2. Ergebnisse

2.1. Suche nach dem NLS der PKCα

Aufgrund vorangegangener Arbeiten von Stefan Wagner (1999; 2000), die auf dem Einsatz von Deletionsmutanten der PKC α (Δ PKC α -Konstrukten) beruhten, wurde in unserem Labor das Kerntranslokalisationssignal am N-Terminus der PKC α vermutet (Δ PKC1-187). Um diese Region auf die eigentlich NLS-Sequenz eingrenzen zu können, schien es zweckmäßig, ebenfalls auf die Methode der Expression von PKC α -Deletionsmutanten zurückzugreifen (s. Kapitel 1.7).

Die Aminosäuren 1-187 enthalten die Pseudosubstratregion (19-36) und die aus zwei Zinkfingermotiven (C1a 36-87; C1b 102-153) bestehende C1 Region (Azzi et al. 1992). Es lag daher nahe, die C1-Domäne in ihre beiden Subdomänen C1a und C1b zu teilen, um zu sehen, welche von ihnen den Kerntransport vermittelt, und so sollten zunächst von der Δ PKC1-187 codierenden DNA mittels PCR zwei DNA-Fragmente erzeugt werden, die jeweils genau für die Hälfte des Proteins kodieren und eine Zinkfingerregion enthalten (Δ PKC1-93 und Δ PKC93-187). Allerdings mußte dabei beachtet werden, daß Makromoleküle bis zu einer Größe von 45 kDa über die lateralen Kanäle des Kernporenkomplexes frei in den Zellkern diffundieren können. Die von Stefan Wagner verwendete GFP- Δ PKC α (1-187) mit einer Verbindungsregion von 47 Aminosäuren weist eine Größe von ca. 52 kDa auf (Wagner 1999) und liegt schon sehr nah an dieser Ausschlußgrenze. Eine weitere Verkürzung der Δ PKC α würde es unter Umständen unmöglich machen zu entscheiden, ob dem Kernimport der Proteine ein aktiver Transportmechanismus zugrunde liegt, oder ob die Proteine lediglich in den Kern hineindiffundiert sind und sich dort beispielsweise durch Bindung an Ankerproteine angereichert haben.

2.1.1. Die pHMΔPKCα-Konstrukte

Um das Größenproblem zu lösen schien es eine gute Möglichkeit zu sein, die für Δ PKC1-93, Δ PKC93-187 und Δ PKC1-187 codierenden DNA-Fragmente in den pHM830-Vektor von T. Stamminger zu ligieren (Sorg & Stamminger 1999), dessen Klonier-/ Schnittstellenbereich zwischen der cDNA für GFP und der für β -Galaktosidase liegt. Das resultierende Plasmid würde folglich für das Fusionsprotein GFP- Δ PKC- β Gal codieren, und die β -Galaktosidase (116 kDa) sollte ausreichend groß sein, um eine Diffusion definitiv auszuschließen. Ein weiterer Vorteil war, daß der Vektor exakt für die NLS-Suche bei Proteinen in Säugerzellen konzipiert und daher bereits auf seine Tauglichkeit getestet wurde (Sorg & Stamminger 1999).

Allerdings besteht die Möglichkeit, daß ein NLS der PKC eventuell aus sterischen Gründen nicht richtig erkannt werden könnte, da die Δ PKC α (etwa 10 kDa [1-93;93-187] bzw. 20 kDa [1-187]) zwischen zwei vergleichsweise großen Proteinen (27 kDa [GFP] und 116 kDa [β Gal]) lokalisiert wäre. Außerdem hatte bereits Stefan Wagner gezeigt, daß die subzelluläre Verteilung der von ihm untersuchten Fusionsproteine stark davon abhing, ob die Δ PKC α C-terminal oder N-terminal fusioniert mit GFP vorlag (Wagner 1999). Aus diesem Grunde wurde der Vektor pHM830 modifiziert und letztlich zwei Serien von Plasmiden hergestellt. Die eine codiert Proteine, in denen die Δ PKC α N-terminal fusioniert mit β -Galaktosidase vorliegt (GFP- β Gal- Δ PKC α , s. Abb. 7), sie wird im folgenden mit pHM Δ PKC α C liegt Δ PKC α am C-Terminus mit GFP fusioniert vor ($\Rightarrow \Delta$ PKC α -GFP- β -Gal; s. Abb. 7). Mit diesen beiden Serien von Plasmiden wurden NIH 3T3-Fibroblasten transfiziert (s. Abb. 5a und 5b). Als Kontrolle diente eine leicht modifizierte Form des Vektor pHM830 (,pHM ohne MCS" \Rightarrow GFP- β Gal; s. Abb. 7).

Die Verteilung des Kontrollproteins GFP- β -Galaktosidase (s. Abb. 4) zeigt die erwartete cytosolische Verteilung und keine bzw. eine zu vernachlässigende Translokation in den Zellkern. Die Zellen sehen nicht geschädigt aus. Desweiteren ändert sich die subzelluläre Verteilung von GFP- β -Galaktosidase bei Zugabe von PMA nicht (Daten nicht gezeigt).



Abb. 4: Lokalisation von GFP-β-Galaktosidase und DiGFP in NIH 3T3-Fibroblasten

Die subzelluläre Verteilung der sechs Δ PKC α -Fusionsproteine (1-93N, 1-187N, 93-187N und 1-93C, 1-187C, 93-187C) ist in Abb. 5a und Abb. 5b dargestellt. Allgemein läßt sich feststellen, daß die Zellen stark angegriffen aussehen, sobald sie Fusionsproteine exprimieren, die PKC-Fragmente enthalten. Die Expression solcher Fusionsproteine scheint daher eine hohe toxische Wirkung auf die Zellen zu haben. Die Fusionsproteine an sich liegen zum größten Teil in Aggregaten vor, besonders die, die das PKC α -Fragment 1-187 enthalten. Form und Größe der Aggregate variieren von Zelle zu Zelle und auch die subzelluläre Verteilung der Aggregate schwankt stark. Meist ist sie cytosolisch, gelegentlich auch perinucleär, im Zellkern sind die Aggregate jedoch nie zu finden.

Diese Aggregate sind neben der für jede Zelle individuellen Stärke der Proteinexpression dafür verantwortlich, daß lediglich aus der subzellulären Verteilung der Proteine, nicht aber aus der relativen Intensität der GFP-Signale Schlußfolgerungen gezogen werden dürfen. Die Intensität mußte für alle Aufnahmen unterschiedlich stark reguliert werden, da gerade die Aggregate besonders hell erscheinen und dazu neigen, die restlichen Teile der Zelle zu überstrahlen.

Der nicht aggregierte Teil der Proteine ist in der Regel im Cytoplasma lokalisiert und läßt sich gut durch Zugabe von PMA stimulieren, was deren Translokation zur Plasmamembran zur Folge hat. Das ist insbesondere deshalb ein überraschendes Ergebnis, da die von Stefan Wagner 1999 beschriebene Translokation der Region 1-187 in den Zellkern nicht bestätigt werden konnte.

Eine Ausnahme von diesen allgemeinen Beobachtungen stellen lediglich 93-187N und 93-187C dar. Bei beiden Proteinen ist in seltenen Fällen (bei weniger als 1 % der transfizierten Zellen) eine Lokalisation im Zellkern nach PMA-Stimulation zu beobachten. Von einer echten Anreicherung im Zellkern kann jedoch beim 93-187C auch in diesen Ausnahmen nicht gesprochen werden, da die Lokalisation im Zellkern höchstens so lange zunimmt, bis das Fusionsprotein gleichmäßig über die gesamte Zelle verteilt ist. Interessanterweise fällt dieses Protein auch dadurch auf, daß es das einzige ist, bei dem sich die PMA-Stimulation nicht durch eine Translokation zur Plasmamembran äußert. Das 93-187N ist hingegen bereits vor der PMA-Stimulation gleichmäßig über die Zelle verteilt. Die Stimulation führt allerdings neben der beschriebenen seltenen Anreicherung im Zellkern auch stets zu der üblichen Translokation des Fusionsproteins an die Plasmamembran. Sowohl die 93-187C-, als auch 93-187N-expremierenden Zellen lassen sich jedoch überraschend schlecht stimulieren und reagieren zu mehr als 90 % überhaupt nicht auf die Zugabe von PMA.



Abb. 5a: Lokalisation von N-terminal mit β-Galactosidase fusionierten PKC-Deletionsmutanten (C1a-, C1a&C1b-, C1b-Domäne) in NIH3T3-Fibroblasten vor und nach PMA-Stimulation



Abb. 5b: Lokalisation von C-terminal mit β-Galactosidase fusionierten PKC-Deletionsmutanten (C1a-, C1a&C1b-, C1b-Domäne) in NIH3T3-Fibroblasten vor und nach PMA-Stimulation

Das Auftreten der Aggregate scheint neben der Toxizität der Δ PKC α -GFP-Fusionsproteine eines der Kernprobleme dieses Ansatzes zu sein, und es lag die Vermutung nahe, dass die β -Galaktosidase einen maßgeblichen Anteil daran hat, obgleich ein vergleichbares Problem von Sorg und Stamminger (1999) nicht beschrieben wurde. Das Enzym enthält eine etwa 50 Aminosäuren umfassende α -Region, mit deren Hilfe, das Enzym tetramerisieren kann (Moosmann & Rusconi 1996). Diese Tetramerisierung ist normalerweise ein Teilschritt zur Aktivierung der β -Galaktosidase. In den 3T3-Zellen aber könnten diese Oligomerisierungsstellen möglicherweise zur Aggregation führen, da β -Galaktosidase ein bakterielles Enzym ist und für eine eukaryontische Zelle somit ein zellfremdes Protein darstellt.

Um dieses Problem zu lösen müßte also entweder die α -Region eliminiert, oder noch besser, nach einer Alternative zur β -Galaktosidase gesucht werden, um die Größe der Δ PKC α -GFP-Fusionsproteine zu erhöhen und dadurch die freie Diffusion der Proteine in den Zellkern zu verhindern. Eine Lösungsmöglichkeit wäre beispielsweise, die β -Galaktosidase durch ein zusätzliches GFP zu ersetzen, da GFP die subzelluläreVerteilung der PKC α -Fragmente nicht beeinflußt (Wagner 1999). Außerdem weisen die beiden GFP zusammen ein Molekulargewicht von etwa 55 kDa auf. Das folgende Kapitel beschreibt daher die Herstellung neuer Vektoren, deren codierte PKC α -Fragmente mit DiGFP-Einheiten fusioniert sind.

2.1.2. Die pHMΔPKCαDiGFP-Konstrukte

Um auszuschließen, daß die im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Probleme der Aggregatbildung durch den β -Galaktosidasebestandteil der von den Zellen exprimierten Fusionsproteine verursacht werden, wurde die β -Galaktosidase durch ein weiteres GFP ersetzt. Die resultierende DiGFP-Einheit sollte ca. 55 kDa groß sein, was ausreichen sollte, um die passive Diffusion der Δ PKC α durch die Kernpore auszuschließen. Die entsprechenden Expressionsvektoren leiten sich ebenfalls von pHM830 ab und unterscheiden sich von den pHM Δ PKC α -Konstrukten formal lediglich durch eine GFP-codierende DNA-Sequenz, die sich in dem Vektor anstelle der β -Galaktosidase-codierenden Sequenz befindet. Die beiden Serien werden deshalb im folgenden als pHM Δ PKC α NDi bzw. pHM Δ PKC α CDi und ihre codierten Proteine als Δ PKC α NDi bzw. Δ PKC α CDi bezeichnet (s. Abb. 7). Zur Transfektion wurden wieder NIH 3T3-Fibroblasten verwendet.



Abb. 6a: Lokalisation von DiGFP-PKC-Deletionsmutanten (C1a-, C1a&C1b-, C1b-Domäne) in NIH3T3-Fibroblasten vor und nach PMA-Stimulation



Abb. 6b: Lokalisation von DiGFP-PKC-Deletionsmutanten (C1a-, C1a&C1b-, C1b-Domäne) in NIH3T3-Fibroblasten vor und nach PMA-Stimulation



Abb. 7: Expressionsvektoren und Schemata der von ihnen codierten Fusionsproteine

Der Kontrollvektor codiert lediglich für die DiGFP-Einheit (pHMDiGFP \Rightarrow GFP-GFP; s. Abb. 7), die bereits von sich aus Kerntranslokation und Anreicherung im Zellkern zeigt (Abb. 4). Das könnte darauf hinweisen, daß die besondere Struktur des GFP-Dimers es dem Protein ermöglichen könnte, sich wie einzelne Glieder einer Kette durch die lateralen Kanäle des Kernporenkomplexes "hindurchzufädeln". Zumindest zeigt aber auch das GFP-Dimer keine Änderung in seiner subzellulären Verteilung als Reaktion auf die Zugabe von PMA (Daten nicht gezeigt).

Vektor	Kernlokalisation ^{*1)} -PMA / +PMA (verstärkt)	PMA-Stimu PM	lierbarkeit ^{*2)} KM	Aggregatbildung
"pHM ohne MCS"	Nein / Nein	-	-	Nein
pHM1-93N	Nein / Nein	+	-	mittel
pHM1-187N	Nein / Nein	+	-	stark
pHM93-187N	schwach / Ja	+	-	mittel
pHM1-93C	Nein / Nein	+	-	mittel
pHM1-187C	Nein / Nein	+	-	stark
PHM93-187C	schwach / Nein	-	-	gering
DiGFP	Ja / Nein	-	-	Nein
pHM1-93NDi	Ja / Nein	+	+	gering
pHM1-187NDi	Ja / Nein	+	+	mittel
pHM93-187NDi	schwach / Nein	-	-	gering
pHM1-93CDi	Ja / Nein	+	+	gering
pHM1-187CDi	Ja / Nein	+	+	mittel
PHM93-187CDi	schwach / Nein	-	gering bis mittel	

Tabelle I: Tabellarische Übersicht über die Lokalisation der GFP-Fusionsproteine

 Die Angabe "-PMA" gibt an, ob sich das betreffende Fusionsprotein ohne Stimulation im Zellkern befindet, die Angabe "+PMA", ob sich das GFP-Signal im Kern bei PMA-Zugabe verstärkt.

 Diese Angabe bezieht sich darauf, ob das Protein nach PMA-Zugabe an die Plasmamembran (PM), die Kernmembran (KM) oder überhaupt nicht transloziert.

Die subzelluläre Verteilung der DiGFP-Fusionsproteine ist in Abb. 6a und in Abb. 6b dargestellt. Offenbar translozieren alle untersuchten Proteine in den Zellkern und sind in der Intensität ihrer Translokation kaum voneinander zu unterscheiden. Außerdem ist ihre Translokation zu schwach, um von einer wirklichen "Anreicherung" im Zellkern zu sprechen wie sie für einen aktiven Kernimport via NLS zu erwarten wäre, so daß es sich bei dem Importmechanismus wohl eher um den einer passiven Diffusion handelt. Auffallend ist die deutlich geringere Neigung der Proteine zur Aggregatbildung im Vergleich zu den β -Galaktosidase enthaltenden Proteinen. Desweiteren bestätigt sich die schon unter 3.1.1 beschriebene Beobachtung, daß die Tendenz zur Aggregatbildung bei den Δ PKC α 1-187-Fusionsproteinen am stärksten ausgeprägt ist. Wieder zeigen die Proteine eine durch PMA-Zugabe induzierte Translokation, in diesem Fall jedoch sowohl zur Plasma-, als auch zur Kernmembran, und

wieder sind es die beiden $\Delta PKC\alpha 93-187$ enthaltenden Fusionsproteine, die aus der Reihe fallen. Sowohl $\Delta PKC\alpha 93-187$ CDi, als auch $\Delta PKC\alpha 93-187$ NDi zeigen praktisch keine oder höchstens eine schwache Reaktion auf die Stimulation durch PMA, die sich aber im Gegensatz zu ihren β -Galaktosidase enthaltenden Analoga lediglich in einer schwachen Translokation zur Plasma- und Kernmembran, nicht jedoch in einer verstärkten Anreicherung im Zellkern äußert.

Insgesamt ließ sich das Problem der Aggregatbildung jedoch nicht vollständig lösen, was darauf hinweist, daß das Problem direkt mit den zu untersuchenden PKC α -Fragmenten zu tun hat und die Größe des Restproteins eher wie ein "Verstärker" für die Aggregatbildung wirkt.

Auch das Verhalten der ebenfalls hergestellten MonoGFP-Konstrukte paßt in dieses Bild. Diese sind den DiGFP-Fusionsproteinen analog und wie erwartet, ist die subzelluläre Verteilung der Fusionsproteine in unstimulierten Zellen identisch mit der des DiGFP in Abb. 4. Durch PMA-Zugabe erfolgte bei allen Konstrukten eine Translokation zu Plasmaund Kernmembran, die bei den Δ PKC α 93-187-Fusionsproteinen wiederum etwas schwächer ausfiel (Daten nicht gezeigt).

Die Ergebnisse zur Lokalisation und Aggregatbildung aller in den Kapiteln 2.1.1 und 2.1.2 beschriebenen GFP-Fusionsproteine sind zur Übersicht in Tabelle I zusammengestellt.

2.2. PSF als PKCa-bindendes Protein im Zellkern

Welche Vorgänge werden von der PKC α im Zellkern reguliert? Zur Beantwortung dieser Frage war es zweckmäßig, zunächst einmal den Vermutungen nachzugehen, die sich auf vorangegangene Arbeiten unseres Labors stützten. Aus einigen Experimenten von Uwe Rosenberger (1997) hatten sich Hinweise ergeben, daß der Splicing-Faktor PSF ein PKC α bindendes Protein sein könnte – und das wäre das erste bekannte PKC-bindende Protein im Zellkern.

2.2.1. Charakterisierung der verwendeten Antikörper

Für die Experimente zum PTB-assoziierten Spleißfaktor (PSF) wurde ein Antiserum verwendet, das gegen das Peptid CQREMEEQMRRQREES (Aminosäuren 582-596 der PSF-Sequenz) hergestellt wurde. Um die geeignete Verdünnung zu ermitteln und die Spezifität des PSF-Antiserums von Kaninchen 1 (anti-PSF_{K1}) zu testen, wurden 10 μ g Nucleoplasma über SDS-PAGE aufgetrennt. Die Proteine des Gels wurden anschließend auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und dann mittels einer Ponceau-Färbung sichtbar gemacht. Die Membran wurde in Streifen geschnitten, wobei jede Spur in zwei etwa gleich breite Hälften geteilt wurde. Die einzelnen Streifen wurden nun in unterschiedlichen Verdünnungen von anti-PSF_{K1} inkubiert. Der Immunoblot dieser Verdünnungsreihe ist in Abb. 8 (Spur A bis D) dargestellt. Das Antiserum zeigt bis zu einer Verdünnung von 1:10.000 noch ein deutliches PSF-Signal bei 100 kDa, die für einen Immunoblot geeignete Verdünnung liegt gemäß dieser Verdünnungsreihe bei etwa 1:2000 oder noch besser 1:5000. Für die durchgeführten und im folgenden beschriebenen Experimente wurde anti-PSF_{K1} ebenfalls in einer Verdünnung von 1:5000 eingesetzt.

Um die Spezifität des Antiserums zu testen, wurde versucht, anti-PSF_{K1} durch die Gegenwart des Peptides CQREMEEQMRRQREES in unterschiedlichen Konzentrationen zu hemmen. Das Ergebnis dieser Testreihe ist ebenfalls in Abb. 8 (Spur E bis G) dargestellt und zeigt, daß das Auftreten der PSF-Bande bei 100 kDa bei allen getesteten Peptidkonzentrationen nahezu vollständig unterdrückt wird, so daß auch an der Spezifität des Antikörpers nichts auszusetzen ist.

Desweiteren wurde anti- PSF_{K1} auf seine Tauglichkeit zur Immunpräzipitation getestet. Wie Abb. 8 zeigt, erfüllt das Antiserum auch dieses Kriterium: Die Spur des Antiserums zeigt eine starke PSF-Bande, die in der Spur des Normalserum fehlt.



Abb. 8A: Verdünnungsreihe des Antiserums: 1:1000 (Spur A), 1:2000 (Spur B), 1:5000 (Spur C), 1:10.000 (Spur D); kompetitive Hemmung von anti-PSFK1 (1:2000) durch das Peptid CQREMEEQMRRQREES: 200 μg/ml (Spur E), 100μg/ml (Spur F), 50 μg/ml (SpurG).

Abb. 8B: Immunpräzipitation von PSF aus 100 µg Kernextrakt in NP-40-Puffer mit 2 µl Normalserum (NS) und 2 µl anti-PSFK1 (AS) (Sypro-Ruby-Färbung der Blotmembran)

Überraschenderweise erscheint die Bande jedoch bei einem deutlich höheren Molekulargewicht als dem erwarteten (und von der Verdünnungsreihe gezeigten) von ca. 100 kDa. Diese "Größenverschiebung" wurde stets als Begleiterscheinung einer PSF-Immunpräzipitation mit anti-PSF_{K1} beobachtet. Die Zweifel, daß es sich bei dem präzipitierten Protein tatsächlich um den Spleißfaktor handelt, konnten durch eine Sequenzierung mittels Maldi-Massenspektrometrie ausgeräumt werden.

Trotz der guten Ergebnisse in Westernblot und Immunpräzipitation zeigte sich in einer weiteren Testreihe, daß anti- PSF_{K1} für immuncytochemische Methoden ungeeignet ist, da es unabhängig vom Grad seiner Verdünnung im wesentlichen gleichmäßig die gesamte Zelle färbt (Daten nicht gezeigt), was möglicherweise daran liegen könnte, daß das Epitop in der lebenden Zelle durch PSF-bindende Proteine maskiert vorliegt.

2.2.2. Untersuchung zum PTB-assoziierten Spleißfaktor (PSF)

Um eine Wechselwirkung zwischen PSF und PKCα zu überprüfen, bot sich der Einsatz eines "pull-down"-tests an, da PKCα, die mit Glutathion-S-Transferase (GST) fusioniert war, in großen Mengen in Insektenzellen exprimiert und über eine Glutathionsepharose-Säule aufgereinigt werden konnte. Eine genaue Charakterisierung des GST-PKCα-Fusionsproteins inklusive Messungen der katalytischen Aktivität wurde von Stefan Wagner (1999) durchgeführt und beschrieben. Der Test funktioniert ähnlich einer Immunpräzipitation, die PKCa wird lediglich nicht mit Antikörpern, sondern über ihre GST-Domäne durch Zugabe von Glutathion-Sepharose-"Beads" gefällt.

Um nun die Existenz einer PKC-PSF-Bindung zu überprüfen, wurde frisch präparierter Kernextrakt aus Neuro2a-Kernen mit GST-PKCα versetzt. Außerdem wurden der Mischung noch Glutathionsepharose -"Beads" und verschiedene Effektoren (Ca²⁺, PMA und Staurosporin) hinzugegeben. Nach 90 min Inkubation wurden die "Beads" der einzelnen Proben abzentrifugiert, gewaschen und anschließend die gefällte GST-PKC samt ihrer copräzipitierten Proteine über SDS-PAGE und anschließenden Westernblot analysiert.

Wie Abb. 9 zeigt, detektierte der anti-PSF-Antikörper auf dem Blot mit der GST-PKC α mitgefälltes PSF. Interessanterweise wurde nicht in jeder Spur gleichviel PSF gefällt, vielmehr zeigt der Blot in den Spuren der Proben, denen Effektoren zugesetzt wurden ein besonders starkes PSF-Signal. Diese Verstärkung des Signals kann als eindeutiger Beleg dafür gewertet werden, daß diePKC-PSF-Bindung von der Konformation des Enzyms abhängig ist und die Bindung insbesondere dann erfolgt, wenn die PKC α in ihrer katalytisch aktiven Konformation vorliegt. Durch "Strippen" der Blotmembran und anschließende Behandlung des Blots mit anti-PKC α -Antikörper wurde sichergestellt, daß die unterschiedliche Ausprägung der PSF-Signale nicht etwa darauf zurückzuführen ist, daß über die Glutathionsepharose-"beads" unterschiedliche Mengen GST-PKC α gefällt wurden.

anti-PSF					anti-PKCa					
					116	-	_	_	-	-
				-	- 97 -	2.0	-	-		
					- 67 -	1000	-			
	Ι.	Ι.	Ι.	Ι.		Ι.	Ι.	Ι.	I. I	Ι.
+	+	+	+	+	GST-PKCa	+	+	+	+	+
-	+	+	+	+	Kernextrakt	-	+	+	+	+
-	-	+	-	-	Staurosporin	-	-	+	-	-
-	-	-	+	-	Ca ²⁺	-	-	-	+	-
-	-	-	-	+	PMA	-	-	-	-	+

Abb. 9: Der Western-Blot der pelletierten Glutathion-Sepharose "Beads", einmal mit anti-PSFK1 (links) und einmal mit anti-PKC-Antikörper (rechts) behandelt.

Nach der Feststellung, daß PKC α aktivierungsabhängig PSF bindet, drängt sich förmlich die Frage auf, ob PSF auch ein Substrat der PKC α ist.

Um auch auf diese Frage eine Antwort zu finden, wurde frischer Kernextrakt aus Neuro2a-Kernen *in vitro* phosphoryliert und anschließend das PSF mit dem Antiserum anti-PSF_{K1}

immunpräzipitiert. Die Proteine des Immunpräzipitationspellets wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, die Gele geblottet und von den Blotmembranen die in Abb. 10 dargestellte Autoradiographie angefertigt. Um sicherzustellen, daß die schwache Bande (s. Pfeil) mit PSF comigriert, wurde die Blotmembran anschließend mit dem Antiserum anti-PSF_{K1} behandelt (s. Abb 10).

Wie in Abb. 10 gezeigt, comigriert die markierte Bande mit PSF, das folglich ein ausgesprochen schwaches in vitro-Sustrat ist.



Abb. 10: Autoradiographie und Western-Blot des Immunpräzipitationspellets von zuvor in vitro phosphoryliertem PSF

2.3. Substrate der PKCa an der inneren Kernmembran

Da PSF lediglich ein schwaches in vitro-Substrat ist, stellt sich nun die Frage, welche Proteine denn nun eigentlich Substrate nucleärer PKCα sind. Neue Substrate würden eventuell Rückschlüsse darauf zulassen, welche Vorgänge im Nucleus von dem Enzym reguliert werden. Zahlreiche nucleäre Substrate sind bereits bekannt (s. Kapitel 1.4), aber insbesondere eine Untersuchung der Kernmembran sollte erfolgversprechend sein, da sich in der Vergangenheit voraussichtlich viele der hydrophoben Membranproteine dem experimentellen Zugriff entzogen haben. Diese Einschätzung beruhte auf der Entwicklung neuer Methoden, wie insbesondere der BAC-SDS-PAGE (Mc Farlane et al. 1989; Hartinger et al. 1996), die in unserem Labor von Henning Otto und Mathias Dreger etabliert wurden. Aufgrund der Gegenwart ionischer Detergentien in beiden Dimensionen ist diese Technik gut zur zweidimensionalen Auftrennung hydrophober Membranproteine geeignet und in dieser Hinsicht der klassischen 2D-Gelelektrophorese, wie sie auch Roland Beckmann bei seiner Suche nach PKC-Substraten in der Kernmembran benutzte (1992), weit überlegen.

2.3.1. Phosphorylierung der Kernmembran

Zunächst wurden je 50 µg frisch präparierter Kernmembran in Phosphorylierungspuffer suspendiert und in vitro mit PKC α in Gegenwart von γ -ATP phosphoryliert. Als Kontrolle diente eine Probe bei der der Phosphorylierungsansatz ohne Zugabe von PKC \Box durchgeführt wurde, und die somit die Hintergrundaktivität endogener Kinasen darstellen sollte. Als zusätzliche Kontrolle wurde einer Probe neben PKC α auch der PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid (BIM) zugesetzt.

Anschließend wurden die Reaktionen durch eine TCA-Fällung der Proteine gestoppt und die Kernmembran der jeweiligen Proben abzentrifugiert. Das jeweilige Pellet wurde einmal in Posphorylierungspuffer gewaschen und dann mittels BAC-SDS-PAGE zweidimensional aufgetrennt. Die Proteine der Gele wurden mit Coomassieblau gefärbt, die Gele zwischen zwei Zellophanfolien getrocknet und über Nacht auf einem Phosphoimagerscreen exponiert.

Abb. 11 zeigt das Ergebnis dieser Versuchsreihe. Tatsächlich konnten in den Autoradiographien der Proben, denen PKC α zugesetzt worden war, mehrere Spots ausgemacht werden, die in der Autoradiographie der "Hintergrundphosphorylierung" fehlten. Diese Spots erscheinen deutlich abgeschwächt, wenn dem Phosphorylierungsansatz BIM zugesetzt wurde, allerdings scheint BIM nicht in der Lage zu sein, die Aktivität der exogen zugesetzten PKC α vollständig zu hemmen. Die betreffenden Spots der Autoradiographie wurden ihren Pendants im coomassiegefärbten Gel zugeordnet (s. Pfeilspitzen in Abb. 11), aus diesem ausgestochen und dann mittels MALDI-Massenspektrometrie identifiziert. Das Ergebnis der Analyse ist in Tabelle II zusammengefasst.

Die meisten der identifizierten Substrate der PKCα sind als solche schon literaturbekannt, Vimentin zumindest als PKCδ-Substrat und daß PSF immerhin ein schwaches *in vitro*-Substrat der PKCα ist, wurde in dieser Arbeit bereits gezeigt (s. Kapitel 2.2.2). Die gute Übereinstimmung mit der Literatur und den vorangegangenen Experimenten belegen die Tauglichkeit der BAC-SDS-PAGE bei der Suche nach PKC-Substraten in der Kernmembran.

Allerdings schränkt die hohe Dichte an verschiedenen Proteinen in der Kernmembran das Potential dieser Methode offensichtlich stark ein, da viele Spots nicht ausreichend getrennt werden und dicht nebeneinander, zum Teil auch übereinander liegen. Dadurch wird es zum einen schwierig, in der Autoradiographie identifizierte Substrate den coomassiegefärbten Proteinen der Gele zuzuordnen und zum anderen, die Spots für die Messung im Massenspektrometer sauber auszustechen. Außerdem werden Proteine, die in großen Mengen vorhanden oder besonders gute Substrate sind wahrscheinlich andere Substrate in ihrer Nähe überstrahlen und so deren Entdeckung unmöglich machen.

Spot	Protein	Größe	Literaturbekannt als PKCα-Substrat
1	Scaffold attachment factor A (SAF-A)/ Heterogenes nucleäres Ribonucleoprotein U (hnRNP U)	91 kDa	Nein
2	PTB-assoziierter Splicing Faktor (PSF)	75 kDa	Nein
3,4	Lamin B1	67 kDa	PKCα: Shimizu et al. (1998)
5	Vimentin	54 kDa	(Nein), PKCδ: Owen et al. (1996)
6	Lamina assoziiertes Protein 2β (LAP 2β)	51 kDa	PKCα: Dreger et al. (1999)
7	B23/Numatrin	38 kDa	PKCα: Beckmann et al. (1992)

Tabelle II: Identifizierte in vitro-Substrate der PKCa in der Kernmembran



Abb. 11: Phosphorylierung der Kernmembran

- A) Kernmembran mit PKCα
- C) Kernmembran Hintergrundphosphorylierung endogener Kinasen
- E) Kernmembran mit PKCα und BIM
- B) Coomassiegefärbtes Gel zur Autoradiographie A
- D) Coomassiegefärbtes Gel zur Autoradiographie C
- F) Coomassiegefärbtes Gel zur Autoradiographie E

2.3.2. Phosphorylierung der Triton X-100-resistenten Fraktion der Kernmembran

Um die hohe Anzahl der aufzutrennenden Proteine und dadurch die Dichte ihrer Spots in den BAC-SDS-PAGE-Gelen zu senken, wurde die von Mathias Dreger und Mitarbeitern (2001) beschriebene Tritonextraktion der Kernmembran durchgeführt. Dabei war beobachtet worden, daß durch die Behandlung der Kernmembran mit dem nichtionischen Detergens Triton X-100 die Proteine der äußeren Kernmembran und des rauen endoplasmatischen Retikulums weitestgehend entfernt werden. Die Proteine der inneren Kernmembran, und damit der interessantere Teil, bleiben hingegen erhalten, so daß man sich modellhaft vorstellen kann, daß die äußere Kernmembran durch das Detergens gleichsam "abgeschält" wird. Pro geplantem Phosphorylierungsansatz wurden 90 µg frisch präparierte Kernmembran für die Tritonextraktion eingesetzt. Das resultierende Pellet, das die Triton X-100 resistente Fraktion darstellte, wurde in Phosphorylierungspuffer resuspendiert und *in vitro* mit PKC α in Gegenwart von γ -ATP phosphoryliert. Als Kontrolle diente erneut eine Probe, die die Hintergrundaktivität zeigen sollte und bei der der Phosphorylierungsansatz somit ohne Zugabe von PKC α durchgeführt wurde. Das restliche Vorgehen war analog zu dem bei 2.3.1 beschriebenen:

Die Reaktionen wurden durch eine TCA-Fällung der Proteine gestoppt und die Kernmembran der jeweiligen Proben abzentrifugiert. Das jeweilige Pellet wurde einmal in Posphorylierungspuffer gewaschen und dann mittels BAC-SDS-PAGE zweidimensional aufgetrennt. Die Proteine der Gele wurden mit Coomassieblau gefärbt, die Gele zwischen zwei Zellophanfolien getrocknet und über Nacht auf einem Phosphoimagerscreen exponiert.

Abb. 12 zeigt das Ergebnis dieses Versuchs. Tatsächlich sind in Vergleich zu Abb. 11 erheblich weniger Proteinspots auf den coomassiegefärbten Gelen zu erkennen, während deutlich mehr Differenzspots in den Autoradiographien ausgemacht werden können, als bei der Auftrennung der kompletten Kernmembran (vgl. Abb. 11), da die Gele nicht so "überladen" sind.

Die Differenzspots werden aus den Gelen ausgestochen und mittels MALDI-Massenspektrometrie identifiziert. Das Ergebnis der Analyse ist in Tabelle III zusammengefasst.

A) Hintergrund

PKC-Phosphorylierung



- C) A) Autoradiographie der Hinter-
- B) Autoradiographie der Phosphorylierung mit PKCα

grundphosphorylierung

C) Coomassiegefärbtes Gel zur Autoradiographie B)





Coomassiefärbung von B)



Abb.	12. Ergebnisse de	Phosphorylierung des	Triton X-100-resistenten	Kernmembranfraktion
------	-------------------	----------------------	--------------------------	---------------------

Spot	Protein	Größe	Literaturbekannt als PKCQ-Substrat
1	RNA-Helicase	94 kDa	Nein
2,3	Lamin B1	67 kDa	PKCα: Shimizu et al. (1998)
4	Lamin B2	67 kDa	PKCα: Beckmann et al. (1992)
5	Ribophorin II	66 kDa	Nein
6	hnRNP L	64 kDa	Nein
7	Heterochromatin protein 2, binding Protein 3	61 kDa	Nein
8	Ott Protein	52 kDa	Nein
9	hnRNP A3	40 kDa	Nein
10	hnRNP A2/B1	36 kDa	Nein
11	hnRNP A1	34 kDa	(Nein); PKCζ: Municio et al. 1995
12	Putatives Protein, iD: 12834524	32 kDa	Nein
13	Histon H2a1	14 kDa	Nein

Tabelle III: Identifizierte in vitro-Substrate der PKCa im Tritonextrakt der Kernmembran