

1. Einleitung

1.1. Signaltransduktion zum Zellkern

Lebende Zellen müssen in der Lage sein, äußere Signale ihrer Umgebung aufzunehmen und darauf zu reagieren, um sich beispielsweise geänderten Parametern wie Temperatur, Nährstoffangebot, Zelltod benachbarter Zellen in Folge einer Verletzung etc. anpassen zu können. Unter dem Begriff der „Signaltransduktion“ wird die Aufnahme und Weiterleitung solcher Signale in das Cytoplasma und/oder den Zellkern und ihre Umsetzung in einen Effekt verstanden. Die Zellantwort kann sich beispielsweise in so unterschiedlichen zellulären Vorgängen wie Differenzierung, Wachstum, Proliferation und Apoptose äußern, die ihrerseits wieder über verschiedene Signaltransduktionswege koordiniert werden. Da die genannten zellulären Vorgänge alle vom Zellkern aus gesteuert werden, wird deutlich, daß der Signalweiterleitung in den Zellkern und der Steuerung der Genexpression eine besonders herausragende Bedeutung zukommt. Wie aber können extrazelluläre Signale Vorgänge im Inneren des Zellkerns beeinflussen und noch dazu mit Plasmamembran und Kernmembran zwei Kompartimentbarrieren überwinden?

Meist sind Weiterleitung und Umsetzung solcher Signale die Aufgabe von „Rezeptor/Transduktor/Effektor“-Triaden, bei denen das Ursprungssignal („first messenger“) in ein intrazelluläres Signal („second messenger“) umgewandelt wird.

Die Signale, die sowohl physikalischer (Licht oder Druck), als auch chemischer Natur (Neurotransmitter oder Hormone) sein können, werden zunächst von einem Rezeptor an der Plasmamembran detektiert. Die Signalmoleküle bleiben aber ganz überwiegend außerhalb der Zelle. Eine Ausnahme bildet die Gruppe der Steroidhormone, die ausreichend hydrophob sind, um sich in der Lipid-Doppelschicht der Membran lösen zu können. Die Erkennung der Signalmoleküle durch ihre Rezeptoren drückt sich biochemisch in einer Konformationsänderung des Rezeptors aus, sobald die Bindung des Liganden erfolgte. Diese wird wiederum von „Transduktor“-Molekülen, die häufig G-Proteine sind, erkannt, die dann ihrerseits wieder regulatorisch auf die Effektoren wirken, von denen dann der effektorspezifische „second messenger“ freigesetzt wird. Effektoren können beispielsweise Ionenkanäle oder Enzyme (Phospholipasen, Adenylzyklasen oder Guanylzyklasen) sein. Letztlich wirken die „second messenger“ entweder direkt oder über weitere Signalmoleküle wie Proteinkinasen oder Phosphatasen auf Transkriptionsfaktoren, die dann im Zellkern die Expression der für die Zellantwort benötigten Gene bewirken.

Die oben grob skizzierte Art der Signalweiterleitung über mehrere Stufen (Signalkaskaden) scheint auf den ersten Blick ziemlich kompliziert – und das ist sie auch. Aber es gibt mehrere gute Gründe, weshalb diese Mechanismen im Laufe der Evolution so erfolgreich waren und in unterschiedlichsten Varianten in sämtlichen eukaryotischen Zellen auftauchen. Zum einen wirken Signalkaskaden als Verstärker, die das ursprüngliche Signal über ihre Zwischenstationen um mehrere Größenordnungen amplifizieren können, was erklärt, weshalb verschiedene Stoffe, beispielsweise Hormone, bereits in geringsten Konzentrationen erhebliche Effekte zeigen können. Zum anderen bietet jeder Signalweiterleitungsschritt eigene Regulatormöglichkeiten, so daß innerhalb der Kaskade jederzeit eine „Feinabstimmung“ des Signals möglich ist. Außerdem stellen viele „Zwischenstufen“ einer Signalkaskade gleichsam Knotenpunkte dar, die auch Ziele von anderen Signalwegen sein können. Dadurch können sich die Signalwege gegenseitig beeinflussen und letztlich ein dichtes Netzwerk bilden.

Einen wichtigen Knotenpunkt dieses Netzwerkes aus Signalwegen stellt die Proteinkinase C-Familie dar. Ihre Mitglieder greifen in diverse zum Zellkern gerichtete Signalkaskaden ein. Zwei Beispiele sind die PKC-abhängige Phosphorylierung von Raf und die damit verbundene Aktivierung der MAP-Kinasekaskade (Kolch et al. 1993; Sozeri et al. 1992) und die Aktivierung der β -Rezeptor-Kinase (β ARK), die deren Translokation zur Plasmamembran zur Folge hat (Winstel et al. 1996). Dort führt β ARK zur Dissoziation von G-Proteinen von ihren Rezeptoren und damit zur Inhibition der damit verbundenen Signalwege wie beispielsweise der PKA-Signalkaskade.

Die in dieser Arbeit untersuchte PKC α ist ein besonders interessantes Mitglied der PKC-Familie. Wird sie aktiviert, transloziert sie nicht nur an die Plasmamembran, sondern zum Teil auch in den Zellkern (Divecha et al. 1991; Neri et al. 1994), wodurch ihr neue Zielmoleküle zugänglich werden und sich damit neue Möglichkeiten der Regulation von Kernprozessen ergeben. So erfüllt nucleäre PKC nicht nur Aufgaben bei der Regulation der Genexpression, sondern ist wahrscheinlich auch während der Mitose an der Auflösung der Kernlamina beteiligt, die ein Bestandteil der Kernmembran ist (Fields et al. 1988).

Die Bedeutung einer funktionierenden Signalweiterleitung wird besonders in den Fällen deutlich, in denen sie nicht mehr funktioniert. Zellen, die nicht mehr auf die Signale benachbarter Zellen reagieren, können beispielsweise ein unkontrolliertes Wachstum zeigen und im schlimmsten Fall zu Krebszellen mutieren. Tatsächlich ist gezeigt worden, daß Krebszellen im Vergleich zu gesunden Zellen ein verändertes, von der Bösartigkeit des Tumors abhängiges Expressionsmuster verschiedener PKC-Isoformen aufweisen. So scheint die Expression von PKC α , die einen verstärkenden Einfluß auf die Proliferation dieser Zellen hat, in ver-

schiedenen Hirntumoren deutlich hochreguliert zu werden. Die Expression der auf die Proliferation inhibitorisch wirkenden PKC δ wird hingegen herunterreguliert (Mandil et al. 2001).

Diese und andere ähnliche Beobachtungen machen PKC und weitere Schlüssel-moleküle der Signaltransduktion zu bedeutenden Zielmolekülen bei der Entwicklung neuer Medikamente.

1.2. Der Zellkern

Der Zellkern wurde von dem schottischen Botaniker Robert Brown bereits 1831 entdeckt, was ihn zur am längsten und bestbekanntesten, aber nicht zur bestverstandenen Zellorganelle macht. Der Zellkern einer Säugetierzelle hat einen Durchmesser von ca. 6 μm und macht etwa 10 % des Zellvolumens aus. In ihm ist der Hauptteil der genetischen Information der Zelle in Form langkettiger DNA-Moleküle in den Chromosomenterritorien enthalten. Der Zellkern ist durch die aus zwei Doppelmembranen (innere und äußere Kernmembran) bestehende Kernhülle vom cytoplasmatischen Raum abgegrenzt. Die Kernporenkomplexe gewährleisten den notwendigen Stoffaustausch mit dem Cytosol, denn der Zellkern ist der Ort vielfältiger grundlegender biochemischer Prozesse und Reaktionen, die ein Überleben der Zelle sowie eine Reaktion der Zelle auf äußere Signale erst möglich machen. Dazu gehören unter anderem die Transkription, das Spleißen der pre-mRNA und die Ribosomenassemblierung. Um diese diversen Funktionen kontrolliert ausführen zu können, enthält der Zellkern selbst Subkompartimente, die im Mikroskop unterscheidbar sind und spezifische Proteinzusammensetzungen aufweisen (Dundr & Misteli 2001).

1.2.1. Die Kernmembran

Der Zellkern wird vom Cytosol durch die aus zwei Doppelmembranen (innere und äußere Kernmembran) bestehende Kernhülle abgegrenzt. Die beiden Membranen sind in den Bereichen der Kernporenkomplexe kontinuierlich miteinander verbunden. Die äußere Membran geht kontinuierlich in das rauhe endoplasmatische Retikulum über, ist daher größtenteils mit Ribosomen besetzt und in der Proteinzusammensetzung von diesem praktisch ununterscheidbar. Die innere Kernmembran hingegen besitzt eine besondere Ausstattung an Proteinen, die unter anderem den Lamin B-Rezeptor LBR (Worman et al. 1988), das Lamina assoziierte Protein LAP1 (Martin et al. 1995), die integralen Membranproteine der LAP2-Familie (z.B. Furukawa et al. 1995), Nurim (Rolls et al. 1999), Emerin (Bione et al. 1994) und MAN1 (Paulin-Levasseur et al. 1996) umfasst. Erst kürzlich wurden bei einer Proteomanalyse in unserem Labor mit KIAA0810, das dem *Caenorhabditis elegans* Protein Unc-84A homolog ist, und dem 45 kD-Protein LUMA zwei neue Proteine der inneren Kernmembran entdeckt (Dreger et al. 2001). Die N-Termini der meisten Proteine der inneren Kernmembran befinden sich auf der nucleoplasmatischen Seite der Membran (s. Abb. 1) und ihre Phosphorylierungsstellen sind Ziel diverser Kinasen.

Den Lamin-bindenden Proteinen LBR, LAP1, LAP2 und Emerin wird unter anderem eine Rolle bei der Verankerung der Lamina an der inneren Kernmembran zugeschrieben. Die

Lamina befindet sich zwischen der inneren Kernmembran und dem Chromatin, besteht hauptsächlich aus Laminen und erfüllt Aufgaben als Kerngerüst und - gemeinsam mit den Proteinen der inneren Kernmembran - bei der Organisation des Chromatins. Vertebraten haben drei Lamingene (A, B1 und B2), die sieben verschiedene Lamine codieren, wobei die Lamine A, AD10, C1 und C2 Spleißvarianten des Lamin A-Gens und die Lamine B2 und B3 Spleißvarianten des Lamin B2-Gens sind.

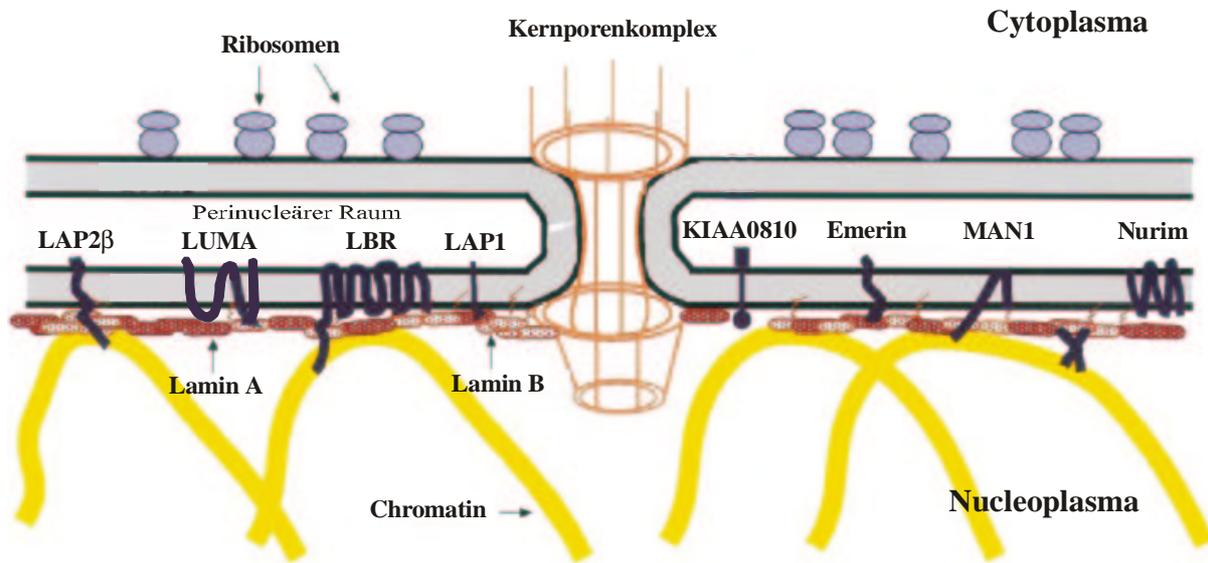


Abb. 1: Die Kernmembran, modifiziert nach Gruenbaum et al. (2000)

Zu den am besten untersuchten Proteinen der inneren Kernmembran gehört der LBR, der acht potentielle Transmembransequenzen enthält (Worman et al 1988, Worman et al. 1990). In der N-terminalen Domäne befinden sich mehrere SR-Motive, die Protein-Protein-Wechselwirkungen vermitteln können. Allerdings ist die namensgebende Laminbindung des Rezeptors seit neuerer Zeit umstritten (Mical & Monteiro 1998). Nichtsdestotrotz ist der LBR Bestandteil verschiedener Proteinkomplexe in der inneren Kernmembran. Einer von ihnen besteht aus Laminen des A- und B-Typs, LBR, LBR-Kinase, dem integralen Membranprotein p18, das ebenfalls Lamin-bindende Eigenschaften besitzt, und p32/p34 (Simos & Georgatos 1992; Simos & Georgatos 1994). Die LBR-Kinase ist in der Lage SR-Motive zu phosphorylieren. Eine SR-Phosphorylierung des LBR verursacht die Dissoziation von p32/p34 von dem Komplex (Nikolakaki et al. 1996).

Ein weiterer Komplex enthält neben dem LBR auch HA95, LAP2β und Emerin (Martins et al. 2000). HA95 ist homolog zu AKAP95 (Orstavik et al. 2000), enthält zwei Zinkfinger-Motive und assoziiert mit Chromatin. Es konnte gezeigt werden, daß bei Verknüpfung von Chromatindomänen mit der inneren Kernmembran die Transkription in den betreffenden

Bereichen zum Erliegen kommt (Andrulis et al. 1998). Insofern könnten solche Komplexe eine wesentliche Rolle bei der temporären Inaktivierung bestimmter Gene spielen.

Die Assoziation der Proteine der inneren Kernmembran mit den Chromatinstrukturen kann aber auch noch durch andere Proteine vermittelt werden. So wurde beispielsweise auch für zwei Formen des Heterochromatin Protein 1 (HP1 α und HP1 γ) eine spezifische Assoziation mit dem LBR nachgewiesen (Ye & Worman 1996), die aber nach neuesten Erkenntnissen wahrscheinlich indirekt ist und über die Histone H3/H4 (Polioudaki et al. 2001) vermittelt wird. Der „barrier to autointegration factor“ (BAF) ist ein LAP2 β - (Furukawa 1999) und Emerin-bindendes Protein (Haraguchi et al. 2001).

LAP2 β ist der bekannteste Vertreter der sieben alternative Spleißvarianten umfassenden LAP2-Familie. LAP ϵ , LAP γ und LAP δ unterscheiden sich lediglich durch das Fehlen relativ kurzer Regionen im N-Terminus (40, 72 bzw. 109 Aminosäuren) von LAP2 β (452 Aminosäuren), LAP2 ζ hingegen besteht lediglich aus den ersten 219 Resten des N-Terminus (zuzüglich 5 zusätzlichen Aminosäuren am C-Terminus) und verfügt daher über keinerlei Transmembransequenz mehr. Noch stärkere Unterschiede weist LAP2 α auf, bei dem die ersten 187 Reste des N-Terminus mit den übrigen Isoformen identisch sind, dessen C-terminale Domäne (506 Aminosäuren) jedoch vollkommen von diesen abweicht und ebenfalls keine Transmembransequenz mehr besitzt.

Interessanterweise weist LAP2 mit Emerin und MAN1, zwei anderen der bereits oben erwähnten Proteine der inneren Kernmembran, ein hochkonserviertes Sequenzmotiv auf, obwohl alle drei Proteine von verschiedenen Genen abstammen. Eine Funktion dieser als LEM-Domäne bezeichneten Region ist bislang aber noch unbekannt (Morris & Manilal 1999).

Viele Proteine der inneren Kernmembran sind während der Mitose auch an der Auflösung oder dem Wiederaufbau der Kernhülle beteiligt. Zunächst führt eine Lamin B-Phosphorylierung durch p34cdc2-Cyclin B-Komplex zu einem Zerfall der Lamina (Peter et al. 1990, Dessev et al. 1991). Die Kernmembran wird samt ihrer integralen Membranproteine in Vesikeln gespeichert, wobei unklar ist, ob sich die Lamin-bindenden Proteine nach dem Zusammenbruch der Lamina über das ER verteilen (Ellenberg et al. 1997, Yang et al. 1997) oder ob sich die Proteine der inneren Kernmembran in unterschiedlichen Vesikelpopulationen befinden (Buendia & Courvalin 1997, Maison et al. 1997). Lamin B bleibt zu einem großen Teil mit den Lamin-bindenden Proteinen assoziiert, während sich die Lamine A und C im Nucleoplasma lösen (Georgatos et al. 1997). Während der späten Anaphase beginnen die Lamine wieder in so geringen Mengen an die Chromosomen zu binden, daß sie zwar noch keine neue Lamina aufbauen können, jedoch wahrscheinlich durch Wechselwirkungen mit anderen

Komponenten für den Wiederaufbau der Kernmembran von Bedeutung sind (Jenkins et al. 1993). Die Lamin-bindenden Proteine der inneren Kernmembran könnten nun bei der Verankerung und Fusion der Vesikel an den Chromosomen von Bedeutung sein, besonders die, die wie LAP2 β die Fähigkeit haben, direkt oder, wie Emerin auch (Haraguchi et al. 2001), BAF-vermittelt an Chromatin binden zu können. Die Regulierungsmechanismen der Chromatinbindung von LAP2 β sind jedoch noch unbekannt, ein Einfluß von Phosphorylierungen ist allerdings wahrscheinlich und wurde im Falle des LBR auch gerade nachgewiesen (Takano et al. 2002). Oligomerisierungen mittels der Coiled-coil-Motive des LAP2 β (Martin et al. 1995) kämen aber ebenfalls in Betracht. Nach dem Wiederaufbau der Kernhülle werden auch die Lamine A und C wieder in den Kern importiert und die Wiederherstellung der Lamina komplettiert.

1.2.2. Der Kernporenkomplex

Der Kernporenkomplex (NPC) stellt die bislang einzige bekannte Verbindung zwischen dem Kerninneren und dem Nucleoplasma dar und ist somit für den gesamten Stoffaustausch zwischen Nucleoplasma und Cytosol zuständig. Er besitzt eine hochsymmetrische oktagonale Struktur, die von der Hefe bis zu den Vertebraten konserviert ist, obgleich sich die Kernporenkomplexe in Größe und Komplexität erheblich unterscheiden. So besteht der Komplex der Hefe lediglich aus etwa 30 verschiedenen Proteinen (Nucleoporinen) mit einer Gesamtmasse von ca. 66 MDa, der der Vertebraten hingegen aus ~ 50 Nucleoporinen mit einer Masse von etwa 125 MDa (Reichelt et al. 1990; Rout & Blobel 1993; Rout et al. 2000; Reichelt et al. 1990). Diese im Verhältnis zur Masse verhältnismäßig geringe Anzahl an Proteinen überrascht natürlich aufgrund der C₈-Symmetrie des Komplexes kaum, zumal - zumindest in Hefe - die meisten Proteine sowohl Bestandteile von cytoplasmatischen wie auch von nucleoplasmatischen Strukturen sind (Rout et al. 2000).

Der Kernporenkomplex der Vertebraten ist sandwichartig aus mehreren Substrukturen aufgebaut (Goldberg & Allen 1996; Goldberg et al. 1997) (s. Abb. 2): Der zentrale Transporter des Kernporenkomplexes ist über einen Speichenring-Komplex in der Porenmembran verankert, welche von den „Speichen“ durchdrungen wird. Zwischen den Speichen befinden sich laterale Kanäle mit einem Durchmesser von etwa 10 nm, durch die wahrscheinlich Moleküle, die kleiner als 9 nm bzw. 45 kDa sind, frei diffundieren können (Paine et al. 1975)

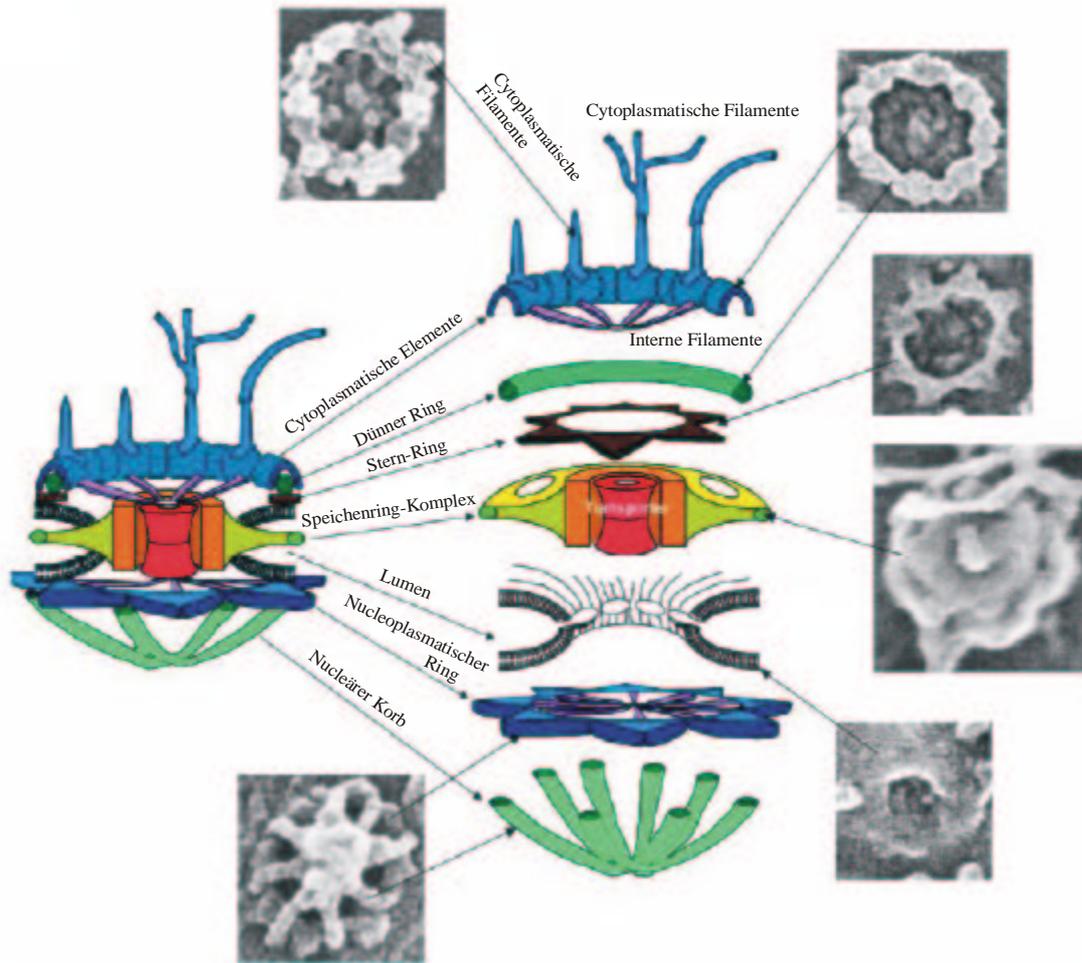


Abb. 2: Der Kernporenkomplex nach Allen et al. (2000)

Auf der nucleoplasmatischen Seite des Speichenkomplexes befindet sich der nucleoplasmatische Ring, an dem der nucleäre Korb verankert ist. Der cytoplasmatische Ring auf der gegenüberliegenden Seite ist direkt mit dem Eingang des Transporters über gleichfalls speichenartige Gebilde, die acht internen Filamente, verbunden und besteht seinerseits aus Substrukturen: Zum einen aus dem „Stern-Ring“, der direkt auf der äußeren Kernmembran aufliegt und auf dem sich wiederum der „dünne Ring“ befindet. Der „dünne Ring“ fungiert als Träger der cytoplasmatischen Elemente, über die die cytoplasmatischen und internen Filamente mit dem Kernporenkomplex verbunden sind.

Diese cytoplasmatischen Filamente bilden die ersten Andockstellen für Importkomplexe auf ihrem Weg in den Zellkern. Desweiteren wurde diskutiert, daß diese Filamente in direkter Verbindung zu Bestandteilen des Cytoskeletts stehen könnten (Goldberg & Allen 1995), was die Möglichkeit neuer, noch unentdeckter Transportmechanismen nahelegen würde.

Es wurden in den letzten Jahren viele Anstrengungen unternommen, die molekulare Struktur des Kernporenkomplexes und seiner Nucleoporine aufzuklären, deren exakte Kenntnis die Voraussetzung für ein besseres Verständnis des Importmechanismus wäre. Dabei fiel das häufige Auftreten eines Dipeptidmotivs auf, daß für viele, wahrscheinlich sogar mehr als die Hälfte aller Nucleoporine des Kernporenkomplexes charakteristisch ist. Es besteht aus Wiederholungen von FG-Einheiten, die oft die Gestalt von GLFG- oder FXFG-Motiven haben, die durch polare Linkerregionen variabler Länge verbunden sind. Diese FG-Nucleoporine durchziehen den gesamten Kernporenkomplex, sind zum Teil nur auf einer Seite zu finden und reichen von der Spitze der cytoplasmatischen Filamente (Nup358) über die Kernpore (p62) bis zum nucleären Korb (Nup153, Nup96) (Yokoyama et al. 1995; Guan et al. 1995; Hu et al. 1996; Sukegawa & Blobel 1993; Fontoura et al. 1999). Es wird vermutet, daß diesen FG-Regionen eine erhebliche Rolle beim Transport durch den Kernporenkomplex zukommt. Diese Vermutung stützt sich zum einen auf die Tatsache, daß die FG-Nucleoporine so positioniert sind, daß sie für die zu transportierende Fracht gut zugänglich sind und zum anderen auf die Beobachtung, daß sie an diverse bekannte Importfaktoren binden können (Ryan & Wentz 2000).

Aber die Bindung an Importfaktoren ist nicht die einzige bemerkenswerte Interaktion. Manche Nucleoporine wie die bereits oben erwähnten Nup 358 und Nup153 besitzen Zinkfingerdomänen, wie sie häufig für die Interaktion von Proteinen mit DNA und RNA notwendig sind. Im Falle des Nup358 konnte aber von Yaseen & Blobel (1999) gezeigt werden, daß dessen acht Zinkfinger motive eine spezifische Bindungsstelle für Ran-GDP darstellen. Außerdem konnten sie in dem Protein noch vier weitere Bindungsstellen detektieren, die ebenfalls Ran-GDP, aber mit erheblich höherer Affinität Ran-GTP binden können, die sogenannten „Ran BP1 homologen“ Bindungsstellen. Die vier Zinkfinger des Nup153 dienen neben der Bindung an DNA (Sukegawa & Blobel 1993) ebenfalls der Bindung von Ran-GDP (Nakielny et al. 1999), so daß neben der Nup-Importfaktor-Interaktion auch ein Einfluß der Ran-Bindungsstellen auf den Kerntransport bzw. den Ran-Zyklus wahrscheinlich ist.

1.2.3. Kernimport und Export

Ionen und kleinere Proteine können durch den Kernporenkomplex frei hindurchdiffundieren. Für Proteine ab einer Größe von ca. 60 kDa ist das nicht mehr möglich; sie werden über einen aktiven Transportmechanismus in den Zellkern befördert. Die Schlüssel moleküle des Mechanismus sind Importfaktoren (Importine/Karyopherine), die die für den aktiven Kernimport bestimmten Moleküle an deren Kernlokalisationssequenz (NLS) erkennen und durch den

Kernporenkomplex transportieren. Ein großer Teil der Kernproteine trägt eines der klassischen Kernlokalisationssignale, die typischerweise 3-5 basische Aminosäuren enthalten: Das einteilige NLS des „*simian virus 40 large T-antigen*“ (**PKKKRKV**, Kalderon et al. 1984) oder das zweiteilige NLS des Nucleoplasmins (**KRPAATKKAGQAKKKK**, Robbins et al. 1991). An diese klassischen Kernlokalisationssignale bindet zunächst das Importin α , das als Adaptermolekül für das Importin β fungiert (Görlich et al 1994; Adam & Adam 1994). Durch die Wechselwirkung des Importin β mit den Nucleoporinen des NPC wird der Proteinkomplex daraufhin in den Zellkern transportiert.

Der Transport von Proteinen kann gegen einen Konzentrationsgradienten erfolgen und ist daher energieabhängig. Längere Zeit ging man davon aus, daß der Transport durch die Kernpore durch GTP-Hydrolyse ermöglicht wird. Überraschenderweise stellte sich jedoch in neuerer Zeit heraus, daß die Hydrolyse von GTP durch Ran nicht für den eigentlichen Transportschritt notwendig ist (Ribbeck et al. 1999). Vielmehr scheint Ran die Stabilität der Import- und Export-Komplexe zu regulieren und damit einen gerichteten Transport zu gewährleisten. Das „Ran-GTPase aktivierende Protein“ (RanGAP) ist überwiegend im Cytoplasma lokalisiert (Matunis et al. 1996), der „GDP/GTP Austauschfaktor für Ran“ (RCC1) ist chromatinassoziiert (Ohtsubo et al. 1989). Aufgrund der asymmetrischen Verteilung von RanGAP und RCC1 wird vermutet, daß sich Ran-GDP überwiegend im Cytoplasma befindet und im Zellkern vorwiegend die Ran-GTP-Form vorliegt. Gemäß dem heutigen Modell des klassischen Kernimports bilden das NLS-tragende Protein und die Importine α und β im Cytoplasma den Importkomplex unabhängig von Ran. Im Zellkern führt die Bindung von RanGTP an Importin β jedoch zur Dissoziation des Komplexes. Umgekehrt ist RanGTP für die Bildung der trimeren Exportkomplexe im Zellkern entscheidend. Diese wiederum bestehen aus dem zu exportierenden Protein, das ein „Leucin reiches nucleäres Exportsignal“ (LRNES) aufweist, sowie dessen Rezeptor CRM1 und RanGTP. Hat der Exportkomplex das Cytosol erreicht, so stimuliert RanGAP unter Mitwirkung des Ran-bindenden Protein 1 (RanBP1) die intrinsische GTPase-Aktivität des Ran, die dann zur GTP-Hydrolyse und zum Zerfall des Komplexes führt (Görlich & Kutay 1999).

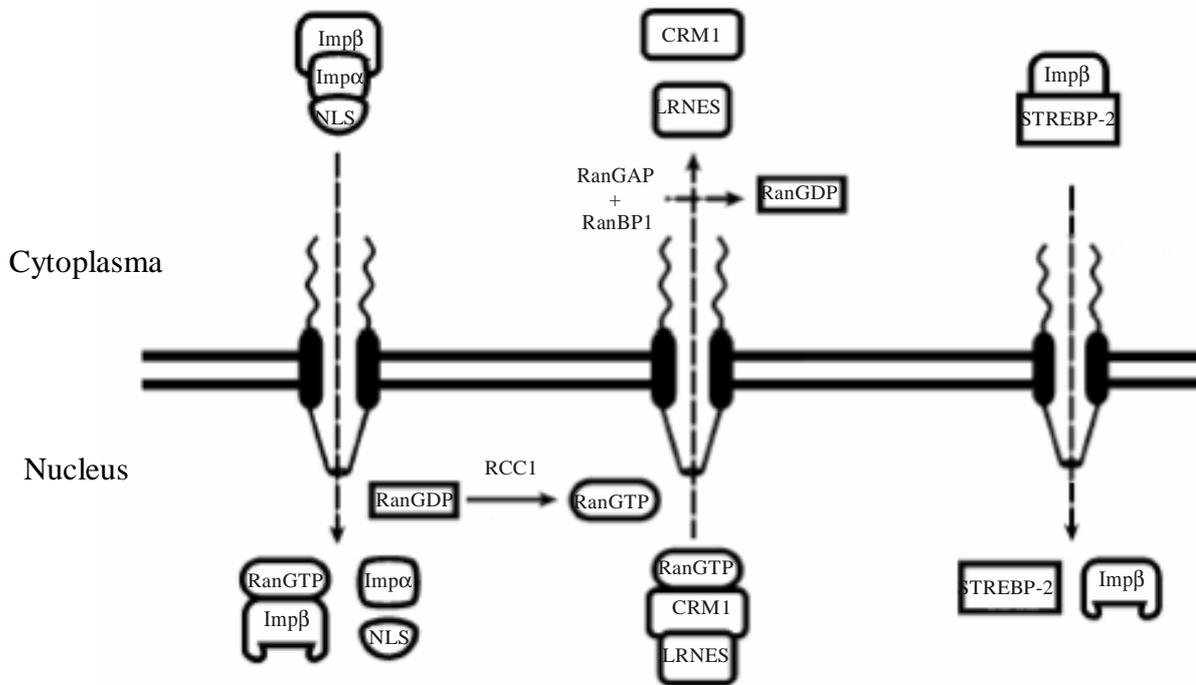


Abb. 3: Kernimport und Export, modifiziert nach Komelei & O'Shea (2001)

Dieses verhältnismäßig einfache Modell kann allerdings nicht darüber hinwegtäuschen, daß die realen Vorgänge, die sich am und im Kernporenkomplex abspielen, wesentlich komplizierterer Natur sind. Inzwischen sind mehrere Importin β -ähnliche Transportfaktoren bekannt, die unterschiedliche NLS-Sequenzen erkennen und verschiedene Transportwege vermitteln können (Übersicht in Imamoto 2000). Diese nichtklassischen NLS-Motive reichen von Peptidsequenzen bis zu ganzen Proteindomänen und können sogar noch deutlich komplizierter sein und sogar Strukturen von Proteinkomplexen und posttranslationale Modifikationen umfassen. Außerdem gibt es Proteine, die von Importin β direkt erkannt werden können, die Ran-unabhängig durch die Kernpore translozieren und bei denen Importin α als Adapterprotein überflüssig ist. Zu dieser Gruppe gehören beispielsweise die ribosomalen Proteine und der Transkriptionsfaktor STREBP-2. β -Catenin und NTF2 können sogar direkt mit den GLFG- oder FXFG-Wiederholungsmotiven der Nucleoporine interagieren und somit vollkommen Importin-unabhängig in den Zellkern translozieren (Imamoto 2000).

Auch der Mechanismus des Kernimports der Proteinkinase $C\alpha$ unterscheidet sich erheblich von dem des klassischen Kernimports. So scheint der Importmechanismus von $PKC\alpha$ beispielsweise vollkommen unabhängig von Importin und GTP zu sein, da er weder durch Mikroinjektion von Antikörpern, die gegen Importin β gerichtet sind, noch durch die Mikroinjektion von nichthydrolysierbaren GTP-Analoga beeinträchtigt wird (Schmalz et al. 1998). Das allein ist jedoch nicht so ungewöhnlich, wie es auf den ersten Blick scheint; es existieren mehrere Proteine, wie beispielsweise die bereits erwähnten ribosomalen Proteine, deren Im-

port Ran-unabhängig erfolgt. Proteine, deren Kernimport unabhängig von Importin β erfolgt, sind ohnehin keine Rarität, da es wie erwähnt auch andere Transportfaktoren gibt (Imamoto 2000). Eines der bekanntesten Beispiele ist das Protein hnRNPA1, dem wahrscheinlich eine wichtige Rolle beim Export der mRNA aus dem Zellkern zukommt und das wie PKC α ebenfalls zwischen Nucleoplasma und Cytoplasma hin- und hertranslozieren kann. Es besitzt eine M9-Region, die Import- und Exportsignal zugleich ist. Der Transportfaktor, der diese M9-Region erkennt und den Import vermittelt, ist das mit dem Importin β verwandte Transportin, ein Adaptermolekül wie Importin α ist für den Kernimport von hnRNPA1 jedoch nicht notwendig (Fridell et al. 1997; Pollard et al. 1996).

Außerdem wurde gezeigt, daß der Kernimport von PKC α im Gegensatz zu dem NLS/Importin vermittelten Import von der Integrität des Cytoskeletts abhängig ist (Schmalz et al. 1996). Für eine Cytoskelettabhängigkeit des Imports gibt es nur wenige andere Beispiele. So wurde in jüngster Zeit ein cytoskelettabhängiger Transport für das „parathyroid hormone related protein“ (PTHrP) beschrieben (Lam et al. 2002). Dieses Protein wird in vielen Geweben exprimiert und die große Ähnlichkeit seines Aminoterminus mit dem Hormon PTH erlaubt es ihm, die gleichen regulatorischen Funktionen auszuführen, sofern sie durch den gemeinsamen PTH/PTHrP-Rezeptor vermittelt werden (Philbrick et al. 1996; Roskams & Desmet 1997). Im Gegensatz zur PKC α ist der Kernimport von PTHrP GTP-abhängig, außerdem verfügt das Protein über ein klassisches NLS, das jedoch überraschenderweise deutlich besser von Importin β als von Importin α erkannt wird (Lam et al. 1999). Ferner scheint die Bindung von Importin β an das klassische NLS eine festere Assoziation des PTHrP mit den Mikrotubuli zu bewirken, deren Integrität für den Kernimport von PTHrP essentiell ist (Lam et al. 2002).

Ein weiteres wichtiges Beispiel dafür, daß der Integrität der Mikrotubuli eine bedeutende Rolle bei einigen Mechanismen des Kernimports zukommt, ist der des Tumorrepressorproteins p53. Dieses Protein, das unter anderem an der Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und Zelldifferenzierung beteiligt ist, liegt in der lebenden Zelle bereits zum großen Teil mikrotubuliassoziiert vor. Die Kerntranslokation dieses Transkriptionsfaktors nach seiner Aktivierung durch apoptotische Stimuli scheint jedoch nicht nur von der Integrität der Mikrotubuli abzuhängen (Giannakakou et al. 2002; Giannakakou et al. 2000), interessanterweise ist auch das mikrotubuliassoziierte Motorprotein Dynein aktiv an dem Importprozess beteiligt (Giannakakou et al. 2000).

1.3. PKC im Zellkern

Die PKC-Familie umfaßt nach heutigem Kenntnisstand 12 Isoformen von Serin-/Threonin-Kinasen, die sich im wesentlichen in ihrer Aktivierbarkeit durch verschiedene Aktivatoren unterscheiden (Decker & Parker 1994; Newton 1995).

Bisher konnten von wenigen Ausnahmen abgesehen, nur geringe Unterschiede in der Substratspezifität innerhalb der PKC-Familie festgestellt werden (Jaken 1996). Daher scheint neben der Stimulierbarkeit durch unterschiedliche Aktivatoren die subzelluläre Lokalisation der Isozyme ein wesentlicher Mechanismus zu sein, um die spezifische Phosphorylierung verschiedener Substrate zu gewährleisten.

Während verschiedener zellulärer Vorgänge wie beispielsweise Differenzierung oder Zellwachstum kann sich die Lokalisation der PKC-Isoformen durch spezifische Translokation zu verschiedenen Zellkompartimenten innerhalb der Zelle ändern, denen auf diese Weise andere Substrate zugänglich werden. Diese Translokation wird wahrscheinlich durch die Bindung der aktiven PKC an isozymselektive Rezeptoren für aktivierete C Kinasen (RACKs) ermöglicht, die dann als Signalmoleküle fungieren können und letztlich die subzelluläre Verteilung der jeweiligen PKC-Isoformen bestimmen (Mackay & Mochly-Rosen 2001; Mochly-Rosen et al. 1991).

Capitani und Mitarbeiter waren 1987 die ersten, denen der Nachweis nucleärer PKC gelang und nur kurze Zeit später und mit zunehmender Entwicklung isozymspezifischer Antikörper konnte für die meisten PKC-Isoformen nachgewiesen werden, daß sie permanent oder unter bestimmten Bedingungen im Zellkern lokalisiert waren (Buchner 1995; Martelli et al. 1999). Die Gegenwart der verschiedenen Isoformen im Zellkern hängt allerdings nicht nur vom aktuellen Status der untersuchten Zelle ab, sie ist zudem noch für jeden Zelltyp spezifisch. Auf diese Weise ist das Lokalisationsmuster der PKC-Familie sehr komplex und bis zum heutigen Tage ist es noch nicht gelungen, allgemeine Regeln abzuleiten, die ihre Präsenz im Zellkern erklären oder gar voraussagen könnten.

Die Translokation aktivierter PKC α in den Zellkern wurde zum ersten Mal 1991 von Divecha und Mitarbeitern beschrieben. Seither sind viele Anstrengungen unternommen worden, um den Mechanismus des Kernimports zu klären, denn keine der PKC-Isoformen verfügt über ein klassisches Kernlokalisierungssignal und vieles spricht dafür, daß es sich dieser Mechanismus von dem des klassischen Kernimports vollkommen unterscheidet (s. Kapitel 1.2.3). So wurde beispielsweise gezeigt, daß Kernimport der PKC α , nicht nur unabhängig von Importin und GTP erfolgen kann (Schmalz et al. 1998), sondern auch von der Integrität des Cytoskeletts abhängig ist (Schmalz et al. 1996).

Kürzlich wurde gezeigt, daß für die atypischen Isoformen ζ und λ der Zinkfinger ihrer C1-Domäne als NLS fungieren kann, aber für die konventionellen PKC-Isoformen, die unter physiologischen Bedingungen durch Ca^{2+} -Ionen und Diacylglycerol (DAG) aktiviert werden und zu denen die PKC α gehört, konnte diese Erkenntnis nicht bestätigt werden (Perander et al. 2001). Neben dem Mechanismus ihres Kernimports sind die Aufgaben und Beiträge der nucleären PKC-Isoformen zu der Regulation nucleärer Vorgänge weitgehend unklar und zum Großteil auch schlecht untersucht.

1.4. Substrate der PKC im Zellkern

Seit der Entdeckung nucleärer PKC sind zahlreiche Substrate dieser Enzymfamilie identifiziert worden, die in der inneren Kernmembran, der Lamina und im Inneren des Zellkerns selbst lokalisiert sind. An dieser Stelle soll nur beispielhaft auf einige wenige, aber besonders wichtige Substrate eingegangen werden und für weitere Informationen auf die Übersichtsartikel von Buchner 1995 und 2000 verwiesen werden.

Als Beispiel für ein wichtiges PKC-Substrat, das in der inneren Kernmembran lokalisiert ist, soll das LAP2 β dienen. Dieses Protein, auf das in Kapitel 1.3.1 bereits eingegangen wurde, ist eines der dominanten nucleären Substrate der PKC. Seine PKC α -Phosphorylierungsstellen konnten in jüngerer Zeit in unserem Labor lokalisiert werden (Dreger et al. 1999). Interessanterweise befinden sich alle detektierten PKC-Phosphorylierungsstellen in der Region der Aminosäuren 1-187, die allen Isoformen gemein ist. Das ist unter anderem deshalb interessant, da für LAP2 β *in vitro* neben der Bindung an Lamin B1 auch eine phosphorylierungsabhängige Bindung an Chromosomen nachgewiesen werden konnte (Foisner & Gerace 1993). Die chromatinbindende Region (1-85) (Furukawa et al. 1998) überlappt allerdings mit der BAF-bindenden Region (67-137) (Furukawa 1999), so daß nicht eindeutig entschieden werden kann, ob beide Regionen BAF-vermittelt an Chromatin binden, oder ob auch eine direkte LAP2 β /Chromatin-Interaktion möglich ist.

Das Lamin B ist, wie in Kapitel 1.3.1 erwähnt, ein Bestandteil der Kernlamina und gehört sicherlich zu den bekanntesten nucleären PKC-Substraten überhaupt (Fields et al. 1988; Beckmann et al. 1992). Die Phosphorylierung dieses Intermediärfilamentes steigert seine Löslichkeit erheblich und ist daher möglicherweise ein wichtiger Teil des Mechanismus der im Anfangsstadium der Mitose zum Zusammenbruch der Kernhülle führt (Hocevar et al. 1993; Goss et al. 1994).

Proteine, die im Kerninneren Aufgaben bei der DNA-Regulation erfüllen, bilden eine besonders wichtige Gruppe von PKC-Substraten. Dazu gehören beispielsweise DNA-Topoisomerasen, DNA-Polymerasen und natürlich die Transkriptionsfaktoren. So wurde beispielsweise berichtet, daß PKC in Abhängigkeit vom Zellzyklus die Aktivität von Topoisomerase II α regulieren kann (Wells et al. 1995). Ein Beispiel für einen bedeutenden und als Substrat der PKC bekannten Transkriptionsfaktor ist das Protein p53 (Baudier et al. 1992), das eine zentrale Rolle bei der Expression von Genen spielt, die Zellwachstum und Apoptose kontrollieren (Levine 1997). Allerdings ist bislang noch ungeklärt, ob p53 tatsächlich durch die im Zellkern befindliche PKC phosphoryliert wird, da sich seine subzelluläre Verteilung mit dem Zellzyklus ändert. Auch die biologische Bedeutung seiner Phosphorylierung durch PKC

ist noch weitgehend unklar, da p53 außerdem auch Ziel diverser anderer Kinasen ist und seine Aktivität daher über ein sehr komplexes Muster von Phosphorylierungsereignissen moduliert wird (Magnelli & Chiarugi 1997; Meek 1998).

Jedoch erstreckt sich der Einfluß der PKC nicht nur auf die Transkription, vielmehr kann sie auch die weitere Prozessierung der pre-mRNA steuern. Der in dieser Arbeit als PKC-Substrat beschriebene PTB-assoziierte Spleißfaktor (PSF) könnte beispielsweise ein Zielmolekül darstellen, über dessen Phosphorylierung die PKC α Einfluß auf den Spleißvorgang nehmen kann.

1.5. Spleißen

Die reife m-RNA wird gebildet, indem RNA-Sequenzen variabler Länge aus ihrem Vorläufermolekül, der pre-mRNA, entfernt werden. Diese RNA-Stücke (Introns) codieren entweder keine Abschnitte des Zielproteins, oder aber im Falle des alternativen Spleißens Abschnitte, deren Gegenwart in dem codierten Protein zum jeweiligen Zeitpunkt für die Zelle nicht erforderlich ist. Dieser Reifungsprozess findet im Zellkern unter Beteiligung hochmolekularer Komplexe, den Spliceosomen statt, die aus kleinen Ribonucleoproteinpartikeln (snRNPs) und andere Spleißfaktoren bestehen. Die Spliceosomenbildung erfolgt direkt auf der pre-mRNA und durchläuft mehrere Zwischenstufen („Commitment“-Komplex E → Pre-Spleißkomplex A → Früher Spleißkomplex B → Später Spleißkomplex C → Post-Spleißkomplex) (Krämer 1996). Die eigentliche Spleißreaktion verläuft in zwei Schritten. In dem ersten Reaktionsschritt (B→ C) wird an der 5'-Spleißstelle des Introns die Bindung zwischen Intron und Exon1 gespalten. Die Endprodukte des ersten Reaktionsschrittes (Exon 1 und Lasso-Exon 2) bleiben mit dem C-Komplex assoziiert. Die Exons werden dann in den zweiten Reaktionsschritt (C→ Post-Spleißkomplex) legiert und freigesetzt.

Die meisten eukaryotischen Introns besitzen eine pyrimidinreiche Region, die sich zwischen der Verzweigungsstelle (ein für die „Lassobildung“ benötigtes hochkonserviertes Adenosin) und dem hochkonservierten AG-Dinucleotid der 3'-Spleißstelle befindet. Dieser Region kommt eine außerordentlich wichtige Rolle bei der korrekten Erkennung der 3'-Spleißstelle zu und es gibt verschiedene Proteine, die im Verlaufe der Spleißreaktion daran binden.

Der am besten untersuchte Spleißfaktor, der die pyrimidinreiche Region erkennt, ist der U2 snRNP Auxiliary Factor (U2AF), der für die Bindung von U2 snRNP an die Verzweigungsstelle essentiell ist (Ruskin et al. 1988), aber im weiteren Reaktionsverlauf von den Spliceosomen wieder abdissoziiert (Staknis & Reed 1994). Weitere Proteine mit dieser Eigenschaft, sind das „Polypyrimidine tract-binding Protein“ (PTB), von dem mehrere Isoformen existieren (Patton et al. 1991; Ghetti A. et al. 1992), und - der PTB-assozierte Spleißfaktor (PSF).

1.6. Der PTB-assoziierte splicing Faktor (PSF)

Der PTB-assoziierte Spleißfaktor (PSF) ist ein aus 707 Aminosäuren bestehendes Protein mit apparentem Molekulargewicht von 100 kDa. PSF wurde zuerst in PTB reichen Fraktionen detektiert (Patton et al., 1991). In *in vitro*-Experimenten konnten Patton und Mitarbeiter 1993 außerdem nachweisen, dass es sich um einen essentiellen Spleißfaktor handelt, von dem sie vermuteten, daß er im frühen Stadium der Spliceosomenbildung benötigt würde. Später wurde PSF jedoch in isolierten C-Komplexen nachgewiesen; außerdem konnte gezeigt werden, daß eine PSF-Depletion den zweiten Schritt der Spleißreaktion komplett hemmt. Daher ist PSF vermutlich für ebendiesen Reaktionsschritt essentiell, wobei die Bindung an die polypyrimidinreiche Region aber wahrscheinlich schon während der Bildung des B-Komplexes erfolgt, während der das Protein vermutlich den snRNP Auxiliary Faktor (U2AF) ersetzt (Gozani et al., 1994). Die eigentliche Funktion, die PSF während des Spleißens ausübt, ist jedoch nicht genau bekannt, es wird aber angenommen, daß PSF bei der Erkennung des konservierten AG-Dinucleotids an der 3'-Spleißstelle des Introns eine wichtige Rolle spielt (Gozani et al. 1994).

Wesentliche strukturelle Einzelheiten des PSF sind bereits seit 1993 durch die Arbeiten von Patton und Mitarbeitern bekannt. So wird die RNA-Bindung vermutlich durch den N-Terminus des PSF vermittelt. Dort befinden sich drei RGG-Motive („RGG-Boxes“: 9-11, 19-21, 25-27), deren Arginin modifiziert ist (wahrscheinlich zu Dimethylarginin; Beyer et al. 1977) und die typische RNA-Bindungsmotive sind (Kiledjian & Dreyfuss 1992). Zwei weitere RNA-Erkennungsmotive von ca. 80 Aminosäuren befinden sich im Zentralteil des Proteins (RRM1: 282-364 und RRM2 371-444) (Kenan et al. 1991).

Desweiteren weist der N-Terminus eine sich über 229 Aminosäuren erstreckende Prolin-reiche Region auf (34-263: 38% P), innerhalb der ein begrenzter Abschnitt von 49 Aminosäuren sogar 88% Prolin/Glutamin enthält (P/Q-Region). Prolin-reiche Regionen spielen eine wichtige Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen (Williamson 1994), außerdem fungieren P- und P/Q-Regionen als Aktivierungsdomänen verschiedener Transkriptionsfaktoren (Courney & Tjian 1988; Tanese et al. 1991). PSF enthält mindestens zwei Kernlokalisierungssignale im C-Terminus, die beide erforderlich für eine vollständige Kernlokalisierung des Proteins sind. Es existieren zwei PSF-Isoformen: Der F-Isoform, deren Expression durch alternatives Spleißen reguliert wird, fehlen lediglich die 38 C-terminalen Aminosäuren und damit das C-terminale NLS, die ersten 662 Aminosäuren sind identisch. Diese Isoform ist vollständig cytoplasmatisch, wenngleich auch nur in geringen Mengen exprimiert (Patton et al. 1993; Dye & Patton 2001). Eine biologische Funktion ist für das cytoplasmatische PSF bislang nicht

bekannt (Dye & Patton 2001). Das C-terminale Kernlokalisierungssignal (701-707) mit der Sequenz PNKKPRF ist ein klassisches NLS, bei dem anderen (547-574) mit der Sequenz RRMEELHNOEMQ**KRK**EMQQLRQEEERRRR handelt es sich vermutlich um ein überlap-pendes zweiteiliges, eventuell auch um ein dreiteiliges NLS (Patton et al. 1993; Dye & Patton 2001).

Im Zellkern reichert sich PSF in sogenannten „speckles“ an, woran wahrscheinlich un-ter anderem das RRM2 als „Speckle-Lokalisierungssignal“ beteiligt ist (Dye & Patton 2001). Die klassischen „Speckle-Lokalisierungssignale“ wie die RS-Domänen der SR-Proteine (Li & Bingham 1991; Hedley 1995; Caceres et al. 1997) oder die Sm-Domänen der snRNP-Proteine (Malatesta et al. 1999) treten im PSF nicht auf.

Zu diesen „speckles“ gibt es widersprüchliche Untersuchungsergebnisse. Wahrschein-lich handelt es sich bei diesen nucleären Substrukturen um „Vorratslager“ für Spleißfaktoren (Misteli & Spector 1998; Sleeman & Lamond 1999), obwohl sie zumindest in einigen Fällen auch als potentielle Orte der Transkription beschrieben wurden, so daß inzwischen eine bidi-rektionale Migration vermutet wird, in der Transkriptionsfaktoren von den „Speckles“ zu den Transkriptionsorten und nascierende RNA zu den „Speckles“ transportiert wird (Melcak et al. 2000).

1.7. Zielsetzung der Arbeit

Zielsetzung der Arbeit war es, zum einen nähere Erkenntnisse zum Kernimport der PKC α zu gewinnen und zum anderen, zu untersuchen welche Funktionen das Enzym im Zellkern ausübt. Zu beiden Ansätzen gab es bereits Vorarbeiten aus unserer Arbeitsgruppe.

Bei den Untersuchungen zum Kernimport sollte das potentielle Kernlokalisierungssignal der PKC α unter Verwendung von GFP-Fusionsproteinen, die Fragmente der PKC α (Δ PKC α) enthielten, weiter eingegrenzt werden. Das zugrundeliegende Prinzip ist, mittels PCR Fragmente der PKC α -cDNA zu erzeugen, die verschiedenen Domänen des Enzyms entsprechen. Diese DNA-Fragmente werden in geeignete Expressionsvektoren ligiert. Nach Transfektion mit den resultierenden Plasmiden werden Säugerzellen die Fragmente als GFP-Fusionsproteine exprimieren, deren subzelluläre Verteilung dann mittels eines Fluoreszenzmikroskopes untersucht werden kann. Im Idealfall wäre zu erwarten, daß mindestens ein Fragment der PKC α in den Zellkern translokieren sollte, nämlich dasjenige, welches das NLS trägt. Diese Kerntranslokation sollte außerdem unabhängig von der Zugabe von Aktivatoren erfolgen, da die regulatorische Wirkung des restlichen Enzyms entfällt. Das NLS-tragende Fragment kann nun durch analoge Schritte weiter geteilt oder verkürzt und so das NLS sukzessive weiter eingegrenzt werden. Aufgrund vorangegangener Arbeiten von Stefan Wagner (1999; 2000), die nach dem oben beschriebenen Vorgehen durchgeführt wurden und die die Basis für den ersten Teil dieser Arbeit bildeten, wurde in unserem Labor das Kerntranslokationssignal am N-Terminus der PKC α vermutet (Δ PKC α 1-187).

Das als NLS fungierende PKC α -Fragment sollte dann nach seiner Identifikation in *E.coli* exprimiert und für Bindungstests eingesetzt werden, die die Ermittlung eines Importfaktor-ähnlichen Proteins möglich machen sollten.

Bei der Bearbeitung der Frage, welche Aufgaben die PKC im Zellkern erfüllt, erschien es zweckmäßig, zunächst nach nucleären Substraten und Bindungspartnern zu suchen. Es lagen in unserem Labor bereits Hinweise aus vorangegangenen Arbeiten von Uwe Rosenberger (1997) vor, nach denen der Spleißfaktor PSF sowohl ein PKC α bindendes Protein, als auch ein schwaches nucleäres Substrat dieses Enzyms sein könnte. Uwe Rosenberger gelang es zwar nicht, einen direkten Einfluß der PKC auf den Vorgang des Spleißens nachzuweisen, trotzdem sollte es besonders aufregend sein, diesen Hinweisen nachzugehen, da bislang überraschenderweise noch kein einziges PKC-bindendes Protein im Zellkern beschrieben wurde.

Von den Untersuchungen zu PSF ausgehend, sollten dann weitere Substrate im Zellkern gesucht und diese gegebenenfalls näher untersucht werden. Hierzu wurden in unserer Ar-

beitsgruppe bereits Vorarbeiten von Roland Beckmann (1992) durchgeführt. Allerdings ist zu vermuten, daß er viele Proteine, insbesondere viele der interessanten integralen Proteine der inneren Kernmembran aufgrund ihrer Hydrophobizität mit der von ihm verwendeten Methode der 2D-Gelelektrophorese nicht detektieren konnte. Besonders erfolgversprechend schien mir aus diesem Grunde der Einsatz der BAC-SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zu sein, die eine Auftrennung gerade solcher Proteine ermöglicht.