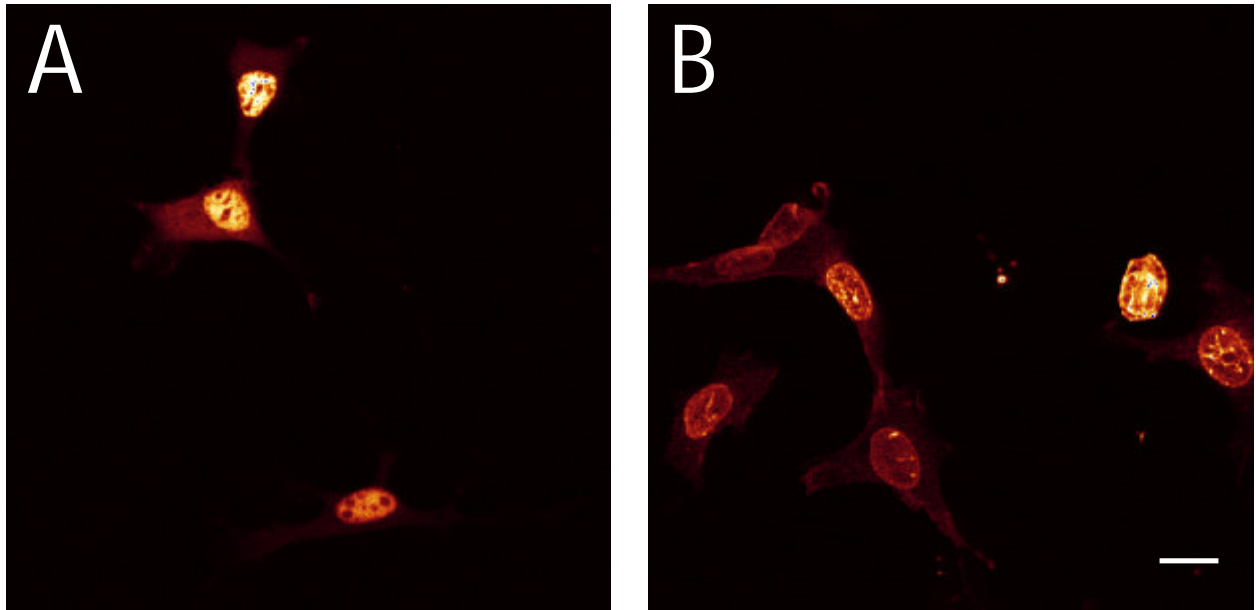
daß sich  $\Delta\text{PKC}\alpha$  (1-660)-GFP tatsächlich vom Fusionsprotein  $\text{PKC}\alpha$ -GFP mit der vollen  $\text{PKC}\alpha$ -Sequenz (Abb. 10C und D) unterscheidet.  $\Delta\text{PKC}\alpha$  (1-660)-GFP liegt zunächst ausschließlich im Cytoplasma vor (Abb. 19A). PMA-Aktivierung bewirkt dann neben der von  $\text{PKC}\alpha$ -GFP bekannten Translokation zur Plasmamembran auch eine Bewegung zur Kernmembran hin (Abb. 19B).



**Abb. 19: Lokalisation der V5-Deletionsmutante  $\text{PKC}\alpha$  (1-660)-GFP in transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten**

$\text{PKC}\alpha$  (1-660)-GFP befindet sich zunächst im Cytoplasma (A) und erfährt nach Zugabe von PMA eine Translokation zur Plasma- und Kernmembran (B, Pfeile). Der Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .

Die hohe Membranaffinität für PMA-aktivierte und GFP-fusionierte  $\text{PKC}\alpha$  zeigte sich in transfizierten Zellen auch für das Fusionsprotein NLS- $\Delta\text{PKC}\alpha$  (1-660)-GFP. Dieses Fusionsprotein sollte verwendet werden, um den Einfluß großer Mengen nichtaktivierter nucleärer  $\text{PKC}\alpha$  in transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten zu testen. Wie erwartet führt das N-terminale NLS zur Akkumulation des Fusionsproteins im Kern. Die hohe  $\text{PKC}\alpha$ -Konzentration im Kern bewirkt jedoch keine sichtbaren Veränderungen der Zellmorphologie (Abb. 20A). Nach PMA-Aktivierung des nucleären Fusionsproteins erfolgt eine Translokation zur Kernmembran hin, während die Konzentration im Innern des Kerns stark abnimmt (Abb. 20B).



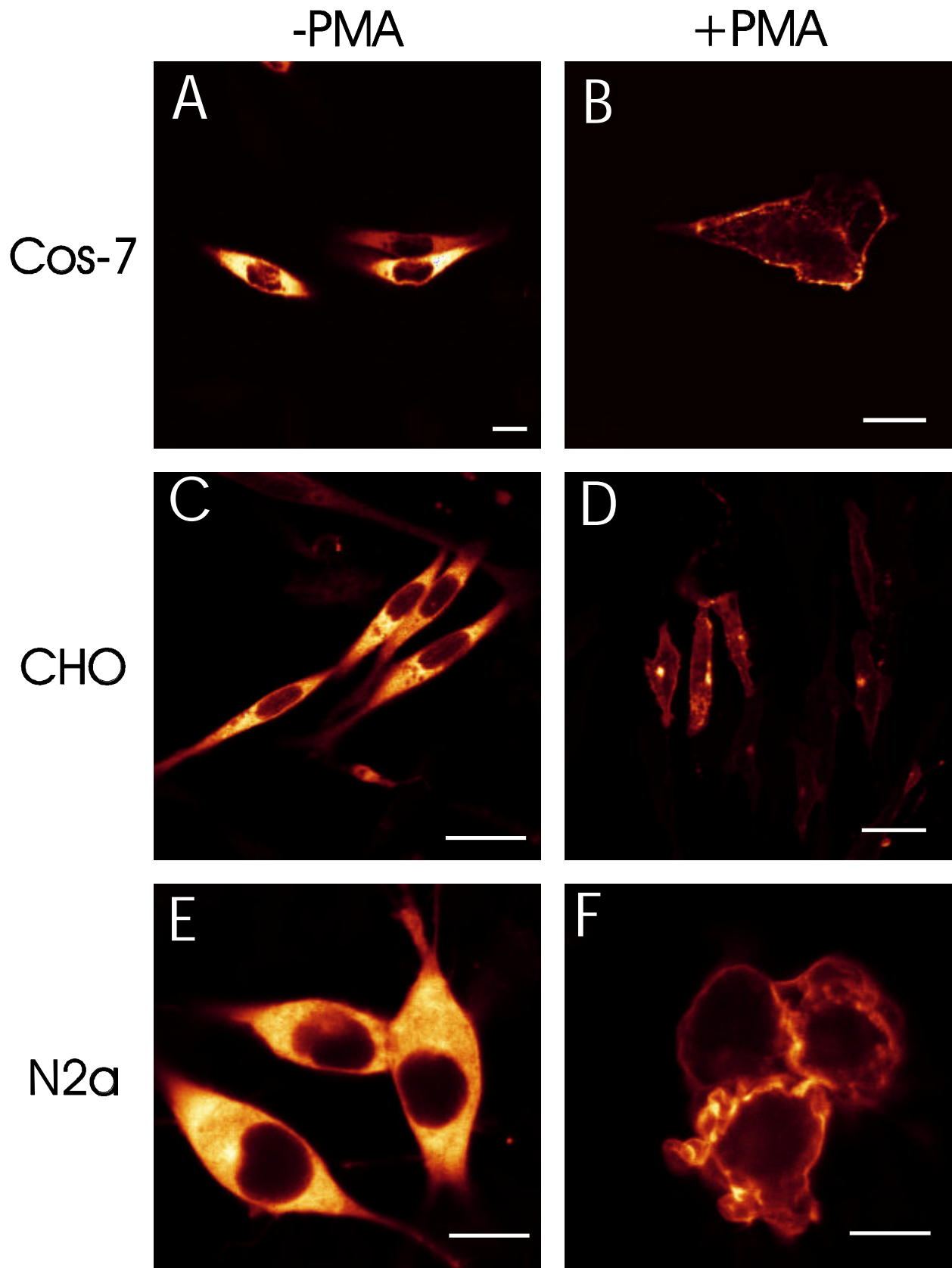
**Abb. 20: Lokalisation von NLS- $\Delta$ PKC $\alpha$  (1-660)-GFP in transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten**

NLS- $\Delta$ PKC $\alpha$  (1-660)-GFP liegt fast ausschließlich im Kern vor (A). PKC-Aktivierung mit PMA bewirkt eine Translokation zur Kernmembran (B). Der Balken entspricht 10  $\mu$ m.

## 2.5. Subzelluläre Verteilung von GFP-PKC $\alpha$ in transfizierten Cos-7-, CHO- und Neuro 2a-Zellen

Die unterschiedliche Lokalisation von PKC beschränkt sich nicht auf die verschiedenen Isozyme, sie ist häufig auch abhängig vom Gewebe oder Zelltyp. Zur Abschätzung des Einflusses verschiedener Zellen wurden deshalb neben den NIH 3T3-Fibroblasten auch Cos-7-, CHO- und Neuro 2a-Zellen mit dem GFP-PKC $\alpha$ -codierenden Plasmid transfiziert.

Es zeigte sich jedoch, daß sich für die zusätzlich zu NIH 3T3-Fibroblasten transfizierten Zellen kein gravierender Unterschied in der Verteilung ergibt. GFP-PKC $\alpha$  liegt zunächst vollständig im Cytoplasma vor (Abb. 21A, C, E), während die PKC-Aktivierung mit PMA zur Translokation zur Plasmamembran führt (Abb. 21B, D, F). Bei den Neuro 2a-Zellen tritt zusätzlich eine starke Deformation der Zellmorphologie und bei den CHO-Zellen häufig eine eng begrenzte perinucleäre Färbung auf. Es wurde jedoch auch in diesen Zellen nur selten Kerntranslokation beobachtet.



**Abb. 21: Lokalisation von GFP-PKC $\alpha$  in transfizierten Cos-7-, CHO- und Neuro 2a (N2a) -Zellen**

GFP-PKC $\alpha$  ist in transfizierten Cos-7- (A, B), CHO- (C, D) und Neuro 2a-Zellen (E, F) zunächst im Cytoplasma lokalisiert (A, C, E) bevor es nach Zugabe von PMA zur Plasmamembran transloziert (B, D, F). Bei den CHO-Zellen tritt zusätzlich eine perinucleäre Lokalisation auf (D). Die Balken entsprechen 10  $\mu$ m.