

3. Diskussion

3.1. Expression in Sf9-Insektenzellen

Im ersten Teil meiner Arbeit sollten verschiedene, PKC α -enthaltende Proteine exprimiert werden. Aus der Literatur sind bisher außer für PKC δ (Stempka et al, 1997) keine Befunde für die Expression katalytisch aktiver PKCs in *E. coli* bekannt. Versuche, PKC α oder die katalytische Domäne von PKC α in *E. coli* zu exprimieren, führten zu inaktiven Proteinen (Filipuzi et al, 1993; Dietrich et al., 1989). Trotzdem habe ich PKC α zunächst wegen der einfachen und schnellen Handbarkeit prokaryontischer Expressionssysteme in *E. coli* hergestellt und danach Versuche unternommen, das Protein katalytisch aktiv zu machen. Die anhaltende Inaktivität des Proteins ist vermutlich auf fehlende Phosphorylierung an den drei *in vivo*-Phosphorylierungsstellen innerhalb der katalytischen Domäne von PKC α zurückzuführen (Keränen et al., 1995). Kürzlich konnte gezeigt werden, daß die Aktivierung von PKC δ durch eine initiale Phosphorylierung durch die Kinase PDK1 (*Phosphoinositide dependent kinase 1*) erfolgt (Le Good et al., 1998). Wahrscheinlich verläuft auch die Aktivierung der konventionellen PKCs mit Hilfe von PDK1 (Le Good et al., 1998), so daß deren Inkubation mit bakteriell exprimierter PKC α zu einem aktiven Protein führen könnte. Andererseits kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß auch falsche Faltung (obwohl der gegen die katalytische Domäne gerichtete Antikörper bindet) die Inaktivität der PKC α aus *E. coli* bewirkt. Dagegen führte die bereits früher für PKC α (Burns et al., 1990) gezeigte Expression mit Hilfe des eukaryontischen Expressionssystems der Sf9-Insektenzellen wie erwartet zu katalytisch aktiver PKC α , GST-His $_6$ -PKC α und GFP-PKC α .

Die N-terminale Fusion von GST-His $_6$ bzw. GFP scheint die PKC α -Aktivität nicht bzw. nur sehr schwach zu stören, da sich die Aktivitäten der Fusionsproteine kaum von der der in den Insektenzellen exprimierten PKC α unterscheiden. Dies entspricht Untersuchungen von Sakai et al. (1997), die beim Vergleich von PKC γ und PKC γ -GFP nach Expression in Cos-7 Zellen zeigen konnten, daß GFP keinen Einfluß auf die Aktivität hat.

Die aus den Insektenzellen gereinigten Fusionsproteine GFP-PKC α und GST-His $_6$ -PKC α weisen im Aktivitätstest eine niedrigere PKC-Aktivität als die aus Rinderhirn gereinigte PKC (Rosenberger, 1997) auf. Es muß allerdings berücksichtigt werden, daß es sich um nicht völlig identische PKCs (Ratten-PKC α vs. Rinder-PKC α) und bei der aus Rinderhirn stammenden PKC zudem um ein Gemisch der drei konventionellen Isoformen α , β und γ handelt. Denkbar

wäre, daß der Aktivitätsunterschied zwischen GST-His₆-PKC α bzw. GFP-PKC α und PKC aus Rinderhirn auf einer fehlerhaften Prozessierung der in den Insektenzellen hergestellten PKC-Fusionsproteine beruht.

3.2. Digitonin-Permeabilisierung und Kerntransport

Die Methode der Permeabilisierung von Zellen erlaubte durch Fraktionierung von Cytosol unter anderem die Isolierung mehrerer essentieller Faktoren für den Kerntransport von Proteinen mit einem klassischen NLS. So sollte es theoretisch auch möglich sein, die für den Kerntransport von PKC α erforderlichen Proteine zu isolieren. Versuche von Dirk Schmalz aus unserer Arbeitsgruppe zeigten jedoch, daß bereits die Permeabilisierung von NIH 3T3-Fibroblasten zu einer Kerntranslokation von PKC α führt (Schmalz, 1995).

Meine Untersuchungen ergaben, daß nach Permeabilisierung mit Digitonin nicht nur die endogene, sondern auch die überexprimierte PKC α in Form des Fusionsproteins GFP-PKC α im Kern akkumuliert. Daneben wurde auch für das nach Permeabilisierung der Zellen zugegebene GFP-PKC α aus Insektenzellen eine starke Anreicherung im Kern beobachtet. Derzeit kann nicht völlig ausgeschlossen werden, daß auch die mittels Immunfluoreszenz gezeigte Verringerung der Anzahl der Mikrotubuli nach Inkubation auf Eis inhibierend auf den Kerntransport wirkt, da der Kerntransport von PKC α von einem intakten Cytoskelett abhängt (Schmalz et al., 1996). Allerdings sollte man dann erwarten, daß die verringerte Anzahl der Mikrotubuli auch nur eine Verringerung, nicht aber die beobachtete totale Blockierung der Kernakkumulation, nach sich ziehen sollte. Die stärkere Abschwächung des Kerntransports von GFP-PKC α nach Präinkubation mit dem Cytosol-Ersatz Retikulozytenlysat verglichen mit BSA deutet möglicherweise auf das Vorhandensein eines unbekanntem Retentionsfaktors hin, der das Fusionsprotein "festhält" und so Import in den Kern verhindert. Denkbar wäre, daß diese Bindung an PKC α ähnlich wie beim cytosolischen Ankerprotein I κ B an NF κ B erfolgt. Eine bloße unspezifische Bindung von GFP-PKC α kann dagegen weitgehend ausgeschlossen werden, da die Präinkubation mit BSA nur zu einer geringen Inhibition der Kerntranslokation von GFP-PKC α führt. Ferner ist ein schneller proteolytischer Abbau von GFP-PKC α während der Präinkubation mit Retikulozytenlysat wegen der Anwesenheit diverser Proteinaseinhibitoren unwahrscheinlich.

Über die Art der Induktion der Kerntranslokation von PKC α und GFP-PKC α durch Digitonin-Permeabilisierung kann derzeit nur spekuliert werden. Möglicherweise löst die Einlagerung von

Digitonin in die cholesterinreiche Plasmamembran eine Ablösung des unbekanntes Retentionsfaktors von PKC α bzw. GFP-PKC α aus, die dann in einer Kerntranslokation resultiert.

Bisherigen Annahmen zufolge sollte bei einer Permeabilisierung mit Digitonin die Kernhülle wegen des geringen Anteils an Cholesterin intakt bleiben. Dafür sprechen u. a. Untersuchungen von Dirk Schmalz aus unserem Labor, wonach fluoreszenzmarkiertes BSA nicht im Kern permeabilisierter NIH 3T3-Fibroblasten akkumuliert (Schmalz, 1995). Andererseits wurde kürzlich gezeigt, daß der Transportin-vermittelte Kerntransport von M9-enthaltenden Fusionsproteinen in permeabilisierten Zellen ohne die als essentiell betrachtete GTPase Ran und hydrolysierbare Nukleotidtriphosphate erfolgt (Englmaier et al., 1999, Ribbeck et al., 1999). Meines Erachtens kann nicht völlig ausgeschlossen werden, daß die Permeabilisierung Strukturveränderungen in der Kernhülle bewirkt, die dann Kerntranslokation ermöglichen.

3.3. Subzelluläre Verteilung von GFP-PKC α -Fusionsproteinen

Meine Untersuchungen zur Lokalisation von aktivierter GFP-PKC α bzw. PKC α -GFP in transient transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten weisen überraschenderweise auf einen deutlichen Unterschied zur endogenen PKC α hin. Während diese nach Aktivierung in den Kern transloziert und eine leicht erhöhte Affinität zur Plasmamembran aufweist (Leach et al., 1989; Schmalz et al., 1995), translozieren GFP-PKC α und PKC α -GFP größtenteils zur Plasmamembran, wobei nur in wenigen Zellen zusätzlich eine Akkumulation im Kern beobachtet wurde. Wie läßt sich diese Verschiebung vom Kern zur Plasmamembran erklären?

Ein direkter Einfluß vom GFP ist nicht wahrscheinlich, da das Protein selbst keine Affinität zur Plasmamembran hat und sogar entgegen einer vermuteten Gleichverteilung verstärkt im Kern auftritt. GFP in den PKC α -Fusionsproteinen müßte also eher aktivierend als inhibierend auf den Kerntransport wirken. Natürlich muß berücksichtigt werden, daß die Fusion mit GFP eventuell zu Veränderungen in der Struktur von PKC α führt, die wiederum den Kerntransport inhibieren können. Es erscheint allerdings wenig plausibel, daß GFP sowohl am N- als auch C-Terminus derartig strukturverändernd wirkt, daß jeweils dieselben für den Kerntransport relevanten Sequenzen betroffen sind. Meines Erachtens ist auch ein reiner sterischer Effekt, der den Transport der gegenüber endogener PKC α um ein Drittel größeren Fusionsproteine über die Kernhülle verhindert, unwahrscheinlich. So konnte z. B. gezeigt werden, daß die GFP-Fusion an den über 100 kDa großen Glucocorticoid-Rezeptor dessen Kernakkumulation nicht stört (Ogawa et al., 1995; Htun et al., 1996; Carey et al., 1996). Im Gegensatz dazu wird das gewöhnlich im Kern akkumulierende Don-Juan-Protein aus Spermien von *Drosophila melano-*

gaster nach Fusion mit GFP nicht mehr in den Kern transportiert (Santel et al, 1997 und persönliche Information von Renate Renkawitz-Pohl). Trotz dieser Parallele zu PKC α dürfte der Grund für den fehlenden Kerntransport dieses Proteins ein anderer sein. Das Don-Juan-Protein ist zunächst wegen seiner geringen Größe in der Lage, frei zwischen Cytoplasma und Kern zu diffundieren. Die Fusion mit GFP führt dann zu einem 56 kDa großen Protein, das somit vermutlich aufgrund seiner Größe vom Kern ausgeschlossen bleibt.

Beim Vergleich von endogener PKC α und Plasmid-codierter PKC α in Form von GFP-Fusionsproteinen muß berücksichtigt werden, daß die GFP-PKC α -Fusionsproteine infolge ihrer Überexpression in weitaus höherer Konzentration vorliegen als endogene PKC α . Meine Ergebnisse mit den katalytisch inaktiven GFP-PKC α -Fusionsproteinen schließen eine von PKC α ausgehende Signalkaskade als Ursache für die veränderten subzellulären Verteilungen weitgehend aus, da Kerntranslokation weiterhin nur in sehr wenigen Zellen auftritt. Dagegen deuten die Versuche mit überexprimierter PKC α ohne GFP darauf hin, daß die Überexpression per se eine erhöhte Affinität zur Plasmamembran induziert und außerdem verstärkte Akkumulation im Kern verhindert.

Den vorliegenden Ergebnissen zufolge scheint also eher die Überexpression als die Fusion mit GFP zur Veränderung der PKC-Lokalisation vom Kern zur Plasmamembran beizutragen.

3.4. Subzelluläre Verteilung von GFP-PKC α -Punktmutanten

Meine Untersuchungen weisen darauf hin, daß sowohl die zu katalytisch inaktiver PKC α führende Mutation K368R (Ohno, 1990) als auch die erhöhte katalytische Aktivität erzeugende Mutation A25E (Pears et al., 1990) in der Pseudosubstrat-Region von PKC α zu gesteigerter Affinität zur Plasmamembran führen. Dafür spricht neben dem verstärkten Auftreten an der Plasmamembran im unstimulierten Zustand vor allem die bereits mit MPMA, dem schwachen Agonisten von PMA, induzierte Plasmamembran-Translokation. Im Gegensatz dazu bewirkt MPMA keine Veränderungen bei den katalytisch aktiven GFP-PKC α -Fusionsproteinen.

Nach einem weitverbreiteten Modell für die Aktivierung von PKC liegt im nichtaktivierten Protein zunächst eine Maskierung der katalytischen Domäne durch Bindung der Pseudosubstratregion vor (Pears und Parker, 1991). Durch Bindung von PKC-Aktivatoren wie Calcium, Diacylglycerol oder PMA wird eine Dissoziation von Pseudosubstratregion und katalytischer Domäne und damit eine Aktivierung des Proteins induziert. Für die PKC-Mutante A25E kann aus der gegenüber dem nichtmutierten Protein erhöhten Aktivität im unstimulierten Zustand (Pears et al., 1990) nach dem vorliegenden Modell somit von einer abgeschwächten Interaktion

zwischen der Pseudosubstraregion und katalytischer Domäne ausgegangen werden. Diese bewirkt eine Anreicherung an der Plasmamembran. Überträgt man das Modell auf die katalytisch inaktive Mutante K368R, so scheint auch die Veränderung in der katalytischen Domäne zu einer verminderten Wechselwirkung mit der Pseudosubstraregion und besserer Zugänglichkeit für MPMA mit nachfolgender Translokation zur Membran zu führen. Daneben ist es auch denkbar, daß die fehlende Autophosphorylierung der katalytisch inaktiven Mutante zur erhöhten Membrantranslokation beiträgt, wie kürzlich aus der fehlenden Dissoziation von der Plasmamembran bei einer katalytisch inaktiven PKC β II-Mutante gefolgert wurde (Feng und Hannun, 1998). Derzeit ist nicht klar, welcher Abschnitt innerhalb von PKC die Bindung an die Plasmamembran ermöglicht. Oancea und Meyer (1998a) postulieren nach Untersuchungen an GFP-PKC γ -Fusionsproteinen die V1-Region mit der Pseudosubstratsequenz als Plasmamembranbindungsstelle innerhalb von PKC. Danach soll die Bindung von V1 an die Plasmamembran erst nach dem Ablösen der Pseudosubstraregion von der katalytischen Domäne erfolgen. Ein ähnliches Szenario dürfte nach meinen vorliegenden Ergebnissen, insbesondere bei Berücksichtigung der starken Plasmamembran-Affinität der V1 enthaltenden GFP-PKC α -Deletionsmutanten, auch für PKC α wahrscheinlich sein.

3.5. Untersuchungen zu Kernlokalisationssequenzen von PKC α

Die Verwendung der GFP-Deletionsmutanten sollte es ermöglichen, die für den Kerntransport von PKC α wichtigen Bereiche innerhalb des Proteins zu ermitteln. Bisherige Untersuchungen (James & Olson, 1992; Eldar et al, 1992) deuteten auf eine Beteiligung der katalytischen Domäne. Allerdings konnte für die dabei verwendeten Deletionsmutanten aufgrund ihrer Größe von 30 bis 40 kDa eine bloße Diffusion durch die Kernhülle mit anschließender Retention im Kern nicht ausgeschlossen werden. Bei meinen Untersuchungen wiesen alle GFP-PKC α -Deletionsmutanten eine Mindestgröße von 48 kDa auf, so daß reine Diffusionseffekte unwahrscheinlich sind. Da sich GFP jedoch allein verstärkt im Kern anreichert und bei den meisten verwendeten Deletionsmutanten etwa die Hälfte der entsprechenden Fusionsproteine ausmacht, muß sein Anteil genau berücksichtigt werden. Meiner Meinung nach sind die Anreicherungen von GFP- Δ PKC α (1-187) und GFP- Δ PKC α (1-252) im Kern tatsächlich auf die PKC α -Sequenz und nicht auf GFP zurückzuführen. Wenn GFP in diesen Proteinen Kerntransport vermitteln würde, sollte es dies auch bei den umgekehrten Konstrukten Δ PKC α (1-187)-GFP und Δ PKC α (1-252)-GFP tun. Diese Proteine liegen jedoch trotz ihres Auftretens im

Kern dort nicht verstärkt vor. Eine Maskierung der für die Kernakkumulation von GFP wichtigen Sequenzen (soweit überhaupt vorhanden, da es sich bei der GFP-Akkumulation im Kern auch um eine Retention handeln kann) erscheint mir bei der Faß-ähnlichen Struktur des Proteins wenig plausibel. Außerdem sollten bei einer aktiven Rolle des GFP am Kerntransport auch die weiteren Fusionsproteine mit GFP am N-Terminus wie z. B. GFP- Δ PKC α (1-311) im Kern akkumulieren, was sie jedoch nicht tun. Meine Ergebnisse deuten darauf hin, daß sich innerhalb der ersten 187 Aminosäuren von PKC α Bereiche befinden, die für den Kerntransport essentiell sind. Das Anfügen von GFP an den C-Terminus führt vermutlich zur erschwerten Zugänglichkeit der Kerntransport-relevanten Sequenzen, so daß die Akkumulation im Kern verhindert wird. Die fehlende Kernakkumulation der GFP-fusionierten Deletionsmutanten 1-289 und 1-311 dürfte auf intramolekulare Wechselwirkungen oder die Bindung von Kerntransport-verhindernden Proteinen zurückzuführen sein. Die dafür verantwortlichen Bereiche innerhalb von PKC α sollten sich im Bereich zwischen den Aminosäuren 252 und 289 befinden, da sich GFP- Δ PKC α (1-289) im Gegensatz zu GFP- Δ PKC α (1-252) nicht mehr im Kern anreichert und nur noch gleichverteilt in der Zelle vorliegt.

Die Bindung von PMA bewirkt offenbar bei allen Deletionsmutanten mit Anteilen der regulatorischen Domäne eine starke Erhöhung der Membran-Affinität. Interessanterweise scheint die Translokation zur Kernmembran auf zwei verschiedenen Wegen zu erfolgen. Bei GFP- Δ PKC α (1-187) und GFP- Δ PKC α (1-252) (sowie auch NLS- Δ PKC α (1-187)-GFP) muß wegen der hohen nukleären Konzentration der nichtstimulierten Deletionsmutanten von einer Translokation vom Kern zur inneren Kernmembran ausgegangen werden, während sich die anderen Kernmembran-translozierenden Deletionsmutanten wahrscheinlich vorrangig aus dem Cytoplasma an die Kernmembran bewegen. Translokation zur Plasmamembran nach PMA-Aktivierung wurde auch für vergleichbare Deletionsmutanten der regulatorischen Domäne von PKC γ beschrieben (Sakai et al., 1997; Oancea et al., 1998). Daneben wurde auch für alle bisher untersuchten GFP-PKC Fusionsproteine mit vollständiger PKC α , β II, γ , δ oder ϵ Translokation zur Plasmamembran nach Aktivierung beobachtet (Almholt et al., 1999, Feng et al., 1998; Sakai et al., 1997; Ohmori et al., 1998; Shirai et al., 1998). Da dies auch für die von mir verwendeten GFP-PKC α Fusionsproteine mit vollständiger PKC α gilt, muß die Plasmamembran-Translokation als eine weitverbreitete Eigenschaft aktivierter PKCs angesehen werden. Die Translokation zur Kernmembran scheint dagegen weitgehend auf die von mir benutzten PKC α -Deletionsmutanten beschränkt zu sein. Lediglich für die GFP-fusionierte erste

Cystein-Domäne von PKC γ konnte nach Aktivierung mit PdBu ebenfalls eine Translokation zur Kernmembran beobachtet werden (Oancea et al., 1998).

Eine direkte Beteiligung der katalytischen Domäne an der Kerntranslokation erscheint nach meinen Ergebnissen wenig plausibel. Die Fusionsproteine GFP- Δ PKC α (326-672) und Δ PKC α (342-672)-GFP sind zwar nicht völlig vom Kern ausgeschlossen, aber ihre vorrangig cytoplasmatische Lokalisation spricht gegen eine aktive Rolle beim Kerntransport. Denkbar wäre jedoch, daß bei diesen Deletionsmutanten eine Inhibition der Kerntranslokation durch Wechselwirkung mit einem bindenden Protein vorliegt. Ein geeigneter Kandidat dafür ist das mittels Yeast-Two-Hybrid-Screen gefundene PKC α -Interaktionsprotein PICK1 (*protein that interacts with C-kinase*), das über ein PDZ-Motiv mit der V5-Region am C-Terminus von PKC α interagiert (Staudinger et al., 1997). Staudinger et al. postulieren, daß PICK1 eine Rolle bei der Lokalisierung von PKC z. B. bei der Translokation zur Plasmamembran spielt. Meine Ergebnisse mit dem V5-deletierten PKC α (1-660)-GFP-Fusionsprotein weisen ebenfalls auf eine Beteiligung von V5/PICK1 an der subzellulären Bewegung aktivierter PKC α hin. Allerdings scheint die fehlende V5-Region weniger die Translokation zur Plasmamembran als vielmehr die Bewegung zur Kernmembran und eventuell auch zum Kern zu beeinflussen.

3.6. Modell für die Kerntranslokation von Proteinkinase C α

Der Stimulus-induzierte Kerntransport von Proteinkinase C α stellt sich vermutlich als ein zweistufiger Prozeß dar. In einem ersten Schritt induziert die Bindung der PKC-Aktivatoren Ca²⁺ und Diacylglycerol bzw. Phorbol-ester die Aufhebung der intramolekularen Interaktion zwischen Pseudosubstrat und katalytischem Zentrum (Pears und Parker, 1991). Die Exposition der V1-Region einschließlich der Pseudosubstratregion bewirkt dann Translokation zur Plasmamembran durch Bindung an bisher nicht identifizierte Membranproteine. Vermutlich fungieren diese zunächst als Plasmamembran-Ankerproteine von PKC, bevor der zweite Schritt - die Translokation zum Kern - durch das Ablösen der aktivierten PKC von der Plasmamembran ausgelöst wird. Die Proteine 35F und 35H stellen potentielle Ankerproteine für PKC α dar. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß die PKC α -Mutante D294G nach Phorbol-ester-Aktivierung verstärkt im Kern von Ratten-Fibroblasten vorliegt und im Gegensatz zur nicht-mutierten PKC α eine verringerte Bindung zu den Ankerproteinen 35F und 35H zeigt (Prevostel et al., 1998). Eine wichtige Rolle beim zweiten Schritt scheint die Autophosphorylierung von PKC zu spielen. Dafür sprechen z.B. die von mir beobachtete verstärkte Plasmamembran-Translokation von inaktiver PKC α sowie die fehlende Dissoziation von der Plasmamembran

bei katalytisch inaktiver PKC β II (Feng und Hannun, 1998). Unklar ist bisher, ob dieser zweite Schritt abhängig von Cofaktoren verläuft. Möglicherweise erfordert die Translokation zum Kern einen oder mehrere spezifische Import-Rezeptoren für PKC, wie man sie für Proteine mit klassischen Kernlokalisationsignalen kennt, wenngleich die von mir beobachtete Kerntranslokation extern zugegebener GFP-PKC α in permeabilisierten Fibroblasten eher gegen eine unterstützende Beteiligung von Cofaktoren spricht.

3.7. Zusammenfassung und Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zunächst neben PKC α die Fusionsproteine GST-His₆-PKC α und GFP-PKC α in Sf9-Insektenzellen hergestellt. Mit Hilfe eines Aktivitätstest wurde anschließend gezeigt, daß es sich dabei um katalytisch aktive Proteine handelt. Das Anfügen von GST-His₆ und GFP an PKC α hat offensichtlich keinen Einfluß auf die Aktivität, da sich die Fusionsproteine in ihrer Aktivität nicht von PKC α unterscheiden.

Gereinigtes GFP-PKC α aus den Insektenzellen transloziert wie endogene PKC α in Digitonin-permeabilisierten NIH 3T3-Fibroblasten in den Zellkern. Die Translokation beruht nicht auf simpler Diffusion, verläuft jedoch anscheinend ohne Cofaktoren. Da man bei Präinkubation mit dem Cytosolersatz Retikulozytenlysat eine Abschwächung des Kerntransports beobachtet, gibt es im Retikulozytenlysat wahrscheinlich einen Retentionsfaktor, der GFP-PKC α im Cytoplasma festhält. Prinzipiell sollte es möglich sein, diesen Faktor durch Fraktionierung des Retikulozytenlysats zu identifizieren, was allerdings eindeutigere Aussagen für Kernakkumulation bzw. Retention und damit eine Verbesserung des *in vitro* Transporttests mit GFP-PKC α voraussetzt. Permeabilisierung scheint ein generelles Signal für PKC α -Kerntransport zu sein, da GFP-PKC α auch in transfizierten permeabilisierten Zellen einer Kerntranslokation unterliegt.

Die Expression von PKC α und den Fusionsproteinen GFP-PKC α und PKC α -GFP in transfizierten NIH 3T3-Fibroblasten bewirkt überraschenderweise eine Veränderung der Lokalisation verglichen mit endogener PKC α . Während endogene PKC α nach PMA-Aktivierung in den Zellkern transloziert, findet man überexprimierte aktivierte PKC α sowie GFP-PKC α und PKC α -GFP hauptsächlich an der Plasmamembran. Die Verschiebung zur Plasmamembran ist wahrscheinlich auf die Überexpression, nicht jedoch auf die Fusion von GFP an PKC α zurückzuführen. Eine reduzierte regulierte Expression der GFP-PKC α -Fusionsproteine könnte mit Hilfe eines induzierbaren Expressionssystems wie z.B. dem Tetracyclin-Expressions-System (Gossen und Bujard, 1992) erzielt werden. Allerdings müßte dann auch eine deutlich geringere GFP-Fluoreszenz in Kauf genommen werden, die eine Detektion transfizierter Zellen wegen der Autofluoreszenz nichttransfizierter Zellen stark erschweren würde.

Untersuchungen mit GFP-PKC α -Deletionsmutanten deuten auf eine aktive Beteiligung der ersten 187 Aminosäuren an der Kerntranslokation von PKC α hin. Die katalytische Domäne scheint dagegen keine direkte Rolle beim Kerntransport zu spielen. Der Abschnitt zwischen den Aminosäuren 252 und 289 und die V5-Region am C-Terminus haben vermutlich eine negative regulatorische Funktion beim Kerntransport von PKC α . Es erscheint deshalb möglich,

mit Peptiden, die man von diesen Sequenzen ableitet, eine partielle Aufhebung der Inhibition der Kerntranslokation zu erzielen. So sollte z.B. die Mikroinjektion derartiger Peptide zu verstärkter Kerntranslokation sowohl von endogener PKC α als auch von GFP-PKC α -Fusionsproteinen in transfizierten Zellen führen.

Schließlich erscheint es reizvoll, die kürzlich beschriebene PKC α -Mutante D294G (Prevostel et al., 1998) als GFP-Fusionsprotein in NIH 3T3-Fibroblasten zu exprimieren und den Einfluß der Ankerproteine 35F und 35H auf die PKC α -Verteilung zu untersuchen.

3.8. Summary

One important factor for determination of the specific functions of PKC isoforms is their specific subcellular localisation, which changes following to activation in the course of signal transduction events. In response to stimulation with phorbol esters protein kinase C α translocates to the plasma membrane and the nucleus in NIH 3T3 fibroblasts. In order to elucidate protein kinase C α 's subcellular distribution and especially its nuclear accumulation in more detail we used fusion proteins consisting of protein kinase C α and the green fluorescent protein from the jellyfish *Aequorea victoria*. Expression in insect cells revealed that the fused green fluorescent protein does not affect protein kinase C α 's activity. The purified fusion protein undergoes nuclear accumulation without any further stimuli in an assay using digitonin-permeabilised cells. Interestingly, permeabilisation appears to be a general trigger for protein kinase C α 's nuclear translocation since the fusion protein of the green fluorescent protein and protein kinase C α translocates to the nucleus in transiently transfected cells following permeabilisation, too. Following stimulation of transiently transfected cells with phorbol ester, overexpressed fusion proteins of the green fluorescent protein and protein kinase C α translocate mainly to the plasma membrane and only to a minor extent to the nucleus whereas endogenous protein kinase C α mainly translocates to the nucleus. Use of fusion proteins of the green fluorescent protein and different mutants of protein kinase C α enabled determination of motifs involved in protein kinase C α 's subcellular distribution: A25E and K368R point mutations of proteins kinase C α showed enhanced affinity for the plasma membrane, whereas sequences within the regulatory domain probably confer protein kinase C α 's nuclear accumulation. Moreover we could show that the subcellular distribution of fusion proteins of the green fluorescent protein and protein kinase C α is dependent on the fusion site in some cases.