

# **Untersuchungen zur Kern-Cytoplasma- Translokation der katalytischen Untereinheit C $\alpha$ der Proteinkinase A**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades des  
Doktors der Naturwissenschaften  
der Fakultät für Biologie  
der Universität Bielefeld

vorgelegt von  
Anna Lisa Picciolo

Heidelberg, Dezember 2000

1. Gutachter: Prof. Dr. E. K. Pistorius

2. Gutachter: Dr. D. Bossemeyer

Tag der Disputation: 16.02.2001

<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>V</b>
<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1 Die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) .....	2
1.1 Die Struktur und Modifikationen der C-Untereinheit .....	4
1.2 Die Funktion und Regulation der R-Untereinheiten .....	6
1.3 Die Lokalisation der PKA über AKAPs .....	7
1.4 Die Funktionen des Proteinkinase-Inhibitors (PKI) .....	9
2 Die Kern-Cytoplasma-Translokation .....	11
3 Die Kern-Cytoplasma-Translokation der C-Untereinheiten.....	19
4 Arbeitshypothese .....	22
<b>Material und Methoden</b> .....	<b>24</b>
1 Material.....	24
1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	24
1.2 Peptide .....	25
1.3 Antikörper .....	26
2 Mikrobiologische Methoden .....	26
2.1 Bakterienstämme.....	26
2.2 Plasmide .....	26
2.3 Nährmedien .....	27
2.4 Bakterienanzucht .....	27
2.5 Bestimmung der Bakterienzellichte .....	28
2.6 Herstellung transformationskompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien .....	28
2.7 Transformation / Cotransformation.....	28
3 Molekularbiologische Methoden.....	29
3.1 Aufreinigung von DNA .....	29
3.1.1 Plasmidpräparation (Minipräparation) .....	29
3.1.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen .....	29
3.1.3 Reinigung von PCR-Produkten .....	30
3.2 Agarose-Gelelektrophorese .....	30
3.3 Konzentrationsbestimmung der DNA .....	30
3.4 Klonierung .....	31
3.4.1 Restriktionsspaltung von DNA .....	31
3.4.2 DNA-Dephosphorylierung .....	31
3.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten.....	32
3.5 Mutagenesen .....	32
3.5.1 Mutagenese mit dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit .....	32
3.5.2 PCR.....	32
3.6 DNA-Sequenzierung .....	33

4	Proteinbiochemische Methoden.....	33
4.1	Expression rekombinanter Proteine .....	33
4.2	Präparation rekombinanter Proteine .....	34
4.2.1	Bakterienzell-Aufschluß .....	34
4.2.2	Aufreinigung der C-Untereinheit der PKA über PKI (5-24)-Affinitätschromatographie .....	34
4.2.3	Aufreinigung der GST-Fusionsproteine über Glutathion-Affinitätschromatographie .....	35
4.2.4	Nachreinigung der C-Untereinheit der PKA durch Mono-S-Ionenaustauscher-Chromatographie.....	36
4.3	Konzentrieren und Umpuffern von Proteinen .....	37
4.4	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	37
4.5	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	37
4.6	Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot).....	38
4.7	Isoelektrische Fokussierung.....	39
4.8	Gelfiltration .....	40
4.9	Bestimmung der Kinase-Aktivität .....	41
4.10	Konjugation von Fluoreszenzfarbstoffen an Proteine .....	43
4.11	Massenspektrometrische Untersuchungen .....	44
5	Mikroinjektion von Proteinen in Zellkulturzellen.....	44
5.1	Kultivierung und Handhabung der Zellen für die Mikroinjektionsexperimente.....	44
5.2	Kapillaren.....	45
5.3	Injektionsproben .....	46
5.4	Mikroinjektion mit dem halbautomatischen System von Eppendorf .....	47
5.5	Inkubation der injizierten Zellen.....	48
5.6	Konservierung der Präparate .....	49
5.7	Detektion und Auswertung .....	49
6	Indirekte Immunfluoreszenz.....	50
7	Importkinetik / Import Assay.....	51
8	Depletion .....	52
	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>53</b>
1	Erzeugung einer Mutante der C $\alpha$ -Untereinheit, von C $\alpha$ -Fusionsproteinen und von PKI53	
1.1	Herstellung der C $\alpha$ -Doppelmutante rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R) .....	53
1.2	Herstellung der C $\alpha$ -Untereinheit als $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsprotein .....	56
1.3	Konstruktion des C $\alpha$ (1-40)-GST-Fusionsproteins .....	58
1.4	<i>De novo</i> -Synthese des Proteinkinase-Inhibitors PKI .....	60
2	Vorversuche zur quantitativen Bestimmung von Fluoreszenzintensitäten in Kern und Cytoplasma und dem sich daraus ergebenden Quotienten F <sub>K/C</sub> .....	62
2.1	Einfluß der Zelllinie auf F <sub>K/C</sub> .....	62
2.2	Einfluß der Auswertebereiche innerhalb der Zellen auf F <sub>K/C</sub> .....	63

2.3	Einfluß der Eigenfluoreszenz (Hintergrund) auf $F_{K/C}$ .....	65
2.4	Einfluß der optischen Kontamination auf $F_{K/C}$ .....	65
2.5	Einfluß der Konzentration der injizierten Proben auf $F_{K/C}$ bei nicht kerngängigen Proben .....	68
3	Charakterisierung der Proben für Mikroinjektion und Import-Assay.....	70
3.1	Bestimmung des Phosphorylierungsgrades über Kationenaustauscher-Chromatographie (Mono-S) .....	71
3.2	Bestimmung der Molekülmassen durch Massenspektrometrie.....	72
3.3	Isoelektrische Fokussierung.....	74
3.4	Vergleichende Analyse von Dissoziationskonstanten mittels Resonant Mirror Affinographie .....	75
3.5	Gelfiltrationschromatographie zum Vergleich des Diffusionsverhaltens von rC $\alpha$ myr mit dem anderer Proteine .....	76
4	Untersuchungen zur Kern-Cytoplasma-Translokation von rC $\alpha$ myr .....	80
4.1	Untersuchungen zur Kern-Cytoplasma-Translokation von rC $\alpha$ myr in Mikroinjektionsexperimenten .....	80
4.1.1	Vergleich der intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr mit der von Kontrollproteinen .	80
4.1.2	Translokationsstudien mit C $\alpha$ -Fusionsproteinen .....	84
4.1.3	Einfluß der Temperatur auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr und Kontrollproteinen in Vero-Zellen .....	87
4.1.4	Einfluß der Verfügbarkeit von Energie auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr und Kontrollproteinen in Vero-Zellen.....	90
4.1.5	Blockieren der Kernpore .....	96
4.1.6	Einfluß des Kernlokalisationssignals SV40 NLS auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr in Konkurrenzexperimenten .....	103
4.1.7	Der Einfluß der Kinaseaktivität auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr in Vero-Zellen.....	105
4.1.8	Cytochalasin B – Abhängigkeit der intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr in Vero-Zellen vom Cytoskelett .....	111
4.1.9	Der aktive Export von rC $\alpha$ myr aus dem Kern.....	112
4.2	Untersuchungen zur Kern-Cytoplasma-Translokation von rC $\alpha$ myr in Import-Assays.....	115
4.2.1	Vergleich der Translokation von rC $\alpha$ myr und Kontrollproteinen in die Kerne permeabilisierter HeLa-Zellen.....	116
4.2.2	Import-Kinetiken von rC $\alpha$ myr in die Kerne permeabilisierter HeLa-Zellen .....	118
4.2.3	Einfluß von Energie-regenerierendem und Ran-System auf die Translokation von rC $\alpha$ myr in die Kerne permeabilisierter HeLa-Zellen .....	120
4.2.4	Einfluß des Retikulozytenextraktes auf die Translokation von rC $\alpha$ myr in die Kerne permeabilisierter HeLa-Zellen.....	122
4.2.5	Einfluß der Importin $\beta$ -Mutante (45-462) auf die Translokation von rC $\alpha$ myr in die Kerne permeabilisierter HeLa-Zellen .....	124
5	Untersuchungen zur Retention von rC $\alpha$ myr in Kern und Cytoplasma .....	126

5.1 Einfluß der Bindung von rC $\alpha$ myr zu den R-Untereinheiten in Mikroinjektionsexperimenten und Import-Assays .....	126
5.1.1 Die R-bindungsdefiziente C $\alpha$ -Doppelmutante rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R) .....	126
5.1.2 Vergleich der Import-Kinetiken von rC $\alpha$ myr und rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R) im Mikroinjektionsexperiment und im Import-Assay .....	129
5.1.3 Das AKAP Ht-31-Inhibitorpeptid.....	131
5.1.4 Einfluß von cAMP auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr in Vero-Zellen .	133
5.1.5 Sättigungskinetik.....	135
5.2 Depletion von Retikulozytenextrakt mit rC $\alpha$ myr .....	137
5.3 Indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen zur zellulären Lokalisation der R-Untereinheiten und PKI.....	139
5.3.1 Vorkommen und Lokalisation der R-Untereinheiten .....	139
5.3.2 Vorkommen und Lokalisation von PKI .....	140
<b>Diskussion .....</b>	<b>143</b>
1 Der Mechanismus der Kern-Cytoplasma-Translokation der C $\alpha$ -Untereinheit: Diffusion oder aktiver Transport? .....	144
2 Die intrazelluläre Verteilung der C $\alpha$ -Untereinheit: Einfluß durch Retention? .....	159
3 Das Modell der Kern-Cytoplasma-Translokation der C $\alpha$ -Untereinheit.....	168
4 Ausblick .....	172
<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>174</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>185</b>
1 Primer.....	185
2 Peptidsequenzen.....	186
3 PKA C $\alpha$ -DNA- und Proteinsequenz .....	187
4 Vektoren .....	188
5 PCR-Programme .....	189
6 Abkürzungsverzeichnis.....	190

# Zusammenfassung

Die Hauptfunktion von cAMP in eukaryontischen Zellen ist die Aktivierung der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA). Bei geringen intrazellulären cAMP-Konzentrationen liegen die katalytischen Untereinheiten von PKA (C-Untereinheiten) inaktiv an die regulatorischen Untereinheiten (R-Untereinheiten) im Cytoplasma gebunden vor. Steigt der cAMP-Spiegel in der Zelle an, so dissoziieren die C-Untereinheiten von den sie inhibierenden R-Untereinheiten. Die dadurch aktivierten C-Untereinheiten können sowohl Substrate im Cytoplasma, als auch, nach Translokation in den Kern, nukleäre Substrate phosphorylieren. Die Translokation der aktivierten C-Untereinheit in den Kern war Thema dieser Arbeit. In der Literatur wird Diffusion als Translokationsmodus angegeben. Der Export aus dem Kern erfolgt zusätzlich aktiv, vermittelt durch den physiologischen Inhibitor der Proteinkinase (PKI). Weitere Untersuchungen zeigen allerdings eine Abhängigkeit der Verteilung der aktivierten C-Untereinheit von posttranslationalen Modifikationen. Diese Beobachtungen lassen sich mit der in der Literatur beschriebenen Diffusion als Importmodus der C-Untereinheit nicht ausreichend erklären, da man bei freier Diffusion eine Gleichverteilung der Probe erwartet. Um zu überprüfen, nach welchem Mechanismus eine Verteilung der C-Untereinheiten erfolgt, bei der man Akkumulation im Kern und modifikationsabhängige Verteilungsunterschiede beobachtet, wurden Mikroinjektionsexperimente und Import-Assays an permeabilisierten Zellen mit fluoreszenzmarkierten Proben durchgeführt. Eine Quantifizierung der Fluoreszenzverteilungen zwischen Kern und Cytoplasma erfolgte über digitale Fluoreszenzmikroskopie. Die in dieser Arbeit durchgeführten umfangreichen Untersuchungen bestätigen eine Kern-Cytoplasma-Translokation der C-Untereinheit über Diffusion. Die C-Untereinheit wird darüber hinaus aktiv aus dem Kern exportiert. Das Translokationsmodell konnte durch neue Befunde erweitert werden. Die Verteilung der aktivierten C-Untereinheit scheint maßgeblich von Bindungsstellen im Cytoplasma und vor allem im Kern bestimmt zu werden, die das Enzym dem Verteilungsgleichgewicht entziehen. Das erklärt die beobachtete Akkumulation der C-Untereinheit im Kern. Durch Vergleich des Translokationsverhaltens der C-Untereinheit mit dem anderer Proteine konnte gezeigt werden, daß bestimmte diffusible Moleküle durch experimentelle Eingriffe in den aktiven Transport ebenfalls am Kerneintritt gehindert werden. Dies trifft auf Moleküle zu, deren Größe knapp unterhalb der Kernausschlußgrenze für Diffusion liegt. Kleinere diffusible Moleküle sind davon nicht betroffen. Mögliche Gründe dieses Unterschieds wurden diskutiert. Da die Aktivität der PKA im Kern durch deren nukleäre Präsenz bestimmt wird, trägt ein tieferer Einblick in den Diffusionsmechanismus von Molekülen durch die Kernporenkomplexe auch zum Verständnis der Regulation der cAMP-abhängigen Signaltransduktionswege bei.

# Einleitung

Zelluläre Antworten auf extrazelluläre Signale werden oft durch spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche und verschiedene Systeme sekundärer Botenstoffe, den *second messenger*, die durch die Hormonbindung aktiviert werden, vermittelt.

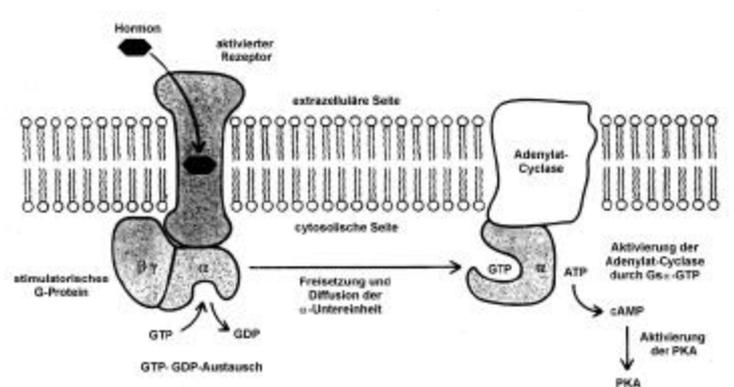
Das zyklische cAMP (cAMP) wurde 1957 als erster *second messenger* identifiziert [Sutherland und Rall 1957]. Später fand man weitere *second messenger* wie zyklisches GMP, Inositoltriphosphat oder Diacylglycerol. Noch heute ist die cAMP-vermittelte Zellantwort auf extrazelluläre Signale das am besten beschriebene *second messenger*-System eukaryontischer Zellen. Im folgenden soll kurz darauf eingegangen werden. Eine schematische Darstellung des cAMP-Signalweges ist der Abbildung 1 zu entnehmen.

Viele bekannte Hormone, wie z.B. Adrenalin, Glucagon, Vasopressin oder Acetylcholin, wirken über cAMP-abhängige Systeme auf den Metabolismus und die Proliferation der Zielzellen. Diese Hormone binden an Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die ihrerseits an stimulatorische G-Proteine gekoppelt sind. Diese G-Proteine bestehen aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ). Die  $\alpha$ -Untereinheit kann eine inaktive GDP-gebundene oder eine aktive GTP-gebundene Form annehmen. Die Hormonbindung an den Rezeptor bewirkt in dieser Untereinheit einen Austausch von gebundenem GDP gegen GTP. Die so aktivierte  $G\alpha$ -Untereinheit dissoziiert daraufhin von den  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten und assoziiert mit der Adenylat-Cyclase. Dadurch wird diese aktiviert und synthetisiert aus ATP den *second messenger* cAMP. Die Aktivierung der Adenylat-Cyclase wird durch die Hydrolyse von GTP zu GDP wieder aufgehoben [Gilman 1984; Schramm und Selinger 1984].

Es kommt zu einer kaskadenartigen Verstärkung der zellulären Antwort, da jedes gebundene Hormonmolekül viele die Adenylat-Cyclasen aktivierende  $G\alpha$ -GTP-Moleküle und jede aktivierte Adenylat-Cyclase wiederum viele cAMP-Moleküle erzeugt.

Während die Adenylat-Cyclasen den intrazellulären Anstieg von cAMP katalysieren, läuft die Hydrolyse von cAMP zu AMP über Phosphodiesterasen ab. Der intrazelluläre cAMP-Spiegel

wird durch das Gleichgewicht an Adenylat-Cyclase- und Phosphodiesterase-Aktivität bestimmt [Beavo *et al.* 1994; McKnight 1991; Tang und Gilman 1992].



**Abbildung 1: Die Synthese von cAMP als *second messenger***

Die Aktivierung der Adenylat-Cyclase durch Bindung eines Hormons an seinen spezifischen Rezeptor wird von stimulatorischen G-Proteinen vermittelt. Synthetisiertes cAMP führt zur Aktivierung von PKA [Stryer 1991].

## 1 Die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA)

Die meisten der durch cAMP vermittelten Signale werden durch die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA, A-Kinase oder Proteinkinase A) weitergeleitet, indem diese zelluläre Proteine durch Phosphorylierung modifiziert [Taylor *et al.* 1990; Walsh *et al.* 1968]. PKA nimmt so eine Schlüsselrolle in der Regulation des Energiestoffwechsels, der Signalübertragung, des Zellwachstums, der Differenzierung, der Apoptose und der Gedächtnisbildung ein [Cho-Chung *et al.* 1995; Krebs und Beavo 1979; Qi *et al.* 1996; Tasken *et al.* 1997; Weissinger *et al.* 1997].

In nicht stimulierten Zellen liegt die PKA als inaktives Holoenzym in Form eines Heterotetramers von zwei regulatorischen Untereinheiten (R-Untereinheiten) und zwei katalytischen Untereinheiten (C-Untereinheiten) vor [Cox und Taylor 1994; Krebs und Beavo 1979]. Die Dissoziation des Holoenzym, in der nachfolgenden Gleichung als  $R_2C_2$  bezeichnet, wird nach Anstieg der intrazellulären cAMP-Konzentration durch Bindung von zwei Molekülen cAMP an jeweils eine der R-Untereinheiten induziert. Die beiden monomeren C-Untereinheiten dissoziieren entsprechend der folgenden Gleichung vom regulatorischen Dimer ( $R_2$ ) [Gill und Garren 1969], da die Affinität der Untereinheiten zueinander aufgrund der durch cAMP hervorgerufenen Konformationsänderung um 4 - 5 Größenordnungen sinkt [Granot *et al.* 1980].



Die durch die Freisetzung aktivierten C-Untereinheiten können daraufhin Serin- oder Threoninreste in Zielproteinen phosphorylieren. Die zu phosphorylierenden Serin- oder Threoninreste sind dabei Bestandteil der Konsensus-Substraterkennungssequenz Arg-Arg-X-Ser/Thr, wobei X für einen beliebigen Aminosäurerest steht [Kemp *et al.* 1977; Zetterqvist *et al.* 1990].

Die Substrate der C-Untereinheit sind sowohl im Cytoplasma als auch im Kern lokalisiert. Die Translokation der C-Untereinheit erfolgt nach Aktivierung und Dissoziation des Holoenzym. Phosphorylierungssubstrate der C-Untereinheiten im Kern sind vor allem Transkriptionsfaktoren der CREB/ATF-Familie [Foulkes *et al.* 1991]. Diese können nach Phosphorylierung durch die C-Untereinheit die Transkription von Genen, die ein cAMP-responsives Element (CRE) beinhalten, induzieren.

Da die Substraterkennungssequenz der PKA ein häufig vorkommendes Sequenzmotiv in Proteinen ist, ist zur Kontrolle der PKA-Aktivität eine Vielzahl von Regulationsmechanismen erforderlich.

Regulator der Aktivität der C-Untereinheiten ist neben den R-Untereinheiten ein hitzestabiler Proteinkinase-Inhibitor (PKI), der die PKA-Aktivität vor allem im Kern reguliert. Neben seiner inhibitorischen Funktion kann PKI das Enzym auch aus dem Kern exportieren [Wen *et al.* 1995].

Außer an der Inhibierung der C-Untereinheiten vermitteln die R-Untereinheiten durch ihre Bindung an A-Kinase-Ankerproteine (AKAP) auch die Lokalisation des Holoenzym an subzelluläre Strukturen (s. *Einleitung* 1.2 / 1.3). Da die Kompartimentierung von PKA bevorzugt eine Phosphorylierung von benachbarten Substraten fördert, stellt sie einen weiteren Aspekt der Regulation dar.

Ein Teil der Diversität der cAMP-vermittelten Zellantwort wird vermutlich durch Unterschiede in den biochemischen Eigenschaften der Isoformen der C- und R-Untereinheiten reguliert. In Säugern sind für die C-Untereinheit die drei Isoformen C $\alpha$ , C $\beta$  und C $\gamma$  [Beebe *et al.* 1990; Chrvia *et al.* 1988; Shoji *et al.* 1981; Showers und Maurer 1986; Uhler *et al.* 1986] und für die R-Untereinheit die vier Isoformen R1 $\alpha$ , R1 $\beta$ , R11 $\alpha$  und R11 $\beta$  [Clegg *et al.* 1988; Jahnsen *et al.* 1986; Lee *et al.* 1983; Sandberg *et al.* 1988; Scott *et al.* 1987; Takio *et al.* 1982] bekannt. Außerdem wurden noch weitere C $\beta$ - und R1 $\alpha$ -Untereinheiten gefunden, die durch alternative Prozessierung der mRNA entstehen [Guthrie *et al.* 1997; Solberg *et al.* 1997; Wiemann *et al.* 1991]. Die C $\alpha$ -Untereinheit ist die vorherrschende Isoform und kommt in allen Geweben vor. Die C $\beta$ -Untereinheit kommt ebenfalls in fast allen Geweben vor, wird aber mit etwas größeren gewebsspezifischen Unterschieden exprimiert [Thullner *et al.* 2000] [Jedrzejewski

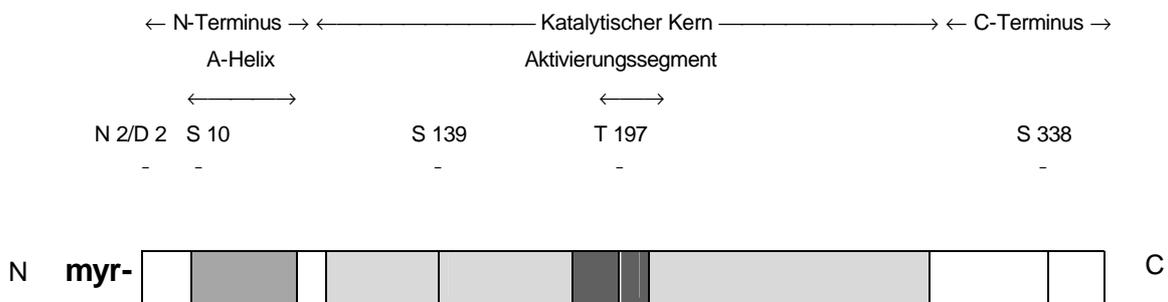
*et al.* 1998]. Die C $\gamma$ -Untereinheit konnte bisher nur in humanem Hodengewebe nachgewiesen werden [Beebe *et al.* 1990].

Die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente mit C-Untereinheit wurden ausschließlich mit C-Untereinheit der Isoform  $\alpha$  (C $\alpha$ -Untereinheit) durchgeführt.

## 1.1 Die Struktur und Modifikationen der C-Untereinheit

Alle Proteinkinasen besitzen eine konservierte katalytische Kernregion [Hanks und Hunter 1995; Hanks *et al.* 1988], während sich die nicht konservierten C- und N-terminalen Bereiche unterscheiden. Wie aus Abbildung 2 hervorgeht, ist die C $\alpha$ -Untereinheit mit ihren 350 Aminosäureresten (41 kDa) nur wenig größer als ihr konservierter katalytischer Kern (L 40 – T 300).

Wie die Kristallstruktur der C-Untereinheit der  $\alpha$ -Isoform zeigt [Bossemeyer *et al.* 1993; Knighton *et al.* 1991], besteht der katalytische Kern aus zwei Domänen. Die eine Domäne ist ein kleiner Lobus, der überwiegend von N-terminalen Aminosäuren gebildet wird, und die andere ein großer Lobus, der sich aus C-terminalen Aminosäureresten zusammensetzt. Der zwischen den beiden Loben liegende Spalt beherbergt das katalytische Zentrum der Kinase mit Bindungsstellen für Substrat, ATP als Cosubstrat und Magnesium.



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der Primärstruktur der C $\alpha$ -Untereinheit**

Abbildung modifiziert nach Bossemeyer *et al.* [Bossemeyer *et al.* 1996]. Dargestellt ist der N-Terminus (N) mit der N-terminalen Myristylierung (myr), die Deamidierungsstelle am 2. Aminosäurerest (D 2 / N 2) und die amphipatische Helix (A-Helix, S 10 – E 31) mit der Phosphorylierungsstelle Serin 10 (S 10). Der konservierte katalytische Kern (L 40 – T 300) beinhaltet das Aktivierungssegment (D 184 - E 208) mit der Autophosphorylierungsstelle Threonin 197 (T 197). Weitere mögliche Phosphorylierungsstellen sind das Serin 139 (S 139) und das Serin 338 (S 338) am C-Terminus (C).

N-terminal schließt sich an den katalytischen Kern der C $\alpha$ -Untereinheit der sogenannte N-Terminus an, bestehend aus einer amphipatischen Helix (A-Helix, S 10 – E 31) und einem Myristylierungsmotiv (Abb. 2). Die Myristylierung der C $\alpha$ -Untereinheit erfolgt co-translational

durch die N-Myristyltransferase [Towler *et al.* 1988]. Wie die Kristallstrukturanalysen gezeigt haben, bindet die Fettsäure in einer hydrophoben Tasche, gebildet von Resten der A-Helix und dem C-Lobus [Bossemeyer *et al.* 1993; Zheng *et al.* 1993], wodurch der N-Terminus am Enzym verankert wird, was offenbar die strukturelle Stabilität der C $\alpha$ -Untereinheit erhöht [Yonemoto *et al.* 1993].

Die Myristylierung deutet auf eine Membranassoziiierung hin, die allerdings lange Zeit nicht nachgewiesen werden konnte. Nach jüngsten Untersuchungen scheint die C $\alpha$ -Untereinheit jedoch tatsächlich über ihre Myristylierung in der Lage zu sein, an Membranlipide zu assoziieren. Diese Membranassoziiierung zeigte sich allerdings nur bei Bindung der RII-Untereinheit. Die Interaktion der C $\alpha$ -Untereinheit mit den RII-Untereinheiten könnte eine Konformationsänderung induzieren, die dazu führt, daß die Myristylsäure exponiert wird [Gangal *et al.* 1999]. Inwieweit diese Interaktion des Holoenzym mit Membranen Einfluß auf die Funktion der PKA nimmt, wurde noch nicht geklärt.

Ein Einfluß des myristylierten N-Terminus auf die Aktivität bzw. auf die Inhibition durch PKI oder R-Untereinheiten konnte nicht gezeigt werden. Allerdings scheint der N-Terminus sehr wohl, wie oben für RII-Untereinheiten beschrieben, die Wechselwirkungen mit den R-Untereinheiten zu beeinflussen [Gangal *et al.* 1999; Zimmermann 2000].

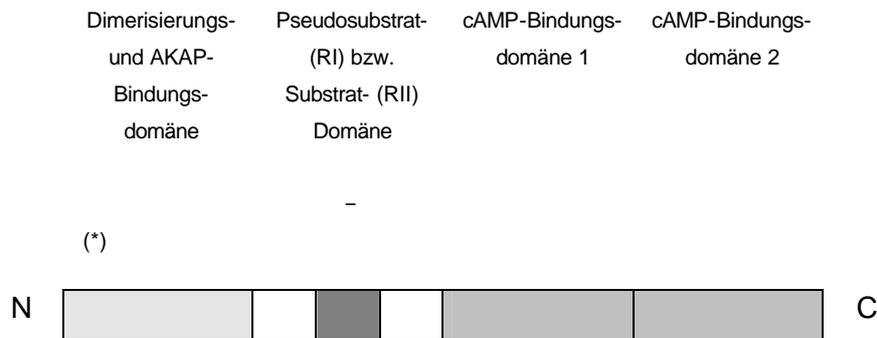
Die C-terminal an den katalytischen Kern der C $\alpha$ -Untereinheit grenzende Region weist ein Cluster saurer Aminosäurereste auf (D 328 – E 334), dem eine Rolle bei der Substrat- bzw. Pseudosubstraterkennung zugeschrieben wird [Chestukhin *et al.* 1996].

Neben der N-terminalen Myristylierung weist die C $\alpha$ -Untereinheit noch andere posttranslationale Modifikationen auf. So ist die aus Gewebe isolierte C $\alpha$ -Untereinheit an zwei Aminosäureresten, Threonin 197 und Serin 338, phosphoryliert (Abb. 2). Beide Phosphorylierungen können von PKA autokatalytisch durchgeführt werden. Die Phosphorylierung des im Aktivierungssegment liegenden Threonin 197 (T 197) ist essentiell für die Phosphotransferase-Aktivität der C $\alpha$ -Untereinheit [Adams *et al.* 1995; Girod *et al.* 1996]. Das phosphorylierte Serin 338 (S 338) nahe dem C-Terminus scheint dagegen für die Löslichkeit der C $\alpha$ -Untereinheit von Bedeutung zu sein [Steinberg 1991]. Rekombinante, in *E. coli* hergestellte C $\alpha$ -Untereinheit kann mehr als zwei Phosphorylierungen aufweisen [Steinberg *et al.* 1993]. Die möglichen Phosphorylierungsstellen sind in Abbildung 2 eingezeichnet.

Eine weitere posttranslationale Modifikation, die bei etwa einem Drittel der aus Gewebe isolierten C-Untereinheiten zu finden ist, ist eine Deamidierung des zweiten Aminosäurerestes Asparagin (N 2) zu Aspartat (D 2) [Jedrzejewski *et al.* 1998]. Untersuchungen aus der Abteilung für Pathochemie in Kooperation mit Herrn R. Pepperkok (EMBL, Heidelberg) zeigten eine Abhängigkeit der Kern-Cytoplasma-Verteilung der C-Untereinheiten von der Deamidierung am N-Terminus der C-Untereinheit. Diese

Beobachtung ist einer der Ausgangspunkte dieser Arbeit und wird im Abschnitt 3 ausführlicher beschrieben.

## 1.2 Die Funktion und Regulation der R-Untereinheiten



### Abbildung 3: Schematische Darstellung der Primärstruktur der RI- und RII-Untereinheiten

Abbildung modifiziert nach Bossemeyer *et al.* [Bossemeyer *et al.* 1996]. Der N-Terminus der R-Untereinheiten spielt in der Dimerbildung und der Bindung der A-Kinase-Ankerproteine (AKAP) eine Rolle. Während RI-Untereinheiten über eine Pseudosubstratdomäne mit den C-Untereinheiten assoziieren, stellen die RII-Untereinheiten mit ihrer Substratdomäne für die C-Untereinheiten ein echtes Substrat dar. Der C-Terminus bildet die beiden cAMP-Bindungsdomänen der R-Untereinheiten aus. Mit (\*) ist die Bindungsregion für das AKAP Ht-31-Inhibitorpeptid gekennzeichnet (s. *Einleitung* 1.3).

Die R-Untereinheiten dimerisieren über ihre N-Termini. Trotz unterschiedlicher N-Termini der RI- und RII-Untereinheiten konnten nicht nur Homodimere, sondern auch Heterodimere *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden [Tasken *et al.* 1993]. Während die RI-Untereinheiten für die C-Untereinheit ein Pseudosubstrat darstellen, ist RII ein echtes Substrat, das im Holoenzym von den C-Untereinheiten phosphoryliert werden kann. Die Phosphorylierung setzt zwar die Affinität für die C-Untereinheiten bis zur Dephosphorylierung um eine Größenordnung herab, bewirkt aber nicht die sofortige Dissoziation des Komplexes, da die R-Untereinheiten noch mit anderen Regionen als dem katalytischen Zentrum der C $\alpha$ -Untereinheit interagieren.

Die RI- und RII-Untereinheiten binden die C $\alpha$ - und C $\beta$ -Isoformen mit ähnlicher Affinität (K<sub>i</sub> 0,2 - 0,3 nM) und unterscheiden sich auch sonst kaum in ihren biochemischen Eigenschaften.

Die RI $\beta$ -Untereinheit ist insofern eine Ausnahme, als sie gegenüber cAMP sensitiver ist als die anderen R-Untereinheiten und so eine frühe Antwort auf die Erhöhung des cAMP-Spiegels ermöglicht [Cadd *et al.* 1990]. Ein Beispiel für die Komplexität der Regulation

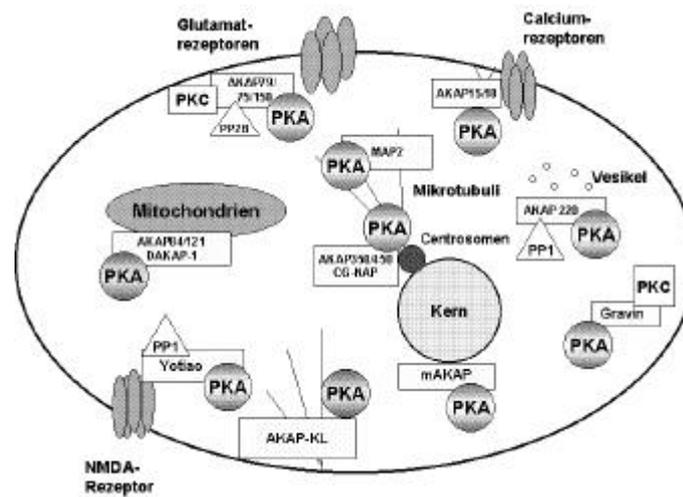
einzelner Isoformen der R-Untereinheiten ist die Regulation der  $R_{I\alpha}$ -Untereinheit. Diese kann in Abhängigkeit von der Konzentration an freier C-Untereinheit und an  $R_{II}$ -Untereinheiten in ihrer Konzentration reguliert werden [Spaulding 1993] [Otten und McKnight 1989; Uhler und McKnight 1987]. Die C-Untereinheit steuert durch ihre Aktivität in einem negativen Rückkopplungsmechanismus die Konzentration ihres Inhibitors, der  $R_{I\alpha}$ -Untereinheit, da die Expression der  $R_{I\alpha}$ -Untereinheit über den Transkriptionsfaktor CREB reguliert wird, der wiederum als Substrat der C-Untereinheit durch Phosphorylierung aktiviert wird [Boshart *et al.* 1991; Nowak *et al.* 1987; Tasken *et al.* 1991]. Da die  $R_{I\alpha}$ -Untereinheit gegenüber den anderen Untereinheiten einen höheren Umsatz in der Zelle zeigt, kann sie schneller auf Veränderungen in der katalytischen Aktivität reagieren [Amieux *et al.* 1997; Hegde *et al.* 1993].

Außer in der Inhibierung der C-Untereinheiten liegt die Hauptfunktion der R-Untereinheiten in der zellulären Lokalisation der C-Untereinheiten. Die  $R_{II}$ -Untereinheiten sind zu mehr als 75 % über AKAPs an cytoplasmatische Strukturen und Organellen gebunden [Rubin 1994; Scott und McCartney 1994]. Die  $R_I$ -Untereinheiten befinden sich dagegen überwiegend frei im Cytoplasma. Nur die  $R_{I\alpha}$ -Untereinheit kommt zu einem kleinen Teil über AKAPs gebunden vor, z.B. in unmittelbarer Nähe von Membranrezeptoren wie Antigenrezeptoren auf Lymphzellen [Skalhegg *et al.* 1994].

Diese Kompartimentierung von PKA könnte einer bevorzugten Phosphorylierung von Substraten in unmittelbarer Umgebung des Holoenzym dienen [Klauck *et al.* 1996] und somit einen zusätzlichen Regulationsmechanismus der Aktivität und der Selektivität der zellulären Antwort bedeuten.

### 1.3 Die Lokalisation der PKA über AKAPs

Die A-Kinase-Ankerproteine (AKAP) wurden als Proteine identifiziert, die sich bei der Aufreinigung von PKA aus Gewebe zusammen mit der PKA anreichern ließen. Bisher sind mehr als 25 verschiedene AKAPs identifiziert worden, welche PKA, wie in Abbildung 4 gezeigt wird, an eine Vielzahl zellulärer Strukturen und Organellen wie Centrosomen, Dendriten, endoplasmatisches Retikulum (ER), Mitochondrien, Golgi-Apparat, Kernmembran, Plasmamembran und Vesikel assoziieren können [Edwards und Scott 2000; Miki und Eddy 1999].



**Abbildung 4: Intrazelluläre Lokalisation von AKAPs mit ihren Bindungspartnern**

Abbildung modifiziert nach [Edwards und Scott 2000]. Schematische Darstellung der intrazellulären Lokalisation verschiedener AKAPs mit ihren Bindungspartnern. Manche AKAPs stellen eine Plattform für verschiedene Signaltransduktionswege dar, indem sie neben der PKA noch andere Kinasen und Phosphatasen in enger Nachbarschaft assoziieren.

Die verschiedenen AKAPs weisen keine großen Sequenzähnlichkeiten untereinander auf, sondern sind vielmehr eine Familie funktionsverwandter Proteine, die sich über die Eigenschaft, Interaktionen zu RI- und RII-Untereinheiten des Holoenzym auszubilden, charakterisieren lassen [Edwards und Scott 2000]. Die Assoziation der R-Untereinheiten an AKAPs erfolgt wahrscheinlich über Helix-Helix-Kontakte zwischen hydrophoben Resten beider Proteine [Newton *et al.* 1999]. Bei den R-Untereinheiten sind für die AKAP-Bindung die ersten 30 N-terminalen Reste verantwortlich, die z.T. ein amphipatisches  $\alpha$ -Helixmotiv ausbilden und auch an der Dimerisierung der R-Untereinheiten beteiligt sind. In AKAPs wurde ebenfalls eine amphipatische Helix gefunden, deren Funktion bei der Bindung von R-Untereinheiten indirekt durch Einführung Helix-brechender Aminosäurereste bestätigt werden konnte [Carr *et al.* 1991]. Blockiert werden kann die Bindung auch durch ein synthetisches Peptid, das dieser Region von AKAP Ht-31 entspricht (Abb. 2), wodurch die distinkte Lokalisation der PKA in Zellen aufgehoben werden kann [Johnson *et al.* 1994; Rosenmund *et al.* 1994].

Die Regulationsmechanismen der über R-Untereinheiten und assoziierten AKAPs vermittelten subzellulären Lokalisation des Holoenzym sind sehr vielschichtig und bedürfen weiterer Aufklärung.

Zum einen kann die Verteilung der PKA-Isoenzyme durch Unterschiede in Spezifität und Affinität der Interaktionen zwischen PKA und AKAPs variiert werden [Herberg *et al.* 2000]. So

binden einige AKAPs, wie AKAP 95, nur RII $\alpha$ -Untereinheiten, andere dagegen RII $\alpha$ - und RII $\beta$ -Untereinheiten, wenn auch mit unterschiedlicher Affinität, wie AKAP 79, und wieder andere gehen sowohl mit RII- als auch mit RII $\alpha$ -Untereinheiten eine Bindung ein, wie S-AKAP 84 und D-AKAP 1 [Huang *et al.* 1997].

Zum anderen scheint auch die Assoziation von AKAPs an zelluläre Strukturen verschiedenen Regulationsmechanismen zu unterliegen [Herberg *et al.* 2000]. Ein Beispiel dafür ist D-AKAP 1 (Abb. 4), für das verschiedene Splicevarianten mit unterschiedlichen N-Termini, die Gewebe-spezifisch exprimiert werden, gefunden wurden. Diese binden je nach N-Terminus an Mitochondrien oder ER [Huang *et al.* 1999].

Anders als die R-Untereinheiten, deren Lokalisation im Kern angezweifelt wird, ist ein AKAP auch im Kern nachgewiesen worden [Eide *et al.* 1998]. Da dieses AKAP, AKAP 95, während der Interphase an DNA im Kern gebunden ist, können die auf das Cytoplasma limitierten RII $\alpha$ -Untereinheiten in zellzyklusabhängiger Weise nur während der Mitose, wenn der Zellkern degradiert ist, an AKAP 95 binden.

Manche AKAPs stellen eine Plattform für verschiedene Signaltransduktionswege dar, indem sie neben der PKA noch andere Kinasen und Phosphatasen in enger Nachbarschaft assoziieren. So bindet z.B. AKAP 79 neben der PKA auch noch die Proteinkinase C und die Calcium / Calmodulin-abhängige Phosphatase PP2B [Klauck *et al.* 1996] (Abb. 4). AKAP 79, das in der Nähe von Transmembranproteinen, wie z.B. Ionenkanälen lokalisiert ist, koordiniert so die Regulation des Phosphorylierungsgrades und damit die Aktivität dieser Ionenkanäle.

#### 1.4 Die Funktionen des Proteinkinase-Inhibitors (PKI)

Neben den R-Untereinheiten ist der thermo- und säurestabile Proteinkinase-Inhibitor (PKI) ein weiteres hochspezifisches Regulatorprotein der PKA [Walsh *et al.* 1990]. Das relativ kleine Protein (8 kDa) bindet mit großer Affinität an das aktive Zentrum der C-Untereinheit ( $K_d$  von 0,2 nM), wenn diese von den R-Untereinheiten dissoziiert vorliegt und hemmt die Aktivität der Kinase [Wen *et al.* 1995]. PKI ist eine Möglichkeit, die Aktivität der PKA zu inhibieren, wenn die C-Untereinheiten aufgrund eines hohen intrazellulären cAMP-Spiegels nicht von R-Untereinheiten gebunden werden können.

Für die Inhibition sind die Aminosäurereste 5 bis 24 verantwortlich. Diese Region (5 - 24) enthält u.a. eine Pseudosubstratbindestelle, die mit dem katalytischen Zentrum der C-Untereinheiten in ATP- und Magnesium-abhängiger Weise synergistisch interagiert [Herberg und Taylor 1993; Knighton *et al.* 1991; Walsh *et al.* 1990]. Wie bei den C- und R-Untereinheiten sind auch von PKI verschiedene Isoformen bekannt: PKI $\alpha$  [Olsen und Uhler 1991], PKI $\beta$ 1 und PKI $\beta$ 2 [Scarpetta und Uhler 1993; Van Patten *et al.* 1991].

Neben seiner Funktion als Inhibitor vermittelt PKI über sein Exportsignal (NES) den Export der C-Untereinheit aus dem Kern [Fantozzi *et al.* 1994], wodurch die Induktion der Expression cAMP-abhängig regulierter Gene aufgehoben werden kann.

Die besondere Rolle von PKI in seiner Funktion als Inhibitor und Exportvermittler scheint in der Inhibition der C-Untereinheiten im Kern zu liegen. Diese ist für den Fortgang des Zellzyklus von Bedeutung, da die Inhibition der C-Untereinheit im Kern eine Voraussetzung für den Eintritt in die Mitose ist [Wen *et al.* 1995]. In der Tat ist die Expression und Lokalisation von PKI zellzyklusabhängig: In der G1-Phase ist die PKI-Expression gering und nimmt erst zu, wenn die Zellen durch die S-Phase gehen. Die Konzentration von PKI im Kern wird zum G2/M-Übergang hin immer höher und nimmt erst wieder ab, wenn die Zellen nach der Mitose in die G1-Phase eintreten.

Die Inhibition durch PKI unterliegt einer Regulation durch die reversible Phosphorylierung eines Tyrosinrestes des Proteins, durch die die inhibitorische Wirkung vermindert wird [Van Patten *et al.* 1987]. Welche biologische Relevanz dieser Modifikation zukommt, ist jedoch unbekannt.

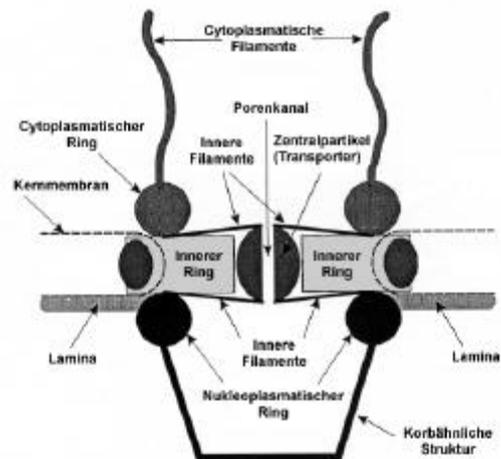
## 2 Die Kern-Cytoplasma-Translokation

Die Kompartimentierung eukaryontischer Zellen in Kern und Cytoplasma macht sowohl konstitutiven als auch regulierten Austausch von Ionen und Molekülen in den und aus dem Zellkern erforderlich. Die Kern-Cytoplasma-Translokation von Molekülen erfolgt über die wässrigen Kanäle der Kernporenkomplexe, abgekürzt NPC für nuclear pore complex, die die doppelte Membran der Kernhülle perforieren.

Die Zahl an NPCs einer Zelle korreliert mit deren metabolischen Aktivität und variiert von 100 bis 200 in Hefe, über einige Tausend in Säugerzellen bis zu ungefähr 50 Millionen in Amphibienoozyten [Allen *et al.* 2000; Gerace und Burke 1988]. Die Translokation durch NPCs kann sich sehr schnell vollziehen (ca. einige 100 Moleküle / Pore / Sekunde) und ist für Makromoleküle oder Komplexe bis zu mehreren Megadalton Größe möglich [Allen *et al.* 2000]. Jeder NPC gestattet sowohl den Kernimport als auch den Kernexport.

In höheren Eukaryonten besteht der etwa 125 MDa große NPC [Reichelt *et al.* 1990] aus 50-100 verschiedenen Proteinen [Fontoura *et al.* 1999], sogenannten Nukleoporinen, die in einem NPC in unterschiedlicher Kopienzahl vorkommen. Die Nukleoporine sind nicht nur Strukturkomponenten von NPCs, sondern fungieren auch als Interaktionsstellen für Transportfaktoren, die vorübergehend an NPCs binden [Görlich und Kutay 1999]. Als Bindungsstellen, die die Nukleoporine haben, wurden verschiedene charakteristische Domänen identifiziert. Die einen bestehen aus einer Vielzahl sich wiederholender kurzer Peptidmotive, die C-terminal mit den Aminosäureresten FG enden, wie z.B. FXFG (wobei X für einen kleinen oder polaren Aminosäurerest steht) [Delphin *et al.* 1997]. Bei den anderen Domänen handelt es sich um Zinkfinger motive [Yaseen und Blobel 1999].

NPCs haben eine achtfache Symmetrie und bestehen aus einem cytoplasmatischen, einem zentralen und einem nukleoplasmatischen Ring. Weitere Strukturelemente sind acht cytoplasmatische Filamente, die vom cytoplasmatischen Ring ausgehen, sowie eine von acht nukleären Filamenten ausgebildete korbähnliche Struktur, die vom nukleoplasmatischen Ring ausgeht und in einem vierten kleineren Ring endet [Moroianu 1999]. Ein schematischer Längsschnitt durch einen solchen Porenkomplex ist in Abbildung 5 gezeigt.



### Abbildung 5: Modell der Struktur eines Kernporenkomplexes (NPC)

Die abgebildete Schemazeichnung eines Kernporenkomplexes ist ein Schnitt durch deren Längsachse. Es zeigt die cytoplasmatischen Filamente, den cytoplasmatischen Ring, den inneren Ring, den nukleoplasmatischen Ring, der aus nukleoplasmatischen Filamenten und äußerem Ring gebildeten korbähnlichen Struktur und den zentralen Transporter. Die Darstellung entspricht dem von Akey *et al.* favorisierten Modell der NPC-Struktur. (nach [Akey und Radermacher 1993; Wente 2000])

In der Mitte der von den Nukleoporinen gebildeten Pore wurde ein Zentralpartikel beobachtet (Abb. 5), dessen Existenz als Bestandteil des NPC jedoch umstritten ist. Während diese Struktur von Akey *et al.* [Akey 1990] als Transporter für den aktiven Im- und Export beschrieben wird, der durch je acht innere Filamente des cytoplasmatischen und des nukleären Rings gehalten wird [Akey und Radermacher 1993], und Wang *et al.* (1995) sie auch als Ort der passiven Diffusion größerer Moleküle ansehen [Wang und Clapham 1999], wird sie von Jarnick und Aebi (1991) als Transportsubstrat beim Transport durch den NPC gedeutet [Jarnik und Aebi 1991]. Untersuchungen zur Translokation von Goldpartikeln durch NPCs, durch die der maximale Durchmesser des Porenkanals mit 25 nm bestimmt wurde [Feldherr und Akin 1993], sprechen für Allen *et al.* [Allen *et al.* 2000] gegen das Modell von Jarnick und Aebi, da ohne den zentralen Transporter der Durchmesser des zentralen Kanals auf ungefähr 46 nm geschätzt wird.

Moleküle, die sich durch NPCs bewegen, können in zwei Klassen eingeteilt werden. Die einen interagieren in signalvermittelter Weise entweder direkt oder indirekt über Transportrezeptoren mit den NPCs. Dieser Transportweg wird als aktiv bezeichnet, da er gegen einen Konzentrationsgradienten erfolgen kann. Eine direkte Abhängigkeit von Energie in Form von ATP oder GTP wird entgegen der Erwartung nach dem heutigen Wissenstand

nicht mehr als eindeutiges Charakteristikum für diesen Transportweg angesehen (s. weiter unten im Text).

Die Moleküle der anderen Klasse zeigen bei ihrer Kern-Cytoplasma-Translokation weder Signalabhängigkeit noch Interaktion mit den NPCs. Sie folgen bei ihrer Translokation einem Konzentrationsgradienten bis zum Konzentrationsausgleich. Man spricht hier von passiven Transport oder Diffusion [Talcott und Moore 1999].

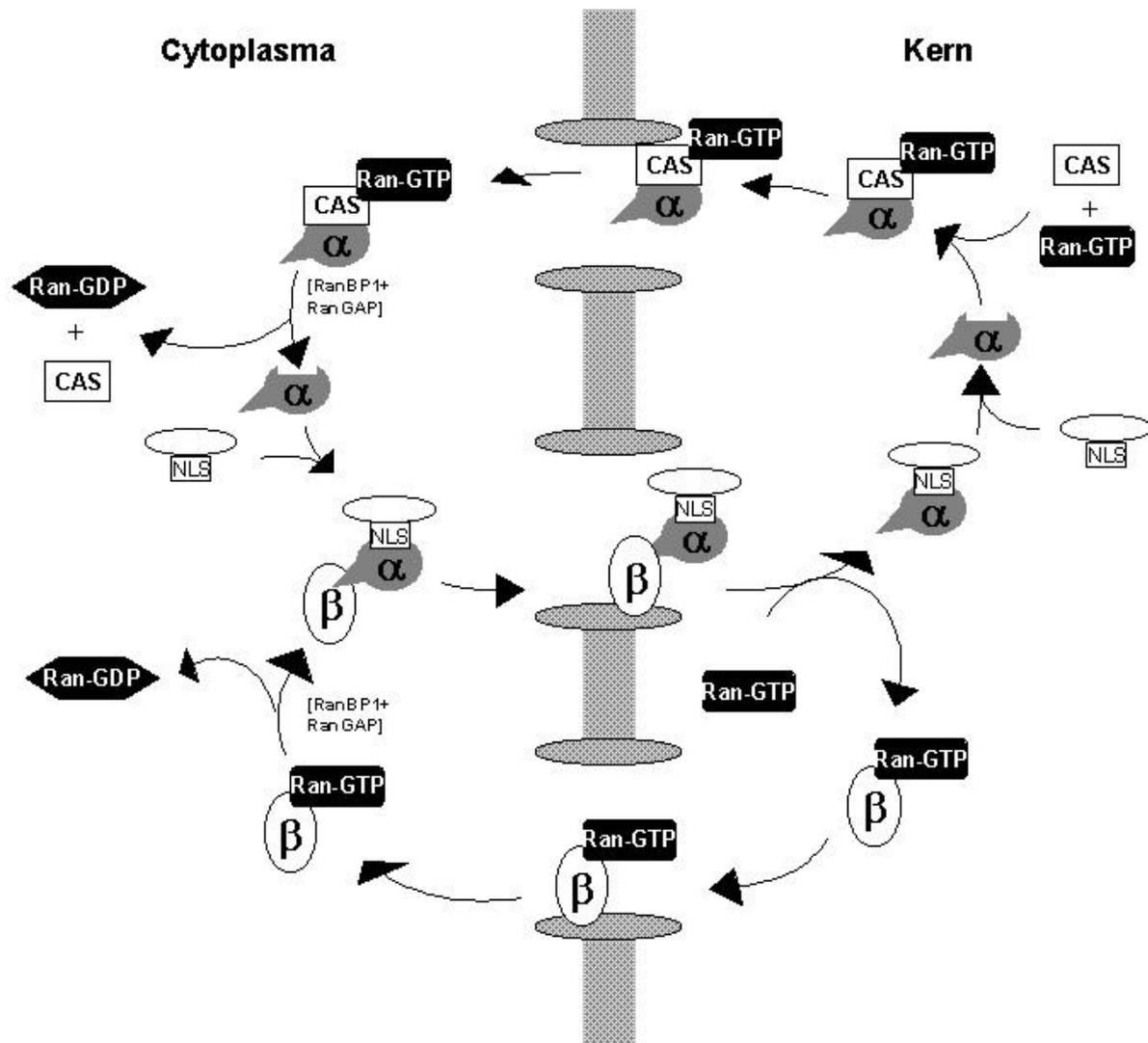
Die Größe der Moleküle ist kein Ausschlußkriterium für aktiven Transport. Zwar können Moleküle mit einem Molekulargewicht von mehr als 40 – 60 kDa nur über aktiven Transport durch den NPC gelangen, jedoch werden auch eine große Zahl kleiner Moleküle, die aufgrund ihrer Größe durch NPCs diffundieren könnten, aktiv durch NPCs transportiert, da der aktive Transport besser reguliert werden kann [Talcott und Moore 1999].

Alle aktiv durch die NPCs transportierten Moleküle, also solche, die an Nukleoporeine binden, interagieren entweder direkt oder über intermediäre Transportrezeptoren mit den NPCs. Am besten charakterisiert wurde bisher der rezeptorvermittelte Transport. Dieser bedarf bestimmter Signalsequenzen in den Transportsubstraten, den sogenannten NLS (nuclear localisation signal) beim Import bzw. den NES (nuclear export signal) beim Export, die von den Transportrezeptoren erkannt werden. Ohne die Signale würden diese Transportsubstrate nicht transportiert, da sie an sich keine Affinität für die Nukleoporeine besitzen. Es sind eine ganze Reihe von Signalen für Im- und Export bekannt, die keinerlei Homologien zeigen und von unterschiedlichen Rezeptoren über verschiedenartige Transportwege durch die NPCs gelangen. Der erste Hinweis auf ein solches NLS wurde von Dingwall *et al.* [Dingwall *et al.* 1982] bei Untersuchungen der Akkumulation von Nukleoplasmin im Kern, einem Kernprotein aus *Xenopus laevis*-Oozyten, gefunden. Das am besten untersuchte Importsignal ist das ‚klassische‘ NLS, das zuerst beim Simianvirus 40 großen T-Antigen gefunden wurde und deshalb auch SV 40 NLS genannt wird. Es besteht aus einer kurzen Sequenz basischer Aminosäurereste (Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val). Die Fusion dieser Sequenz mit anderen Proteinen, wie z.B. Rinderserumalbumin (BSA), das ohne zusätzliches NLS vom Kern ausgeschlossen bliebe, führt zu deren Akkumulation im Kern. Das Importsignal des SV 40 T-Antigens und das des Nukleoplasmins, das zwei Cluster basischer Aminosäurereste umfaßt, gelten als die Prototypen des klassischen NLS [Kalderon *et al.* 1984; Lanford und Butel 1984; Robbins *et al.* 1991].

Da über den Importweg des klassischen NLS am meisten bekannt ist, soll an ihm im folgenden der aktive Import beispielhaft erklärt werden. Abbildung 4 zeigt eine schematische Darstellung dieses Importwegs.

Der durch das klassische NLS vermittelte Import wird eingeleitet durch Ausbildung des Importkomplexes, bestehend aus NLS-tragendem Importsubstrat, Importin  $\alpha$  und Importin  $\beta$ . Importin  $\alpha$  ist für die Erkennung und Bindung des NLS verantwortlich und vermittelt in seiner Funktion als Adaptermolekül die Komplexbildung mit Importin  $\beta$ . Importin  $\beta$  ist der eigentliche Transportrezeptor, der den Transport vermittelt.

Der trimere Importkomplex dockt über Importin  $\beta$  an der cytoplasmatischen Seite des NPCs an und wird daraufhin durch die Pore in den Kern transportiert. Offenbar wird die Translokation über die Importin  $\beta$ -Untereinheit durch mehrmaliges Binden und Lösen vom NPC vermittelt. Auf der nukleären Seite kommt es durch Binden der kleinen GTPase Ran in ihrer GTP-gebundenen Form an den Importkomplex zu dessen Dissoziation, wodurch das Importsubstrat im Kern freigesetzt wird. Die beiden Importin-Moleküle werden auf zwei unterschiedlichen Wegen ins Cytoplasma zurückgebracht, wo sie dann für einen neuen Transportzyklus zur Verfügung stehen. Importin  $\alpha$  gelangt in Ran-GTP-abhängiger Weise durch den Exportrezeptor CAS zurück ins Cytoplasma. Importin  $\beta$  wird im Komplex mit Ran-GTP exportiert, was eine erneute Bindung an Importin  $\alpha$  im Kern verhindert. Für das Recycling der beiden Importine im Cytoplasma ist die Hydrolyse des Ran-gebundenen GTP notwendig. Diese bedarf zweier cytoplasmatischer Faktoren, einem Ran-bindenden Protein (RanBP1) und einem Ran-aktivierenden Protein (RanGAP). Beide zusammen stimulieren die GTPase-Aktivität von Ran. Nach GTP-Hydrolyse dissoziieren Ran-GDP und Importin. Letzteres steht für den nächsten Importzyklus zur Verfügung.



**Abbildung 6: Der klassische NLS-abhängige Importweg**

Der trimere Importkomplex aus Importin  $\beta$  ( $\beta$ ), Importin  $\alpha$  ( $\alpha$ ) als Adaptermolekül und Imports substrat mit Kernlokalisationssignal (NLS) bildet sich im Cytoplasma bei geringer Konzentration an Ran-GTP. Importin  $\beta$  vermittelt die Translokation des Importkomplexes durch den NPC. Nach Bindung von Ran-GTP an Importin  $\beta$  kommt es im Kern, wo Ran-GTP in hoher Konzentration vorliegt, zur Dissoziation des Importkomplexes. Importin  $\beta$  gelangt daraufhin im Komplex mit Ran-GTP wieder ins Cytoplasma, wo es unter Einfluß von RanBP1 und RanGAP zur Hydrolyse des GTP zu GDP kommt. Danach steht Importin  $\beta$  wieder für einen neuen Importzyklus zur Verfügung. Importin  $\alpha$ , das keine Bindungsstellen für NPCs besitzt, wird über den Exportrezeptor CAS, der Ran-GTP gebunden hält, zurück ins Cytoplasma exportiert. Durch Hydrolyse des GTP zu GDP, ein Schritt, der auch hier RanGAP- und RanBP1-abhängig ist, kommt es zur Dissoziation des Exportkomplexes. Importin  $\alpha$  kann erneut Imports substrat binden. Die Verteilung des Ran-GTP reguliert die Ausbildung des Importkomplexes und das Recycling der Transportrezeptoren [Görllich und Kutay 1999].

Mittlerweile sind eine Reihe von Transportfaktoren bekannt, die zum größten Teil der Familie der Importin  $\beta$ -verwandten Rezeptoren zuzuordnen sind. Sie weisen in der Regel ein dem

Importin  $\beta$  ähnliches N-terminales Ran-GTP-Bindungsmotiv auf. Zwar interagieren sie alle direkt mit den NPCs, vermitteln den Transport aber auf unterschiedlichen Wegen.

Die Interaktionen der Transportrezeptoren mit den Nukleoporinen der NPCs erfolgt über die bereits zu Beginn dieses Unterkapitels erwähnten Bindungsmotive der Nukleoporine [Delphin *et al.* 1997; Yaseen und Blobel 1999]. Die Bedeutung dieser Interaktionen für den aktiven Transport konnte durch Verwendung von Molekülen gezeigt werden, die in zu den Transportrezeptoren kompetitiver Weise an die NPCs binden und damit deren Translokation durch die Pore blockieren können [Finlay *et al.* 1987; Kutay *et al.* 1997].

In den einfachsten Fällen erkennt der Rezeptor das Transportsubstrat direkt, in anderen Fällen bedarf es eines Adapters wie z.B. beim klassischen NLS-vermittelten Importweg (Abbildung 6).

Je nach der Richtung des Transports, den sie vermitteln, werden diese Transportrezeptoren als Importine oder Exportine bezeichnet [Görlich und Kutay 1999].

Inzwischen weiß man, daß die Beteiligung von Transportrezeptoren wie Importin  $\beta$  kein ausschließliches Kriterium für aktive Kern-Cytoplasma-Transportwege ist. Es wurden Transportwege gefunden, die überhaupt keines Importrezeptors bedürfen. Bei diesen bindet das Transportsubstrat direkt an die NPCs, ein Transport, der bisweilen auch als erleichterte Diffusion bezeichnet wird. Eine solche Translokation ohne jegliche Rezeptoren wurde z.B. für das HIV-Protein Vpr gefunden, das direkt mit den Nukleoporinen interagiert [Fouchier *et al.* 1998], und so seinen Import ohne lösliche Faktoren durch den Porenkanal selber katalysiert [Jenkins *et al.* 1998]. Es konnte gezeigt werden, daß das NLS des Vpr mit dem Importin  $\beta$ - und Transportin-vermittelten Transport interferiert, was eine Konkurrenz um Bindungsstellen in der NPC nahelegt [Jenkins *et al.* 1998].

Beim aktiven Kern-Cytoplasma-Import über Importine, wie dem des klassischen NLS, bzw. beim aktiven Export über Exportine, die mit Ran-GTP interagieren, fungiert der Ran-GTPase-Zyklus als eine Art molekularer Schalter für den Kern-Cytoplasma-Transport. Die Besonderheit des Ran-GTP-Systems ist die zelluläre Verteilung seiner Regulatoren. Dies hat einen Konzentrationsgradienten des Ran-GTP über die NPCs zur Folge [Görlich *et al.* 1996; Görlich *et al.* 1996; Izaurralde *et al.* 1997]. Hauptsächlich im Cytoplasma lokalisiert sind die beiden mit Ran-GTP interagierenden Proteine RanGAP und RanBP1, deren Anwesenheit für die maximale GTPase-Aktivität von Ran erforderlich ist. Dagegen liegt der Nukleotid-Austauschfaktor für Ran (RCC1) überwiegend im Kern an Chromatin gebunden vor. Die aus Importin und Transportsubstrat bestehenden Importkomplexe können sich nur bei geringer Ran-GTP-Konzentration im Cytoplasma ausbilden und dissoziieren in Gegenwart von Ran-GTP im Kern unter Bildung eines Ran-GTP-Importin-Komplexes [Görlich *et al.* 1997; Rexach und Blobel 1995]. Demnach kontrolliert die Verteilung des Nukleotid-gebundenen Rans die

Bildung des Importkomplexes und gibt dem Transport durch die NPC eine Richtung vor. Exportkomplexe bilden sich dagegen nur in Anwesenheit von Ran-GTP (s. u.). Unter Zuhilfenahme rekombinanter Transportfaktoren und nicht hydrolysierbarer GTP-Analoga konnte gezeigt werden, daß die Energie-generierende Hydrolyse von GTP für die signalvermittelte Translokation durch NPCs nicht unmittelbar erforderlich ist [Schwoebel *et al.* 1998]. Die Hydrolyse von GTP durch Ran scheint jedoch beim Recycling der Importine für weitere Importzyklen eine Rolle zu spielen [Englmeier *et al.* 1999; Ribbeck *et al.* 1999].

Entgegen der Tatsache, daß in der Literatur der aktive Transport in der Vergangenheit oft als ATP-abhängige Reaktion beschrieben wurde, konnte bislang weder beim Import noch beim Export ein ATP-abhängiger Schritt identifiziert werden [Talcott und Moore 1999].

Offenbar sind jedoch auch nicht alle aktiven Transportvorgänge Ran-abhängig. So kann der Transportin-abhängige Transport Substrate mit einem M9 genannten NLS, einer Sequenz aus aromatischen Aminosäureresten und Glycinen, ohne Ran-GTP und ohne NTP-Hydrolyse durch die Kernpore in den Kern bringen [Englmeier *et al.* 1999; Nakielny *et al.* 1996; Ribbeck *et al.* 1999].

Die Orientierung des Transports scheint neben der asymmetrischen Verteilung von Faktoren des Ran-Systems durch die strukturelle Asymmetrie der NPCs sowie durch einen Gradienten zunehmender Affinität der Rezeptoren für die Bindungsstellen entlang der Nukleoporine in der Pore bestimmt zu werden, mit höchster Affinität auf der nukleären Seite beim Import und auf cytoplasmatischer Seite beim Export.

Beim aktiven Export ist anders als beim aktiven Import die Gegenwart von Ran-GTP für die Ausbildung des Exportkomplexes im Kern notwendig. Die Dissoziation des Komplexes und die Freisetzung des Exportsubstrates im Cytoplasma erfolgt nach Hydrolyse des GTP zu GDP unter Einfluß der Effektoren RanGAP (Ran-GTPase-aktivierendes Protein) und RanBP1 (Ran-bindendes Protein). Beim Export in das Cytoplasma gelangtes Ran-GDP wird durch den nicht zu der Importin  $\beta$ -Familie zählenden Transportfaktor NTF-2 (nuclear transport factor 2), der Ran-GDP spezifisch bindet, aktiv in den Kern zurückgebracht [Katahira *et al.* 1999]. Hier steht Ran nach Nukleotidaustausch wieder in GTP-gebundener Form für nachfolgende Transportzyklen zur Verfügung. Ein Beispiel für Exportrezeptoren der Importin  $\beta$ -Familie ist das bereits zuvor beschriebene CAS. Es bindet das Importin  $\alpha$  in Ran-GTP-abhängiger Weise im Kern, entläßt es im Cytoplasma und ist so an dessen Recycling beteiligt [Kutay *et al.* 1997]. Ein weiterer Vertreter dieser Exportrezeptoren ist Exportin-1 (CRM1), das Leucin-reiche NES in Ran-GTP-abhängiger Weise bindet. Es vermittelt den Export NES-haltiger Transportsubstrate, wie z.B. den PKA-Inhibitor PKI [Fornerod *et al.* 1997; Stade *et al.* 1997].

Für den Kern-Cytoplasma-Transport über Diffusion werden zwei Modelle diskutiert [Talcott und Moore 1999]. Nach dem Modell von Hinshaw *et al.* [Hinshaw *et al.* 1992] hat der NPC im Randbereich um die zentrale Öffnung herum acht kleine, offene Kanäle, durch die kleine Moleküle und Ionen ungehindert hindurchtreten können, und die deshalb auch Diffusionskanäle genannt werden. Feldherr und Akin [Feldherr und Akin 1997] postulieren dagegen die Existenz von nur einem zentralen Kanal im Transporterelement, durch den sowohl Diffusion als auch aktiver Transport ablaufen. Der zentrale Transporter fungiert nach diesem Modell als Schranke, die die Größe der diffusiblen Moleküle begrenzt. Beim aktiven Transport soll sich diese nach einem noch unbekanntem Mechanismus weiter öffnen, um größeren Molekülen Platz zu machen. An Stelle des Ein-Schranken-Modells von Feldherr und Akin [Feldherr und Akin 1997] wird von Kinseleva *et al.* (1998) und Goldberg *et al.* (1999) ein Modell mit zwei Schranken favorisiert, die durch die inneren Filamente auf der cytoplasmatischen und der nukleären Seite gebildet werden [Goldberg *et al.* 1999; Kiseleva *et al.* 1998].

Kanäle für die passive Diffusion sollen einen Durchmesser von nur 9 nm haben [Bonner 1978], weshalb es für die passive Diffusion anders als für den aktiven Transport eine durch sterische Hinderung bedingte obere Grenze bei 40 - 60 kDa gibt.

Die Makromoleküle, deren Masse gegen dieses Limit geht, diffundieren nur sehr ineffektiv durch NPCs. Die Diffusionsraten durch die NPCs sind umgekehrt proportional zu ihrer Molekülgröße. So brauchen nach Lang *et al.* [Lang *et al.* 1986] Proteine einer Größe von 17 kDa nur ca. 2 Minuten bis zum Erreichen des Equilibriums zwischen Kern und Cytoplasma, Proteine mit 44 kDa jedoch etwa 30 Minuten. Makromoleküle über 66 kDa scheinen dagegen gar nicht mehr durch NPCs zu diffundieren. Die Diffusionsrate hängt dabei nicht nur von dem Molekulargewicht, sondern auch von der Form des Moleküls ab. Komplexbildungen oder Konformationsänderungen können daher die Diffusionsrate beeinflussen.

Diffusion von Molekülen durch NPCs galt lange Zeit als nicht reguliert. Mittlerweile wird die Möglichkeit einer Regulation der Diffusion zwischen Kern und Cytoplasma angenommen. Als ein möglicher Regulationsmechanismus der Diffusion durch die Porenkanäle wird von Wang *et al.* [Wang und Clapham 1999] eine Abhängigkeit der Permeabilität der NPCs von der Calciumkonzentration im Lumen der Kernmembran angenommen. So konnte beobachtet werden, daß sich durch Freisetzen der Calciumionen aus dem Kernmembranlumen, ein Phosphoinositol-vermittelter Vorgang, der innere Durchmesser von NPCs halbiert.

### 3 Die Kern-Cytoplasma-Translokation der C-Untereinheiten

Das Verständnis des Mechanismus der Kern-Cytoplasma-Translokation der C-Untereinheit ist von besonderer Bedeutung, da die Regulation der intrazellulären Verteilung der C-Untereinheiten ein wirksamer Weg ist, cAMP-abhängige Signal- und Steuervorgänge im Cytoplasma und im Kern zu kontrollieren.

Erste Untersuchungen zur Kern-Cytoplasma-Translokation der C-Untereinheiten wurden 1985 von Nigg *et al.* durchgeführt. Für PKA konnte durch indirekte Immunfluoreszenz gezeigt werden, daß ihre C-Untereinheiten und R-Untereinheiten in Folge einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels dissoziieren. Die C-Untereinheiten verteilen sich zunächst diffus und akkumulieren dann im Kern, während die R-Untereinheiten als Dimer im Cytoplasma verbleiben. Der durch cAMP induzierte Effekt erwies sich als reversibel, da bei einem Absinken der cAMP-Konzentration die C- und R-Untereinheiten re-assoziiieren. Die intrazelluläre Verteilung der R-Untereinheiten wird durch cAMP offenbar nicht beeinflusst [Nigg *et al.* 1985].

Bei Experimenten mit rekombinanter, nicht myristylierter C $\alpha$ -Untereinheit, die in Zellen mikroinjiziert wurde, konnte ebenfalls eine Akkumulation des Enzyms im Kern beobachtet werden [Clegg *et al.* 1989; Meinkoth *et al.* 1990].

Harootunian *et al.* führten 1993 Studien zur Aufklärung des Translokationsmechanismus der C $\alpha$ -Untereinheit zwischen Kern und Cytoplasma durch [Harootunian *et al.* 1993]. Ergebnis der Studien war, daß die Annahme von Diffusion als Translokationsmechanismus ausreicht, um die Verteilung der C $\alpha$ -Untereinheit in der Zelle zu erklären.

Im folgenden soll auf die von Harootunian *et al.* (1993) gemachten Experimente im einzelnen eingegangen werden.

Erste Überlegungen waren, daß die freie C-Untereinheit mit einer Größe von 41 kDa und mit Ausmaßen von 5 \* 6,5 nm [Bossemeyer *et al.* 1993] in der Lage sein sollte, durch die Kernporen (Durchmesser der Diffusionskanäle: ca. 9 nm) zu diffundieren, während das Holoenzym mit ca. 180 kDa zu groß ist.

Ein Vergleich der Verteilung der C $\alpha$ -Untereinheit mit der anderer Makromoleküle sprach für Harootunian *et al.* für Diffusion als Importmechanismus, da sich die C $\alpha$ -Untereinheit ähnlich der verwendeten Kontrolle für Diffusion, dem Trypsininhibitor aus Sojabohnen (STI), verhielt.

Das Vorhandensein eines klassischen Kernlokalisationssignals (NLS) als Vermittler aktiven Imports, wie das von Nukleoplasmin, wurde ausgeschlossen, da die C $\alpha$ -Untereinheiten, anders als Nukleoplasmin, auch wieder aus dem Kern ins Cytoplasma gelangt, während das Holoenzym mit seinem Molekulargewicht von 180 kDa im Cytoplasma verbleibt und die Translokation der C $\alpha$ -Untereinheit in den Kern nach Größenwuchs durch Fusion mit Glutathion-S-Transferase (GST) unterbleibt.

Fantozzi *et al.* (1992) hatten bereits zuvor in der Sequenz der C $\alpha$ -Untereinheit nach Ähnlichkeiten mit NLS-Signalsequenzen gesucht. Ortspezifische Mutagenese-Studien haben jedoch gezeigt, daß zumindest die Peptidsequenz KRVK (189-192), die auf der Oberfläche von C exponiert ist, kein funktionelles Signal für den Kernimport darstellt.

Nach Punktierung der Kernmembran wurde keine Veränderung in der intrazellulären Verteilung der C $\alpha$ -Untereinheit beobachtet, was als Hinweis auf einen freien Austausch der C $\alpha$ -Untereinheit zwischen Kern und Cytoplasma genommen wurde.

Weitere quantitative Daten zur Kern-Cytoplasma-Translokation der C $\alpha$ -Untereinheit nach Mikroinjektion wurden im Hinblick auf die für den klassischen NLS-vermittelten Import geltenden Parameter wie Temperatur- und Energieabhängigkeit sowie Sättigung des Transportweges durchgeführt. Das Translokationsverhalten der C $\alpha$ -Untereinheit wurde zu diesem Zweck mit dem der Diffusionskontrolle STI und dem von Histon H1 als Kontrolle für aktiven Transport verglichen. Die Kinetik der Translokation wurde jeweils an einzelnen Zellen bestimmt. Dabei zeigte sich, daß die Translokation der C $\alpha$ -Untereinheit in den Kern weder durch Competition mit der aktiv importierten Histon H1-Kontrolle noch mit sich selbst zu verlangsamen war, was eher für Diffusion als für eine Translokation über einen sättigbaren aktiven Mechanismus spricht.

Durch Temperaturniedrigung bzw. ATP-Depletion wurde die Translokation sowohl von PKA als auch von STI um einen Faktor von drei bzw. 2,4 verzögert. Die Verzögerung wurde als geringfügig eingestuft. Der aktive Transport des Histon H1 wurde vollständig inhibiert.

Experimente, bei denen die C $\alpha$ -Untereinheit in den Kern injiziert wurde, zeigten, daß die Exportkinetik der Importkinetik sehr ähnlich ist. Die C $\alpha$ -Untereinheit scheint sich demnach frei zwischen Kern und Cytoplasma bewegen zu können.

Wen *et al.* führten 1995 Mikroinjektionsexperimente durch, in denen der Proteinkinase-Inhibitor (PKI) und die C $\alpha$ -Untereinheit coinjiziert wurden, und entdeckten so den aktiven Export der C-Untereinheiten aus dem Kern [Wen *et al.* 1995]. In diesen Mikroinjektionsexperimenten zeigte sich, daß der Komplex aus C $\alpha$ -Untereinheit und PKI den Kern viel schneller verlassen kann als die C $\alpha$ -Untereinheit allein [Wen *et al.* 1995]. Durch die Coinjektion von PKI veränderte sich die Verteilung der C-Untereinheit in den Zellen. In Gegenwart von PKI kam die C-Untereinheit durch den rascheren Export hauptsächlich im Cytoplasma vor. Der Export des Komplexes aus PKI und C $\alpha$ -Untereinheit schien temperatur- und energieabhängig zu sein und tolerierte auch eine Größenzunahme der C $\alpha$ -Untereinheit, z.B. durch Fusion mit GST [Wen *et al.* 1995]. Es stellte sich heraus, daß PKI ein Kernexportsignal besitzt, das erst bei Bindung an die C-Untereinheit exponiert wird [Fantozzi *et al.* 1994]. Als NES wurde eine Sequenz hydrophober Aminosäurereste in der PKI-

Sequenz (Leucin 37 – Threonin 49) identifiziert, die möglicherweise im freien PKI vom N-Terminus des Proteins maskiert wird.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß das im Komplex aus PKI und C $\alpha$ -Untereinheit exponierte NES von dem Transportrezeptor Exportin-1 (CRM 1) erkannt und im Komplex mit Ran-GTP gebunden wird. Exportin-1 vermittelt die Interaktionen mit den Nukleoporinen und exportiert so den Exportkomplex durch die Kernpore ins Cytoplasma, wo dieser nach Hydrolyse von GTP zu GDP dissoziiert [Wen *et al.* 1995]. PKI kann daraufhin die C-Untereinheiten an R-Untereinheiten im Cytoplasma übertragen und somit das PKA-System bei sinkendem cAMP-Spiegel wieder in den Ausgangszustand zurückversetzen [Wen *et al.* 1995].

Untersuchungen aus der Abteilung für Pathochemie in Kooperation mit Herrn R. Pepperkok (EMBL, Heidelberg) ergaben in Abhängigkeit von einer posttranslationalen Modifikation am N-Terminus der C-Untereinheit unterschiedliche intrazelluläre Verteilungen [Girod 1997; Pepperkok *et al.* 2000]. Ein Drittel der aus Herzmuskel isolierten C-Untereinheiten ist am zweiten Aminosäurerest, einem Asparagin (N 2), zu Aspartat (D 2) deamidiert [Jedrzejewski *et al.* 1998]. Die biologische Bedeutung dieser Deamidierung, die eine Zunahme in der Elektronegativität der C-Untereinheit bedeutet, ist noch nicht bekannt. Um den Einfluß der Deamidierung auf die intrazelluläre Verteilung der katalytischen Untereinheit zu untersuchen, wurden native C-Untereinheiten der amidierten (N 2) und der deamidierten (D 2) Form in Zellen mikroinjiziert. Es zeigte sich, daß das unabhängig von der Art und Weise der Detektion und der verwendeten Zelllinie bestimmte Kern-Cytoplasma-Verhältnis für die N 2-Form um einen Faktor von 1,5 - 2,3 höher war als das der deamidierten Form D 2. Die amidierte Form erreichte also höhere Konzentrationen im Kern als die D 2-Form. Die intrazelluläre Verteilung der beiden Formen spiegelte sich auch in der im Kern bestimmten Aktivität der C-Untereinheiten wieder. So wurde nach Mikroinjektion der N 2-Form eine höhere Konzentration an phosphoryliertem CREB im Kern nachgewiesen als nach Mikroinjektion der deamidierten Form. Da für beide Formen ähnliche Affinitäten für die Regulatoren R-Untereinheit und PKI gefunden wurden, liegen vermutlich andere die Lokalisation der C-Untereinheiten bestimmende Mechanismen der beobachteten unterschiedlichen Verteilung zugrunde.

## 4 Arbeitshypothese

Die von der Abteilung für Pathochemie in Kooperation mit Herrn R. Pepperkok (EMBL, Heidelberg) [Girod 1997; Pepperkok *et al.* 2000] gemachte Beobachtung, daß die Verteilung der C-Untereinheit von posttranslationalen Modifikationen beeinflusst wird, wirft die Frage auf, ob der Import der C $\alpha$ -Untereinheit in den Kern mit dem Modell der Diffusion ausreichend erklärt ist oder ob andere oder weitere Mechanismen für die Kernlokalisierung der C $\alpha$ -Untereinheit verantwortlich sind. Dieser Frage wurde in der vorliegenden Arbeit nachgegangen.

Es war daher von besonderem Interesse, über die von Harootunian *et al.* [Harootunian *et al.* 1993] gemachten Studien hinaus vor dem Hintergrund des in der Zwischenzeit erheblich verbesserten Wissen sowohl über den Kernimport und -export als auch über die Proteinkinase A die Translokation der C $\alpha$ -Untereinheit in den Kern unter Verwendung quantitativer Auswertemethoden und zeitgemäßer Werkzeuge zum Studium von Kerntransportvorgängen zu untersuchen.

Dies schien sinnvoll, da sich die von Pepperkok bzw. Harootunian *et al.* erhobenen Daten sowohl in der Höhe der erreichten Kern-Cytoplasma-Verhältnisse (5:1 bei Pepperkok *et al.*; 2:1 bei Harootunian *et al.*) als auch in der Zeitdauer bis zum Erreichen des Verteilungsequilibriums von 10 – 15 Minuten [Pepperkok *et al.* 2000] zu mehr als 30 Minuten [Harootunian *et al.* 1993] unterschieden.

Dabei ist anzunehmen, daß es Unterschiede in den Untersuchungsmethoden gab. So haben Harootunian *et al.* ihre Kinetiken z.T. an Einzelzellen erhoben, während Pepperkok *et al.* Mittelwerte bestimmt haben aus Daten, die an 50 - 100 Zellen bestimmt wurden.

In der vorliegenden Arbeit wurden quantitative Mikroinjektionsexperimente mit intakten Zellen und später auch sogenannte Import-Assays mit permeabilisierten Zellen zur Translokation der katalytischen Untereinheit der PKA durchgeführt.

Die Quantifizierung der Verteilung des Enzyms in Kern und Cytoplasma wurde dabei an einer ausreichend großen Anzahl von Zellen über digitale Fluoreszenzmikroskopie bestimmt und erlaubte es so, Unterschiede in der Verteilung der Probe zwischen den Kompartimenten in Abhängigkeit von verschiedenen Parametern zu beurteilen. Um über die Zeitdauer der Untersuchung mit einer katalytischen Untereinheit konstanter Qualität arbeiten zu können, wurde in *E.coli* rekombinant hergestellte myristylierte C $\alpha$ -Untereinheit (rC $\alpha$ myr) verwendet.

Die mit der C-Untereinheit beobachteten Effekte wurden mit denen von Kontrollproteinen für aktiven Import und für Diffusion verglichen. Da die Diffusion anders als der aktive Transport sehr wohl größenabhängig ist, schien es sinnvoll, eine Diffusionskontrolle mit ähnlichem Diffusionsverhalten wie dem des Enzyms zu finden.

Es wurden drei mögliche Modelle zur Veranschaulichung der Translokation der C $\alpha$ -Untereinheit herangezogen. Denkbar wäre ein aktiver signalvermittelter Import, der entweder

über Importrezeptoren oder über direkte Interaktionen der C-Untereinheit und NPCs ablaufen könnte. Ein weiterer möglicher Translokationsmodus wäre der von Harootunian *et al.* [Harootunian *et al.* 1993] beschriebenen Diffusion. In diesem Modell kann sich die Kinase nur gleichmäßig zwischen Kern und Cytoplasma verteilen und sich in keinem der Zellkompartimente anreichern. Als dritte Möglichkeit bietet sich wiederum das Modell einer Translokation über Diffusion an, allerdings mit dem Unterschied, daß Bindungspartner in entweder einem oder beiden der großen Zellkompartimente Kern und Cytoplasma angenommen werden, wodurch eine Akkumulation in einem der Kompartimente möglich würde.

Ziel der Untersuchungen dieser Arbeit war es daher, das Translokationsverhalten der  $C\alpha$ -Untereinheit der PKA zu analysieren und zu prüfen, ob und wieweit es sich mit Hilfe der experimentellen Ergebnisse und anhand der Literatur einem dieser Modelle zuordnen läßt.

# Material und Methoden

## 1 Material

### 1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle verwendeten Chemikalien hatten den Reinheitsgrad p.a. (*pro analysis*) und stammten, wenn nicht anders angegeben, von der Firma Merck (Darmstadt). Die sonstigen Materialien wurden von folgenden Herstellern bezogen:

<u>Produkt</u>	<u>Hersteller/Quelle</u>
2-Desoxy-D-Glukose	Sigma, Deisenhofen
Acrylamidfertiglösung (30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid (w/v))	National Diagnostics, Atlanta, USA
cAMP (Adenosin-3':5'-Cyclo-Monophosphat), Natriumsalz	Sigma, Deisenhofen
Agarose, Qualex Gold	Hybaid-AGS GmbH, Heidelberg
ATP (Adenosin-5'-Triphosphat, Dinatriumsalz)	Sigma, Deisenhofen
Bacto-Agar	Difco Laboratories, Detroit, USA
BSA (Rinderserumalbumin Fraktion V)	Sigma, Deisenhofen
Carbenicillin, Dinatriumsalz	Hybaid-AGS GmbH, Heidelberg
CHAPS ([3([3-Cholamidopropyl]Dimethylammonio)-1-Propansulfat	AppliChem, Darmstadt
Complete™ Mini, EDTA-frei (Proteaseinhibitor-Cocktail)	Boehringer Mannheim, Mannheim
Coomassie Blau G	Serva, Heidelberg
Cytochalasin B	Sigma, Deisenhofen
DABCO (Diazobicyclo[2,2,2]octanetriethylendiamin)	Sigma, Deisenhofen
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma, Deisenhofen
DNA-Molekulargewichtsmarker	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Roth
dNTP Mix	Hybaid-AGS GmbH Heidelberg; Stratagene, La Jolla, USA
DTT (1,4-Dithio-D,L-Threitol)	Gerbu, Gaiberg
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Sigma, Deisenhofen
Ethanol	Sigma, Deisenhofen
Ethidiumbromid	Biomol, Hamburg
FluoroLink™ Cy3 monofunctional dye	Amersham, Braunschweig
Glutathion, reduziert	Sigma, Deisenhofen
Glycerin, 99,5%	Roth, Karlsruhe
Gpp[NH]p, (5'-Guanylylimidodiphosphat)	Sigma, Deisenhofen
H-8 (N-(2-Methylamino)-ethyl-5-isoquinolinesulfonamid 2HCl)	Biomol, Hamburg

H-89 (N-[2-(p-Bromocinnamylmethylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamid 2HCl)

Hefeextrakt

HEPES ([N(2-Hydroxyethyl)Piperazin-N'-(2-Ethansulonsäure)])

IPTG (Isopropylthio-β-Galaktosid)

Kälberserum

Kanamycin-Monosulfat, BP88

L-Arginin

Microloader

Mowiol® 4-88

EZ-Link™ NHS-Biotin

Paraformaldehyd

Phosphocellulose P11, Kationenaustauscher

PKI (Proteinkinase-Inhibitor), Kaninchenmuskel, rekombinant

Polaroid Filme 667

Proteinmolekulargewichtsmarker

Qiagen Plasmid Mini Kit

Qiaquick Gel Extraction Kit

Qiaquick PCR Purification Kit

QuikChange™ Site-Directed Muagenesis Kit

Retikulozyten-Lysat, Kaninchen, unbehandelt

SDS (Natrium-Dodecylsulfat)

SMCC (Sulfosuccinimidyl-trans-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexan-1-carboxylat)

Szintillationsflüssigkeit Aquasafe 500

TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylendiamin)

Tris[Hydroxymethyl]aminomethan

Triton X-100

Trypsin (0,06% in PBS, 0,02% EDTA)

Tween 20

Western Blot Chemiluminiscence Reagent Plus

WGA (Weizenkeimagglutinin)

[γ<sup>32</sup>-P]-ATP; 5000 Ci/mmol

Restriktionsendonukleasen

Biomol, Hamburg

Difco Laboratories, Detroit, USA  
Sigma, Deisenhofen

AppliChem, Darmstadt

Gibco, Karlsruhe

Hybaid-AGS GmbH, Heidelberg

Sigma, Deisenhofen

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH

Calbiochem, La Jolla, USA

Pierce, Rockford, USA

Sigma, Deisenhofen

Whatman, Maidstone, GB

Biomol, Hamburg

Siemens, Stuttgart

Sigma, Deisenhofen;

BioRad, München

Qiagen, Hilden

Qiagen, Hilden

Qiagen, Hilden

Stratagene, La Jolla, USA

Promega, Madison, USA

Serva, Heidelberg

Calbiochem, La Jolla, USA

Zinsser, Frankfurt

Sigma, Deisenhofen

Biomol, Hamburg

Sigma, Deisenhofen

Roth, Karlsruhe

Serva, Heidelberg

NEN™ Life Science, Boston, USA

Sigma, Deisenhofen

Amersham, Braunschweig

Hybaid-AGS GmbH, Heidelberg

## 1.2 Peptide

### Peptid

In CELLect™ St-Ht31 Inhibitorpeptid

In CELLect™ St-Ht31 Kontrollpeptid

Kemptid

PKI(5-25)-Peptid, Kaninchensequenz

myr PKI(6-24)

myr PKI(6-24) (random), Kontrollpeptid

SV40 NLS-Peptid

SV40 NLS-Peptid (revers), Kontrollpeptid

### Quelle

Promega, Mannheim

Promega, Mannheim

DKFZ, R.Pipkorn

DKFZ, R.Pipkorn

DKFZ, R.Pipkorn

DKFZ, R.Pipkorn

DKFZ, H.-R. Rackwitz

DKFZ, H.-R. Rackwitz

Die Sequenzen der Peptide sind dem Anhang zu entnehmen.

### 1.3 Antikörper

<u>Antikörper</u>	<u>Einsatz</u>	<u>Hersteller/Quelle</u>
Anti-GST, Ziege	WB	Pharmacia Biotech, Freiburg
Anti-Kaninchen-Cy3, Ziege	IF	Amersham, Braunschweig
Anti-Kaninchen-DTAF, Ziege	IF, MI	Dianova, Hamburg
Anti-Kaninchen-Rhodamin, Ziege	MI	Dianova, Hamburg
Anti-Maus-Cy3, Ziege	IF, MI	Amersham, Braunschweig
Anti-Maus-Peroxidase, Schaf	WB	Dianova, Hamburg
Anti-PKA C $\alpha$ (C-20), Kaninchen, polyklonal	WB	Santa Cruz Biotechnology,
Anti-PKA C, Maus	WB	Transduction Lab., Lexington, USA
Anti-PKA RI $\alpha$ , Maus, monoklonal	IF	Transduction Lab., Lexington, USA
Anti-PKA RII $\alpha$ , Maus, monoklonal	IF	Transduction Lab., Lexington, USA
Anti-PKA RII $\beta$ , Maus, monoklonal	IF	Transduction Lab., Lexington, USA
Anti-PKA RI $\beta$ (C-19), Kaninchen	IF	Santa Cruz Biotechnology,
Anti-PKI $\alpha$ (C-20), Ziege, polyklonal	IF, WB	Santa Cruz Biotechnology,
Anti-PKI $\alpha$ (N-20), Ziege, polyklonal	IF, WB	Santa Cruz Biotechnology,
Anti-Ziege-FITC, Kaninchen	IF, MI	Sigma, Deisenhofen
Anti-Ziege-Peroxidase, Kaninchen	WB	Dianova, Hamburg

IF: Immunfluoreszenz

WB: Western Blot

MI: Mikroinjektion

## 2 Mikrobiologische Methoden

### 2.1 Bakterienstämme

<u>Stamm</u>	<u>Genotyp</u>	<u>Quelle</u>
Plasmidpräparation:		
XL1Blue :	<i>recA lac<sup>-</sup>; F'[lac<sup>q</sup> lacZ<math>\Delta</math>M15]; endA; hsR17</i>	Stratagene, La Jolla, USA
Proteinexpression:		
BL21(DE3):	<i>F<sup>-</sup>; ompT; lon<sup>-</sup>; hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>)</i>	Novagen, Madison, USA

### 2.2 Plasmide

<u>Plasmid</u>	<u>Genotyp/Phänotyp</u>	<u>Quelle</u>
pT7-7	Ap <sup>R</sup> ; T7-Promotor, Co/EI ori	Stanley Tabor, 1990
pBB131	Kn <sup>R</sup> ; Protein-NMT-codierende Sequenz aus Hefe	J.I. Gordon, Washington University, USA
pET28b <sup>+</sup>	Kn <sup>R</sup> ; fl <sup>+</sup> ori, pBR322 ori, lacI <sup>q</sup> , T7-Promotor	Novagen, Madison, USA
pMC-1871	Tet <sup>R</sup> , lacZ, pBR322 ori	Pharmacia Biotech, Freiburg
pGEX4T2	Ap <sup>R</sup> , lacI <sup>q</sup> , pBR322 ori, tac-Promotor	Pharmacia Biotech, Freiburg

## 2.3 Nährmedien

### Nährmedien

Die mikrobiologischen Arbeiten wurden ausschließlich unter Verwendung von sterilen Gefäßen, Materialien und Lösungen durchgeführt. Das Autoklavieren erfolgte bei 121 °C für mindestens 20 Minuten. Lösungen, wie z.B. Glukoselösungen, die nicht autoklaviert werden können, wurden mit 0,22 µm-Filtern sterilfiltriert.

Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium 1,2 % Agar zugesetzt.

Folgende Medien wurden verwendet:

<u>LB-Medium (Luria-Bertani-Medium):</u>	10	g/l	Pepton
	5	g/l	Hefeextrakt
	5,5	g/l	Natriumchlorid
<u>S.O.B.-Medium:</u>	20	g/l	Pepton
	5	g/l	Hefeextrakt
	0,5	g/l	Natriumchlorid
	2,5	mM	Kaliumchlorid
Zugabe nach dem Autoklavieren:	10	mM	Magnesiumchlorid (sterilfiltriert)
<u>S.O.C.-Medium:</u>	S.O.B.-Medium + 20 mM Glukose (sterilfiltriert)		

### Medienzusätze

Durch Zugabe von Antibiotika zu autoklavierten Medien erhält man Selektivmedien. Da die Antibiotika nicht thermostabil sind, wurden die Medien nach dem Autoklavieren erst auf 50°C abgekühlt, bevor sie mit Antibiotika versetzt wurden.

<u>Antibiotika</u>	<u>Konzentration</u>	<u>Lösungsmittel</u>	<u>Lagerung</u>
Carbenecillin (Cb)	50 µg/ml	(50% Ethanol)	- 20 °C
Kanamycin (Kn)	50 µg/ml	(H <sub>2</sub> O)	- 20 °C

## 2.4 Bakterienanzucht

Eine Anzucht von Bakterien auf Festmedien erfolgte z.B. nach einer Transformation, um Einzelkolonien zu bekommen. Dazu wurde ein Aliquot der Bakterienzellsuspension mit einer Glaspipette auf dem Agar verteilt. Die Bakterien wuchsen über Nacht bei 37°C in einem Brutschrank (Typ A, Melag, Berlin).

Zum Animpfen einer Vorkultur für die Proteinexpression wurden 5 bzw. 10 ml LB-Kulturmedium mit je einem Klon von einem Festmedium angeimpft. Das Hochziehen der Vorkultur erfolgte bei 37°C und 250 rpm in einem Schüttelinkubator (Infors AG, Schweiz). Die anschließende Hauptkultur in einem 1 l-Schüttelkolben wurde im Verhältnis 1:100 - 1:200 mit einer Vorkultur angeimpft und über Nacht inkubiert (24 °C bzw. 37 °C, 120 rpm).

Zur Plasmidfermentation wurde 10 ml LB-Medium im Reagenzglas mit einem Klon einer Selektivplatte angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 250 rpm über Nacht.

Zur Anzucht von plasmidtragenden Stämmen wurde dem Medium, um eine Segregation zu unterbinden, jeweils das Antibiotikum zugesetzt, für welches das Plasmid Resistenz vermittelte.

## 2.5 Bestimmung der Bakterienzeldichte

Die Bakterienzeldichte einer Flüssigkultur wurde durch Messung der optischen Dichte (OD) in einem Spektralphotometer (Ultrospec 2000, Pharmacia, Freiburg) bei einer Wellenlänge von 660 nm bestimmt ( $OD_{660}$ ). Als Referenz wurde demineralisiertes Wasser verwendet. Die Messungen der OD sollten im linearen Meßbereich ( $OD_{660}$  0,3 – 0,8) durchgeführt werden. Dazu mußte die zu messende Kultur gegebenenfalls verdünnt werden.

## 2.6 Herstellung transformationskompetenter *E. coli*-Bakterien

Unter der Transformation versteht man das Einschleusen von isolierter DNA in Bakterienzellen, die fähig (kompetent) sind, diese DNA aufzunehmen. *E. coli*-Bakterien sind normalerweise nicht zur Transformation in der Lage. Durch Behandlung mit den Salzen Rubidiumchlorid, Kalziumchlorid und Magnesiumchlorid können sie jedoch bei niedrigen Temperaturen zur Transformation, d.h. zur Aufnahme von freier DNA aus dem Medium, befähigt werden [Hanahan 1983].

Durchführung:

- Inokulation von 50 ml S.O.B-Medium mit einer ü.N.-Kultur ( $OD_{660}$ : 0,02 - 0,03)
- Inkubation für 2 Stunden bei 37 °C und ca. 140 rpm bis zum Erreichen einer  $OD_{660}$  von 0,3 - 0,35
- Aufteilen der Kultur auf zwei 50 ml-Falcongefäße
- Inkubation für 15 Minuten auf Eis
- Zentrifugation bei 4 °C für 20 Minuten bei 3000 - 4000 · g
- Verwerfen des Überstandes
- Resuspendieren der Bakterienzellpellets in je 8,3 ml eiskaltem RF1-Puffer
- Inkubation für 15 Minuten auf Eis
- Zentrifugation bei 4 °C für 20 Minuten bei 3000-4000 · g
- Resuspendieren der Bakterienzellpellets in je 2 ml eiskaltem RF2-Puffer
- Inkubation für 15 Minuten auf Eis
- Aliquotieren der Bakteriensuspensionen 100 µl-weise in Eppendorfgefäße
- Lagerung der aliquotierten Bakterienzellen bei -80 °C

<u>RF1-Puffer:</u>	100	mM	Rubidiumchlorid
	10	mM	Kalziumchlorid
	50	mM	Magnesiumchlorid
	15	% (w/v)	Glyzerin
	30	mM	Kalium-Acetat, pH 5,8

<u>RF2-Puffer:</u>	10	mM	Rubidiumchlorid
	75	mM	Kalziumchlorid
	15	% (w/v)	Glyzerin
	10	mM	MOPS, pH 6,8

## 2.7 Transformation / Cotransformation

Wird bei der Transformation, d.h. beim Einschleusen von DNA-Molekülen in *E. coli*-Bakterien, ein Plasmid verwendet, dessen Replikationsstartpunkt von der Wirtzelle erkannt wird, so replizieren die transformationskompetenten Bakterien das Plasmid. Dieses kann dann durch Aufreinigung in größeren Mengen gewonnen werden (s. *Material und Methoden* 3.1). Handelt es sich bei dem Plasmid um einen Expressionsvektor, so kann von der

Wirtszelle unter kontrollierten Bedingungen ein bestimmtes Protein exprimiert werden (s. *Material und Methoden* 4.1).

Als Cotransformation bezeichnet man das gleichzeitige Einschleusen von zwei oder mehr verschiedenen Plasmiden in kompetente *E. coli*-Bakterien. In der vorliegenden Arbeit war dies zur Expression myristylierter Proteine notwendig.

Die Transformationsvorschrift wurde für die Bakterienstämme XL1Blue und BL21(DE3) angewandt.

Durchführung:

- Auftauen eines 100 µl-Aliquots kompetenter Bakterienzellen auf Eis
- Zugabe der Plasmid-DNA (1-100 ng)
- Inkubation auf Eis für 30 - 60 Minuten
- Hitzeschock: bei 42 °C für 90 Sekunden
- Inkubation auf Eis für 2 Minuten
- Zugabe von 500 µl S.O.C.-Medium
- Inkubation bei 37 °C für 30 - 60 Minuten bei leichtem Schütteln (Ausbildung der Resistenz)
- Ausplattieren von 100 - 200 µl auf Selektionsagarplatten
- Inkubation im Wärmeschrank bei 37 °C ü.N.

### 3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.1 Aufreinigung von DNA

##### 3.1.1 Plasmidpräparation (Minipräparation)

Die Minipräparation erlaubt es, in kurzer Zeit aus einer Bakterienkultur Plasmid-DNA aufzureinigen, die für Restriktionsanalysen, Ligationen, Transformationen und Sequenzierungen verwendet werden kann. In dieser Arbeit wurde dazu das Qiaprep Spin Miniprep Kit benutzt. Die Durchführung basiert auf drei Schritten: Alkalische Lyse der Bakterien unter Denaturierung von Proteinen und DNA, Adsorption der renaturierten Plasmid-DNA an die QIAprep-Membran und Waschen und Eluieren der Plasmid-DNA.

Die genaue Durchführung ist dem QIAprep Miniprep Handbuch zu entnehmen.

##### 3.1.2 Extraktion von DNA aus Agarosegelen

Um mit bestimmten DNA-Fragmenten einer Restriktionsspaltung weiterarbeiten zu können, mußten diese zunächst voneinander getrennt und isoliert werden. Dazu wurde der Spaltungsansatz auf ein 0,7 - 1 % iges TAE- oder TBE-Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch getrennt (s. *Material und Methoden* 3.2). Nach Ethidiumbromid-Färbung des Gels konnte aus diesem unter langwelligem UV-Licht (365 nm) die Bande des gewünschten DNA-Fragments mit einem Skalpell ausgeschnitten werden.

Die DNA wurden mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit nach Vorschrift aus dem Agarosegel extrahiert. Das Prinzip des Kits beruht auf der spezifischen DNA-Bindung an eine Silikat-Gelmembran, von der die aus dem Agarosegel gelöste DNA, nach einem Waschschrift von Verunreinigungen befreit, mit Tris-Puffer (pH 8,5) eluiert werden kann.

### 3.1.3 Reinigung von PCR-Produkten

PCR-Produkte (s. *Material und Methoden* 3.5.2) wurden mit dem QIAquick Spin PCR Purification Kit aufgereinigt. Das aufgereinigte PCR-Produkt ist nach der Anwendung des Kits frei von Nukleotiden, Primern, Enzymen, Salzen und Mineralöl. Die Aufreinigung wurde nach dem Protokoll des QIAquick Spin PCR Purification Kits durchgeführt.

## 3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Auf einem Agarosegel lassen sich DNA-Moleküle nach Größe und Konformation elektrophoretisch auftrennen. Die elektrophoretische Auftrennung hängt dabei von der Agarosekonzentration des Gels, der Länge der Laufstrecke und der angelegten Spannung ab.

Es wurden 0,7 % ige und 1 % ige Agarosegele auf TBE- oder TAE-Pufferbasis verwendet. Die DNA-Proben wurden zuvor mit 20 % DNA-Ladungspuffer (DNA-Blue-Run, Hybaid-AGS, Heidelberg) versetzt. Je Spur wurden 0,2 bis 2 µg DNA in einem Volumen bis zu 25 µl aufgetragen.

<u>TAE-Puffer:</u>	40	mM	Tris
	2	mM	EDTA
	20	mM	Natrium-Acetat, pH 7,8

(Einstellen des pH-Wertes mit konzentrierter Essigsäure)

<u>TBE-Puffer:</u>	90	mM	Tris, pH 8
	2	mM	EDTA
	90	mM	Borsäure

<u>Ladungspuffer:</u>	25	mM	Tris, pH 7
	150	mM	EDTA
	25	% (v/v)	Glyzerin
	0,05	% (w/v)	Bromphenolblau

Nach der Elektrophorese wurde die Gelmatrix in einer Ethidiumbromidlösung (1 µg/ml) inkubiert, so daß die DNA-Banden durch UV-Beleuchtung sichtbar gemacht werden konnten. Auf einem Transluminator konnte das gefärbte Gel mit einer Polaroid-Kamera (MP4<sup>+</sup>-Land Kamera) fotografisch festgehalten werden.

Um die Länge linearer DNA-Moleküle im Agarosegel abschätzen zu können, wurden bei der elektrophoretischen Auftrennung ein Molekulargewichtsmarker (10 kb DNA-Leiter, Gibco, Karlsruhe) mit bekannten Fragmentlängen als Referenz aufgetragen.

## 3.3 Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration einer absorbierenden Substanz kann spektralphotometrisch unter Anwendung des Lambert-Beerschen-Gesetzes bestimmt werden. Es besagt, daß das Adsorptionsvermögen, die Extinktion, einer Lösung bei gegebener Wellenlänge der durchstrahlten Schichtdicke und der molaren Konzentration des absorbierenden Stoffes proportional ist:

$$E = \log \frac{I_0}{I_D} = \epsilon \cdot c \cdot d$$

mit E: Extinktion (OD),  $I_0$ : Intensität des eingestrahlteten monochromatischen Lichts,  $I_D$ : Intensität des Lichts nach Durchgang durch die Probe, d: Schichtdicke, c: molare Konzentration,  $\epsilon$ : molarer Extinktionskoeffizient.

Die Konzentrationsbestimmung der DNA erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einem Spektralphotometer (Ultrospec 2000, Pharmacia, Freiburg). Nach Multiplikation der gemessenen  $OD_{260}$  mit dem Verdünnungsfaktor entspricht eine  $OD_{260}$  von 1 einer Konzentration von  $50 \mu\text{g dsDNA}/\mu\text{l}$ .

Die molare DNA-Konzentration lässt sich mit dem molaren Extinktionskoeffizienten  $\epsilon$  berechnen. Dieser beträgt bei Plasmid-DNA  $6500 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  pro Nukleotid.

Um die Kontamination der DNA durch Proteine zu überprüfen, wurde bei aus Bakterien aufgereinigter DNA eine Referenzmessung bei einer Wellenlänge von 280 nm durchgeführt. Das Verhältnis  $OD_{260} / OD_{280}$  ist ein Kriterium für die Reinheit der DNA und sollte über 1,8 liegen.

### 3.4 Klonierung

#### 3.4.1 Restriktionsspaltung von DNA

Es wurden verschiedene Restriktionsendonukleasen (Hybaid-AGS, Heidelberg) für die analytischen und präparativen Spaltungen verwendet. Die optimalen Reaktionsbedingungen, wie Reaktionspuffer, d.h. pH-Wert, Art und Ionenstärke, und Reaktionstemperatur, sind für die verschiedenen Restriktionsendonukleasen unterschiedlich. Sie wurden gemäß den Vorschriften des Herstellers gewählt. Typischerweise betrug ein das Volumen eines Reaktionsansatzes  $10 \mu\text{l}$ , in dem  $0.2 - 2 \mu\text{g}$  Plasmid-DNA und  $1 - 5 \text{ U}$  Enzym enthalten waren.

Bei Restriktionsspaltungen mit zwei Enzymen wurde der Puffer verwendet, in dem für beide Enzyme eine zufriedenstellende Aktivität zu erwarten war.

<u>Restriktionsansatz (<math>10 \mu\text{l}</math>):</u>	$0,2 - 1 \mu\text{g}$	Vektor-DNA
	$1 \mu\text{l}$	$10\text{x}$ Restriktionsenzym-Puffer
	$5 - 10 \text{ U}$	Restriktionsenzym
	$x \mu\text{l}$	Bidest

#### 3.4.2 DNA-Dephosphorylierung

Um eine Rezirkularisierung gespaltener Plasmid-DNA während der Ligation zu vermeiden und so die Effizienz der Ligation zu erhöhen, wurde der gespaltene Vektor zuvor dephosphoryliert, da DNA-Ligasen nur 5'-Phosphat-Enden mit 3'-OH-Gruppen verknüpfen können. Zur Dephosphorylierung wurde die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm eingesetzt, eine Phosphomonoesterase, die Phosphatgruppen am 3' und 5'-Ende von DNA entfernen kann.

<u>Reaktionsansatz (<math>50 \mu\text{l}</math>):</u>	$1 - 20 \text{ pmol}$	Plasmid-DNA
	$1 - 2 \mu\text{l}$	alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (ca. $0,1 \text{ U}$ )
	$5 \mu\text{l}$	$10\text{x}$ OPA-Puffer (Endkonzentration: $1\text{x}$ )
	$x \mu\text{l}$	Bidest

Die Dephosphorylierungsreaktion wurde für 30 Minuten bei  $37^\circ\text{C}$  durchgeführt. Zur anschließenden Hitzeinaktivierung der Phosphatase wurde der Ansatz für 15 Minuten bei  $85^\circ\text{C}$  inkubiert.

### 3.4.3 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der Ligation werden Phosphodiesterbindungen zwischen benachbarten 3'-Hydroxyl- und 5'-Phosphatenden doppelsträngiger DNA-Ketten so verbunden, daß aus DNA-Fragmenten oder ringoffenen Plasmiden wieder geschlossene ringförmige Moleküle entstehen. Die hier verwendete T4-DNA-Ligase verbindet sowohl kohäsive als auch glatte Enden.

Zur Steigerung der Ligationseffizienz wurde das Reaktionsvolumen so klein wie möglich gehalten und die Insert-DNA im dreifach molaren Überschuß zur Vektor-DNA eingesetzt. Die Ligation erfolgte bei 14 °C ü.N.

<u>Reaktionsansatz:</u>	100	fmol	Vektor-DNA
	300	fmol	Insert-DNA
	1 - 5	U	T4-Ligase
	x	µl	10x Ligationspuffer (Endkonzentration: 1x)

## 3.5 Mutagenesen

### 3.5.1 Mutagenese mit dem QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit

Das QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, USA) kann zur Einführung von Punktmutationen, Austausch von Aminosäuren, Insertionen oder Deletionen von einer oder mehreren Aminosäuren in jedem beliebigen doppelsträngigen, aus *E. coli* isoliertem Plasmid verwendet werden.

Für die Mutagenese werden ein Thermocycler, die *PfuTurbo*<sup>TM</sup> DNA Polymerase, doppelsträngige Vektor-DNA, die das zu mutagenisierende Insert enthält, und zwei synthetische Oligonucleotidprimer, die die Mutation tragen und komplementär zueinander sind, benötigt.

Die *PfuTurbo*<sup>TM</sup> DNA Polymerase verlängert während der Temperaturzyklen die synthetischen Primer mit sehr hoher Lesegenauigkeit und ohne die Mutationen zu korrigieren. Als PCR-Produkt entsteht mutierte Plasmid-DNA. Im folgenden Schritt wird die parenterale, nicht mutierte Vektor-DNA, die im Gegensatz zu der über PCR synthetisierten DNA, aufgrund ihrer Herkunft aus *E. coli*, methyliert ist, mit der für methylierte DNA spezifische DNA Dnpl-Endonuklease verdaut. Im letzten Schritt des Kits wird die mutagenisierte Plasmid-DNA in superkompetente *Epicurian Coli*<sup>®</sup> XL1Blue transformiert, in denen der Nick des Plasmids geschlossen wird.

Die Details der Durchführung sind dem Handbuch zu entnehmen.

Der Erfolg der Mutagenese wurde durch Sequenzierung (s. *Material und Methoden* 3.6) des mutierten Plasmids überprüft.

### 3.5.2 PCR

PCR (Polymerase-Kettenreaktion) ist eine *in vitro*-Methode für die enzymatische Synthese definierter DNA-Sequenzen. Die Reaktion bedarf zweier Oligonekleotid-Primer, die an komplementäre Stränge hybridisieren und die zu amplifizierende DNA-Sequenz flankieren. Die Verlängerung der Primer wird durch die *Taq* DNA-Polymerase katalysiert. Eine sich wiederholende Abfolge von Zyklen -bestehend aus Denaturierung der DNA-Vorlage (Template), Primer-Annealing und Verlängerung der hybridisierten Primer durch die *Taq* DNA-Polymerase- resultiert in einer exponentiellen Akkumulation des spezifischen DNA-Fragments.

Über die PCR ist es möglich, an den Enden der zu amplifizierenden Sequenz neue Restriktionsschnittstellen einzufügen oder Stopp-Codons zu entfernen bzw. andere ortsspezifische Mutationen zu integrieren. Eine de novo-Synthese kurzer Sequenzen ist

ebenfalls möglich, wenn sich überlappende Primer eingesetzt werden; Template-DNA fehlt in diesen Ansätzen.

<u>PCR-Ansatz (100 µl):</u>	10-50 µg	DNA
	30 pmol	je Primer
	3 µl	dNTP-Mix (10 mM je Nukleotid)
	3 µl	25 mM Magnesiumchlorid-Lösung
	1 µl	<i>Tth</i> -DNA-Polymerase (4 U)
	10 µl	10x PCR-Puffer
	x µl	Didest

Die Ansätze wurden mit 50 µl Mineralöl überschichtet.  
Die verwendeten PCR-Programme sind dem Anhang zu entnehmen.

### 3.6 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden von Herrn Dr. Hunziker (Abteilung Zellbiologie, DKFZ, Heidelberg) mit einem ABI 373 A Cycle Sequencer durchgeführt.

## 4 Proteinbiochemische Methoden

### 4.1 Expression rekombinanter Proteine

Für die Expression rekombinanter Proteine wurden Vektoren (pT7-7 und pET28b) verwendet, in denen die Transkription des rekombinanten Gens unter der Kontrolle eines T7-Promotors stand. Die Transkription ist dabei von der Gegenwart der T7-Polymerase abhängig [Studier *et al.* 1990], die im Chromosom des verwendeten *E. coli*-Expressionsstammes BL21(DE3) codiert vorliegt. Dort wird die Transkription des Gens der T7-Polymerase durch einen lacUV-Promotor kontrolliert, der durch IPTG induziert werden kann. Die Expression des rekombinanten Proteins ist somit über IPTG-Zugabe zu steuern. Der *E. coli*-Expressionsstamm BL21(DE3), der in dieser Arbeit ausschließlich verwendet wurde, zeichnet sich zudem durch eine geringe Protease-Aktivität aufgrund von Mutationen in den für Proteasen kodierenden Genen *ompT* und *lon* aus. Eine Zugabe von Proteaseinhibitoren während der Präparation der rekombinanten Proteine war somit nicht notwendig.

Zur Herstellung von rekombinanter katalytischer Untereinheit (C-Untereinheit) mit N-terminaler Myristylierung wurde der Vektor pBB131, der die Protein N-Myristyltransferase (NMT) aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) kodiert, mit dem pT7-7-Vektor, der das zu myristylierende Protein kodiert, in BL21(DE3) cotransformiert.

Durch die gemeinsame Expression der C-Untereinheit und der Protein N-Myristyltransferase (NMT) aus Hefe sollte eine cotranslationale Myristylierung der C-Untereinheit herbeigeführt werden [Duronio *et al.* 1990; Yonemoto *et al.* 1993].

Die Proteinexpressionen fanden in 1 Liter-Kolben im Schüttelinkubator statt. Die Hauptkulturen wurden mit 5 - 10 ml einer Vorkultur mit einer OD<sub>660</sub> von 0,5 - 1 angeimpft. Die Bakterien wuchsen in LB-Medium, dem Antibiotika (*Material und Methoden* 2.3) zur Stabilisierung der Plasmide zugesetzt waren, unter Schütteln bei 37 °C heran. Nach dem Erreichen einer OD<sub>660</sub> von 0,2 - 0,4 wurde die Temperaturvorgabe von 37 °C auf 24 °C abgesenkt. Die Expression der rekombinanten Proteine sollte bei einer Temperatur von 24 °C durchgeführt werden, da sich bei höheren Expressionstemperaturen ein größerer Teil der

exprimierten Proteine als unlöslich erwies. Nach dem Erreichen der Expressionstemperatur wurde die Expression bei einer  $OD_{660}$  von 0,6 – 0,8 mit 0,4 mM IPTG induziert. Die Ernte der Bakterienzellen erfolgte in der Regel nach 12 Stunden durch eine 30minütige Zentrifugation bei 4 °C.

IPTG-Stocklösung:                    0,1     M                    IPTG, sterilfiltriert, bei -20 °C gelagert

## 4.2 Präparation rekombinanter Proteine

### 4.2.1 Bakterienzell-Aufschluß

Das Bakterienzellsediment von 1 Liter-Kultur wurde in 15 ml Lysepuffer aufgenommen. Für den Aufschluß wurde das Zellmaterial 5mal 45 Sekunden mit Ultraschall (Branson Sonifier 250, Einstellungen: output controll: 4 - 7; duty cycle: 40 %) behandelt. Um einer zu starken Erwärmung der Probe entgegenzuwirken, wurde diese zwischen den Beschallungsphasen auf Eis gekühlt.

Die Zelltrümmer wurden durch Ultrazentrifugation (Beckmann L8-55 Ultrazentrifuge; Rotor: TI45) bei ca. 25000 rpm für 45 Minuten bei 4 °C entfernt.

Lysepuffer:                    50     mM                    Kaliumchlorid  
    1     mM                    EDTA  
    30     mM                    MES, pH 6,5  
    1     mM                    DTT (frisch zugegeben)

### 4.2.2 Aufreinigung der C-Untereinheit der PKA über PKI (5-24)-Affinitätschromatographie

#### Herstellung von PKI (5-24)-Affinitätssäulenmaterial

Die Aufreinigung der C-Untereinheit der PKA erfolgte über Affinitätschromatographie. Dazu wurde ein Affinitätssäulenmaterial benötigt, das ein synthetisches Fragment des physiologischen Inhibitors der PKA (Aminosäurereste 5 bis 24) gebunden hatte. Als Matrix wurde ein quervernetztes Agarosegel (Affi-Gel, Biorad, München) genommen, an das Moleküle mit freien primären Aminogruppen, wie das PKI-Peptid, schnell und effizient gebunden werden können. Die Bindung erfolgte an den mit N-Hydroxysuccinimid aktivierten Carboxylgruppen (Aktivester) eines neutralen Spacer am Agarosematerial. Die Ausbildung der Amidbindung zwischen Affi-Gel und PKI-Peptid lief wie folgt ab:

- Waschen von 25 ml Affi-Gel 10 in Wasser bzw. anschließend in 50 mM HEPES-Puffer (pH 6,5)
- Lösen von ca. 20 mg PKI-Peptid (5-24) in ca. 20 ml 50 mM HEPES-Puffer (pH 6.5)
- Inkubation des Affi-Gels mit der PKI(5-24)-Lösung für 4 Stunden bei 4 °C auf einem Rotationsschüttler (Kopplung)
- Entfernen des PKI-Peptid-haltigen Überstandes nach Zentrifugation (2000 xg)
- Inkubation des Affi-Gels mit 2,5 ml Ethanolamin (pH 8) für 1 Stunde bei RT auf einem Rotationsschüttler (Blockieren verbliebener Aktivester)
- Entfernen der Ethanolamin-Lösung
- Waschen des PKI(5-24)-Affi-Gels mit TNM 50-Puffer (s. PKI (5-24)-Affinitätschromatographie) zur Entfernung des nicht gebundenen PKI-Peptids

Die Effizienz der Kopplung konnte durch die photometrische Bestimmung des Proteingehalts an PKI-Peptid im Überstand vor und nach der Kopplung überprüft werden.

Das PKI(5-24)-Affi-Gel wurde in TNM 50-Puffer bei 4 °C gelagert.

### PKI (5-24)-Affinitätschromatographie

Zur Aufreinigung der C-Untereinheit der PKA aus Bakterienlysat wurde eine Affinitätschromatographie durchgeführt [Olsen und Uhler 1989]. Die C-Untereinheit ging dabei eine Bindung mit dem immobilisierten, synthetischen Fragment des physiologischen Inhibitors der PKA, PKI (5 - 24), ein. Da die Bindung der C-Untereinheit an PKI von ATP und Magnesium abhängig ist, mußte beides bei Bindungs- und Waschschritten zugegeben werden. Die Elution erfolgte bei Verwendung eines Puffers mit hoher Argininkonzentration durch kompetitive Verdrängung der Argininreste des an das Affinitätssäulenmaterial gebundene PKI (5-24)-Peptids in der Erkennungssequenz der C-Untereinheit durch freies Arginin.

Das aufgereinigte Enzym war durch diese Prozedur weitgehend frei von Verunreinigungen.

Durchführung:

- Equilibrieren des PKI (5-24)-Affi-Gels mit TNM 50-Puffer (Verwendung von 5 ml PKI (5-24)-Affi-Gels pro Liter Expressionskultur)
- Zugabe von 2 mM ATP und 3 mM MgCl<sub>2</sub> zum Bakterienlysat-Überstand nach Ultrazentrifugation (s. *Material und Methoden* 4.2.1)
- Bindung der C-Untereinheit an das PKI (5-24)-Affi-Gel im Batch-Verfahren: Inkubation des PKI (5-24)-Affi-Gels mit dem Bakterienlysat-Überstand für 45 Minuten bei RT im Rotationsschüttler
- Packen des Batchansatzes in eine leere BioRad-Säule (max. 10 ml PKI (5-24)-Affi-Gel pro Säule)
- Waschen des Säulenmaterials mit 4 Säulenvolumen TMN 50-Puffer mit 400 µM ATP
- Waschen des Säulenmaterials mit 6 Säulenvolumen TMN 250-Puffer mit 400 µM ATP
- Elution des PKI (5-24)-gebundenen Proteins mit 5 Säulenvolumen Elutionspuffer

<u>TMN 50-Puffer:</u>	50	mM	Natriumchlorid
	2	mM	Magnesiumchlorid
	20	mM	Tris, pH 7,4
<u>TMN 250-Puffer:</u>	250	mM	Natriumchlorid
	2	mM	Magnesiumchlorid
	20	mM	Tris, pH 7,4
<u>Elutionspuffer:</u>	200	mM	Arginin
	50	mM	Natriumchlorid
	1	mM	EDTA
	20	mM	Tris, pH 7,4

### 4.2.3 Aufreinigung der GST-Fusionsproteine über Glutathion-Affinitätschromatographie

Glutathion-S-Transferase (GST) und GST-Fusionsproteine lassen sich über eine Affinitätschromatographie mit Glutathion aus Bakterienlysat aufreinigen. Dabei bindet das GST an das an Sepharose 4B-gekoppelte Glutathion, was nicht als Substrat umgesetzt werden kann, da das für die Umsetzung notwendige zweite Substrat fehlt. Die Elution erfolgte durch Zugabe einer hohen Konzentration reduzierten Glutathions.

Durchführung:

- Aufschluß der Bakterienzellen mit Ultraschall (s. *Material und Methoden* 4.2.1)
- Inkubation des Bakterienlysats mit 1 % Triton X-100 für 30 Minuten bei RT (Erhöhung der Löslichkeit der Proteine)
- Ultrazentrifugation des Lysats (s. *Material und Methoden* 4.2.1)

- Equilibrieren der Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia Biotech, Freiburg) mit 5 - 10 Säulenvolumen PBS (Bindungskapazität der Glutathion-Sepharose 4B: 5 mg Protein/ml)
- Inkubation der Glutathion-Sepharose 4B mit der löslichen Fraktion des Bakterienlysats im Batch-Verfahren für 30 Minuten bei 4 °C
- Packen des Batchansatzes in eine leere BioRad-Säule
- Waschen des Säulenmaterials mit 5 - 10 Säulenvolumen PBS
- Elution der Glutathion-S-Transferase bzw. des GST-Fusionsproteins mit 5 Säulenvolumen Glutathion-Elutionspuffer

Glutathion-Elutionspuffer:

10	mM	Glutathion, reduziert
50	mM	Tris, pH 8

#### 4.2.4 Nachreinigung der C-Untereinheit der PKA durch Mono-S-Ionenaustauscher-Chromatographie

Ein weiterer Reinigungsschritt, eine Ionenaustauscherchromatographie, der über die PKI (5-24)-Affinitätschromatographie aufgereinigten C-Untereinheit der PKA war notwendig, um diese von noch vorhandenen Verunreinigungen zu befreien [Herberg *et al.* 1993]. Außerdem war es möglich, die als ein Gemisch verschiedener Phosphorylierungsstufen vorliegende nicht myristylierte C-Untereinheit in ihre Phosphorylierungsstufen zu trennen.

Bei der Ionenaustauscherchromatographie erfolgt die Trennung über die reversible Adsorption geladener Moleküle an eine Säulenmatrix entgegengesetzter Ladung. Die Aufreinigung der C-Untereinheit lief über einen starken Kationenaustauscher ab, der durch seine negativen Gruppen die positiv geladenen Gruppen der Proteine binden kann. Durch Erhöhung der Ionenstärke des Laufpuffers können die Wechselwirkungen des Proteins mit der Säulenmatrix wieder aufgehoben werden.

Zur Reinigung der C-Untereinheit wurde eine Mono-S-FPLC-Säule HR5/5 der Firma Pharmacia Biotech (Freiburg), die an einer Pharmacia Biosystems FPLC-Anlage (Gradient Programmer GP-250, Pump P500, Single Path Monitor UV-1; Fraction Collector Frac-100) angeschlossen war, mit einem Bis-Tris-Propan-Puffersystem benutzt. Zur Elution wurde ein Gradient mit steigender Lithiumchlorid-Konzentration verwendet. Es wurde in der Regel eine Flußrate von 0,5 ml/min angelegt.

Pro Lauf konnten bis zu 3 mg Protein aufgetragen werden.

Elutionspuffer A:

20	mM	Bis-Tris-Propan, pH 8,5
----	----	-------------------------

Elutionspuffer B:

20	mM	Bis-Tris-Propan, pH 8,5
1	M	Lithiumchlorid

Elutionsgradienten:

0	ml	0	% Elutionspuffer B
12	ml	17	% Elutionspuffer B
23	ml	20	% Elutionspuffer B
26	ml	100	% Elutionspuffer B
50	ml	100	% Elutionspuffer B

### 4.3 Konzentrieren und Umpuffern von Proteinen

Protein-Lösungen wurden je nach Lösungsvolumen entweder über Centriprep 30-Konzentratoren (Füllvolumen: 15 ml, minimales Endvolumen: 0.5 ml, Ausschlußgröße: 30 kDa, Millipore, USA) oder Centricon 30-Konzentratoren (Füllvolumen: 2 ml, minimales Endvolumen: 0,035 ml, Ausschlußgröße: 30 kDa, Millipore, USA) in einer Zentrifuge bei 2500 rpm bzw. 5000 rpm bei 4 °C einkonzentriert. Überstieg das Volumen der einzukonzentrierenden Lösung das Füllvolumen, wurde der Konzentrador wiederholt befüllt. Zum Umpuffern wurde die Proteinlösung zunächst einkonzentriert, um dann in dem anderen Puffer aufgenommen zu werden. Zur vollständigen Umpufferung wurde der Vorgang 3 - 4mal wiederholt.

### 4.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration einer Lösung wurde nach der Methode von Bradford [Bradford 1976] ermittelt. Bei dieser Bestimmung bindet der Farbstoff Coomassie G über hydrophobe und anionische Wechselwirkungen an Proteine, wodurch sich dessen Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm verschiebt. Gemessen wird die Absorption bei 595 nm, die der Proteinkonzentration der Lösung direkt proportional ist. Anhand einer für BSA aufgenommenen Eichkurve konnten den gemessenen Absorptionswerten Proteinkonzentrationen zugeordnet werden.

Die Proteinbestimmung wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Da maximal ein Proteingehalt von 8 µg / Ansatz gemessen werden konnte, wurden die Proben entsprechend verdünnt und dann mit Bidest auf ein Volumen von 160 µl gebracht. 40 µl Bradford-Reagenz wurde zugegeben und gemischt. Nach zwei Minuten konnte die Absorption bei 595 nm gegen eine proteinfreie Kontrolle (160 µl Puffer + 40 µl Bradford-Reagenz) in einem Autoreader (EL310, BioTek Instruments, USA) gemessen werden.

Es wurden Dreifachbestimmungen gemacht.

<u>Bradford-Reagenz:</u>	55	% (w/v)	Phosphorsäure
	15	% (w/v)	Methanol
	250	mg	Coomassie G
	mit Bidest auf 500 ml auffüllen		

### 4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt werden [Laemmli 1970]. Die Proteine werden mit Natriumdodecylsulfat (SDS) versetzt, um so nicht-kovalente Bindungen in diesen Wechselwirkungen aufzuheben. Das SDS geht mit den entfalteten Proteinen hydrophobe Wechselwirkungen ein, wodurch diese eine negative Nettoladung bekommen, die ihrem Molekulargewicht proportional ist. Um Disulfidbrücken zu lösen, die mit SDS nicht aufgehoben werden, wird den Proteinen DTT zugegeben.

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese handelt es sich um eine diskontinuierliche Elektrophorese, d.h., die Proteine werden zunächst im Sammelgel konzentriert und dann erst im Trenngel, das sich durch eine kleinere Porengröße und einen höheren pH-Wert vom Sammelgel unterscheidet, nach ihrer Größe getrennt.

Die Proben wurden in unterschiedlichen Konzentrationen in Probenpuffer gelöst, in der Regel bei 95 °C für einige Minuten denaturiert und in die Probenaschen der Gele pipettiert. Die Trennung erfolgte bei Minigelen (BioRad-System) bei 200 V und 120 mA.

<u>12 % iges Trenngel (10 ml):</u>	0,8	ml	Wasser
	4	ml	30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid
	5	ml	0,75 M Tris, pH 8,8
	0,1	ml	10% SDS
	0,1	ml	10 % APS
	4	µl	Temed
<u>5 % iges Sammelgel (10 ml):</u>	6,14	ml	Wasser
	1,7	ml	30 % Acrylamid / 0,8 % Bisacrylamid
	2	ml	0,625 M Tris, pH 6,8
	0,1	ml	10% SDS
	0,1	ml	10 % APS
	10	µl	Temed
<u>1x Tris-Glycin-Puffer:</u>	25	mM	Tris
	0,1	%(w/v)	SDS
	250	mM	Glycin
<u>5x Probenpuffer (10 ml):</u>	250	mM	Tris-Glycin-Puffer, pH 6,8
	60	%(w/v)	Glycerin
	20	%(w/v)	SDS
	0,2	%(w/v)	Bromphenolblau
	200	mM	DTT

Der Probenpuffer wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Nach der Elektrophorese wurden die im Gel aufgetrennten Proteine entweder über Coomassie-Blau-Färbung fixiert und detektiert (s. *Material und Methoden* 4.5) oder auf eine Membran transferiert (Western Blotting) (s. *Material und Methoden* 4.6).

#### Nachweis der Proteine im Gel

Die Gele wurden für 10 - 30 Minuten in der Coomassie-Färbe-Lösung auf einer Rockerplatte inkubiert und anschließend so lange in Entfärber gewaschen, bis der Hintergrund Coomassie-frei war.

<u>Coomassie-Färbe-Lösung:</u>	0,2	%(w/v)	Coomassie Brilliant Blue R 250
	40	%(v/v)	2-Propanol
	10	%(v/v)	Essigsäure
<u>Entfärber:</u>	7	%(v/v)	2-Propanol
	7	%(v/v)	Essigsäure

Die Gele konnten durch Trocknen auf Filterpapier in einem Geltrockner (Model 583, BioRad) konserviert werden. Dokumentiert wurden die Gele durch Fotografieren oder Scannen.

#### 4.6 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membranen (Western Blot)

Der Transfer von Proteinen aus einer Gelmatrix auf eine Blot-Membran macht den immunologischen Nachweis der zuvor elektrophoretisch getrennten Proteine möglich. In dieser Arbeit wurde der Proteintransfer mit einem Semi-Dry-System durchgeführt, bei dem die Proteine in einem zwischen zwei Graphitplatten angelegten elektrischen Feld wandern und so auf die Membran transferiert werden.

Für den Transfer wurden eine PVDF-Membran (Polyvinylidendifluorid-Membran Immobilon-P, Millipore, Eschborn) und 10 Blottingpapiere (Whatman 3 MM, Maldstone, Großbritannien) in Gelgröße benötigt. Die Membran wurde mit 2-Propanol benetzt und anschließend mit

Wasser gespült. Sechs der Filterpapiere wurden in Transfer-Puffer getränkt, die restlichen vier in 1:10 verdünntem Puffer.

Danach wurden in folgender Reihenfolge auf die Anodenplatte gelegt:

- drei Blottingpapiere mit Transfer-Puffer
- zwei Blottingpapiere mit 1:10 verdünntem Transfer-Puffer
- PVDF-Membran
- SDS-Gel
- zwei Blottingpapiere mit 1:10 verdünntem Transfer-Puffer
- drei Blottingpapiere mit Transfer-Puffer, Kathodenplatte.

Der Protein-Transfer wurde bei 200 mA für 1,5 - 2 Stunden durchgeführt.

<u>Transfer-Puffer:</u>	250	mM	Tris, pH 10,4
	20	% (v/v)	2-Propanol
<u>TBS-Puffer/0,05 % Tween 20:</u>	150	mM	Natriumchlorid
	50	mM	Tris, pH 7,4
	0,05	%(v/v)	Tween 20

Um den erfolgten Protein-Transfer zu überprüfen, wurden die geblotteten Proteine für eine Minute mit Amidoschwarz gefärbt und die Membran anschließend fotografiert. Entfärben ließ sich der Blot durch Bidest.

<u>Amidoschwarz-Färbelösung:</u>	0,01	% (w/v)	Amidoschwarz
	40	% (v/v)	Methanol
	10	% (v/v)	Essigsäure

Um freie Bindungsstellen auf der Blotmembran abzusättigen, wurde die Membran eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit 2 % (w/v) BSA / TBS-Puffer / Tween 20 inkubiert. Anschließend wurde diese mit dem gegen das gesuchte Protein gerichteten Antikörper oder Antiserum in einer geeigneten Verdünnung in 2 % (w/v) BSA / TBS-Puffer / Tween 20 für 30 - 60 Minuten bei RT inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde durch Waschen in TBS-Puffer/Tween 20 für 3mal 10 Minuten entfernt. Mit Peroxidase-gekoppelter Antikörper, der den Primärkörper erkennen sollte, wurde die Membran weitere 30 - 60 Minuten bei RT inkubiert und danach wie zuvor gewaschen.

Die Detektion erfolgte mit dem ECL-Chemiluminiszenz-Nachweissystem (Amersham, Braunschweig). Dazu wird die Blot-Membran für eine Minute in einer Luminol, Wasserstoffperoxid und Verstärkern (Phenolen) enthaltenden Reaktionslösung inkubiert, wobei die Peroxidase des Sekundärantikörpers das Luminol oxidiert. Dieses wird dadurch in einen angeregten Zustand überführt, der unter Lichtemission wieder in den Grundzustand übergehen kann. Das emittierte Licht (Maximum: 428 nm) konnte durch kurzes Auflegen eines Röntgenfilmes (Kodak-X-Omat AR, Kodak, USA) detektiert werden. Die belichteten Röntgenfilme wurden von einer Entwicklermaschine (Amersham, Braunschweig) entwickelt.

#### 4.7 Isoelektrische Fokussierung

Für die isoelektrische Fokussierung (IEF) werden Acrylamidgele verwendet, in denen durch Vorfokussierung des darin enthaltenen Gemisch von Trägerampholyten ein stabiler pH-Gradient erzeugt wird (niedriger pH an der Anode, hoher pH an der Kathode).

Ein Protein, das diesem System zugesetzt wird, bewegt sich im elektrischen Feld zu der Stelle im pH-Gradienten, an der seine Nettoladung Null ist (isoelektrischer Punkt).

In dieser Arbeit wurden Ampholine PAGplate-Flachgele der Firma Pharmacia verwendet. Mittels der isoelektrischen Fokussierung konnte die C-Untereinheit hinsichtlich ihrer co- und posttranslationalen Modifikationen wie Phosphorylierungsgrad, Deamidierung und Myristylierung untersucht werden.

- Vorkühlen der Trägerplatte der Fokussierapparatur (Multiphor II, Pharmacia LKB) auf 10°C
- Auflegen des Gels auf die zuvor mit Kerosin benetzte Trägerplatte (Vermeidung von Kriechströmen)
- Auflegen der mit 1 M Phosphorsäure (Anode) bzw. 1 M Natronlauge (Kathode) getränkten Elektrodenstreifen auf das Gel
- Vorfokussierung für ca. 30 Minuten, bis 500 V erreicht sind
- Auftragen der zur Reduzierung der Ionenstärke in Wasser verdünnten Proben neben dem Anodenstreifen (Proteinmenge/Spur: ca. 2 µg)
- Fokussierung bis 1000 V erreicht sind, dann für 2 Stunden bei 1500 V
- Anfärben der fokussierten Proteine mit Coomassie (s. *Material und Methoden* 4.5)

#### 4.8 Gelfiltration

Durch die Gelfiltration können Moleküle nach ihrer Größe getrennt werden [Lindqvist und Storgards 1955]. Die Trennung beruht auf der unterschiedlichen Verteilung von Molekülen zwischen einer Gelfiltrationsmatrix und dem umgebenden Medium. Die stationäre Phase besteht aus Beads eines gelartigen, hydratisierten Materials mit relativ konstanter Porengröße. Gibt man ein Gemisch von Molekülen unterschiedlichen Molekulargewichts auf eine Gelfiltrationssäule auf, so werden Moleküle mit einem Molekulargewicht, das die Porengröße überschreitet, vom Lösungsvolumen in den Gel-Beads ausgeschlossen. Sie wandern deshalb schneller, d.h. mit geringerem Elutionsvolumen bzw. geringerer Retentionszeit, durch die Säule als kleinere Moleküle, die in die Poren eindringen können und zurückgehalten werden. Sie werden mit abnehmender Molekülgröße (Stoke'scher Radius) vom Gel eluiert.

Da das Laufverhalten bei der Gelfiltration wie das Diffusionsverhalten von der Molekülgröße, der Molekülform und dem Grad der Wasserlöslichkeit abhängig ist, kann die Gelfiltration als Hilfsmittel zur Veranschaulichung des Diffusionsverhalten benutzt werden. Die Gelfiltration wurde in dieser Arbeit zum Vergleich des Diffusionsverhaltens von Proteinen eingesetzt. Grundsätzlich gilt, daß sich die mittleren thermische Molekulargeschwindigkeiten zweier Moleküle bei gleicher Temperatur umgekehrt wie die Wurzel aus den relativen Molekulargewichten verhalten:

$$\frac{v_x}{v_y} = \sqrt{\frac{Mr_y}{Mr_x}}$$

mit  $v_x$ : Molekulargeschwindigkeit des Moleküls x,  $v_y$ : Molekulargeschwindigkeit des Moleküls y,  $Mr_x$ : relatives Molekulargewicht des Moleküls x und  $Mr_y$ : relatives Molekulargewicht des Moleküls y.

Es wurde eine Superose 12 HR10/30 Säule der Firma Pharmacia (Freiburg) verwendet. Dabei handelt es sich um eine stark quervernetzte Agarose mit einem Bead-Durchmesser von 8-12 µm und einem Trennbereich 1 - 300 kDa.

Um das Ausschlußvolumen der Säule zu bestimmen, wurde Dextran-Blau auf die Säule gegeben. Aufgrund seiner Größe (2000 kDa) wird es von den kleinen Poren der stationären Phase ausgeschlossen.

Als Equilibrierungs- und Laufpuffer wurde PBS, pH 7,2 verwendet. Die Flußrate betrug 0,15 ml/min. Die Proteine wurden in einem kleinen Volumen auf gegeben. Das Elutionsvolumen der Proteine konnte anhand des Schreiber ausdrucks ermittelt werden.

#### 4.9 Bestimmung der Kinase-Aktivität

##### Kinase-Assay

Der Kinase-Assay im Blättchentest [Glass *et al.* 1978] dient dem Aktivitätsnachweis der C-Untereinheit. Bei diesem *in vitro*-Assay wird die Übertragung des  $^{32}\text{P}$  von  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  durch die C-Untereinheit auf Kemptid, ein Peptid-Substrat der PKA, gemessen. Hierzu wurde das Enzym für 2 Minuten mit Substrat, Magnesium-ATP und  $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$  inkubiert. Der Einbau von heißem  $^{32}\text{P}$  wird durch kaltes ATP gestoppt. Ein Aliquot des Reaktionsansatzes wurde auf P81-Phosphozellulose (Whatman, USA), die das phosphorylierte Substrat bindet, pipettiert und in Essigsäure gewaschen. Die Menge an radioaktivem Phosphosubstrat wurde durch Flüssigkeits-Szintillationszählung bestimmt. Die Messung beruht darauf, daß die vom radioaktiven Phosphat ausgehende Beta-Strahlung Elektronen der Moleküle der Szintillationsflüssigkeit anregt. Diese strahlen beim Rückfall auf ihr ursprüngliches Energieniveau Lichtquanten ab, was vom Szintillationszähler (Liquid Szintillation Counter 1212 Rackbeta, LKB Wallac) gemessen werden kann.

Durch eine vergleichende Messung einer Eichlösung, 1  $\mu\text{l}$  der im Assay eingesetzten ATP-Lösung, konnte die Menge an übertragenem Phosphat errechnet werden. Zur Ermittlung des Hintergrunds wurde je Meßreihe ein Kontrollansatz ohne Enzym für jede der eingesetzten Substratkonzentrationen ermittelt. Es wurden Dreifachbestimmungen gemacht.

<u>Reaktionsansatz (100 <math>\mu\text{l}</math>):</u>	50	$\mu\text{l}$	2x Kinase-Assay-Puffer
	50	$\mu\text{M}$	Kemptid
	20	ng	Enzym
	100	$\mu\text{M}$	ATP / $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (2 $\mu\text{Ci}$ )
	x	$\mu\text{l}$	Freivolumen (Bidest bzw. Inhibitor-Lösung)

<u>2x Kinase-Assay-Puffer:</u>	20	mM	Magnesium-Acetat
	100	mM	MOPS, pH 6,8
			aliquotiert, bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert

##### Durchführung:

- Inkubation der Ansätze für genau 5 Minuten bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  im Heizblock
- Start der Reaktion durch Zugabe von  $10\text{ }\mu\text{l}$   $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ -Lösung
- Inkubation für 2 Minuten bei  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$
- Abstoppen des Einbaus von  $^{32}\text{P}$  durch Zugabe von kaltem ATP (1 M, pH 6,8)
- Pipettieren von  $80\text{ }\mu\text{l}$  der Reaktionsansätze auf nummerierte, mit Nadeln auf eine Styroporplatte gesteckte P81-Blättchen ( $2 \cdot 2\text{ cm}$ )
- Trocknen der Blättchen für ca. 20 Minuten
- Waschen der Blättchen in 30 % iger Essigsäure in einem Weithalslerlenmeyerkolben ( $3 \times 5\text{ Minuten}$ )
- Einführen der Blättchen in 5 ml-Szintillationsröhrchen und Zugabe von 4 ml Szintillationsflüssigkeit (Aquasafe 500)
- Messen der Proben im Szintillationszähler

## Resonant Mirror Affinographie

Resonant Mirror Affinography wurde mit Hilfe eines automatisierten IAsys Auto<sup>+</sup> (Affinity Sensors, Großbritannien) durchgeführt. Es handelt sich bei dem optischen Biosensor um ein gerührtes Küvettenystem, bei dem im Küvettenboden ein Laser-Wellenleiter integriert ist, die Resonant Mirror Optik. Diese bildet mit verschiedenen derivatisierten Matrices die Sensoroberfläche, an der die biomolekularen Interaktionen mittels Resonant Mirror Affinography analysiert wird.

Gemessen werden die Interaktionen zwischen immobilisiertem Liganden und einem Analyten in der mobilen Phase. Die Geschwindigkeitskonstanten für Assoziation ( $k_{\text{ass}}$ ) und Dissoziation ( $k_{\text{diss}}$ ) können getrennt bestimmt und mit bekannten Analyt-Konzentrationen apparente Dissoziations-Gleichgewichtskonstanten ( $K_D$ ) berechnet werden.

Eine Änderung der Konzentration des Liganden-gebundenen Analyten auf der Sensor-Oberfläche führt zu einer Veränderung des Brechungsindex der Sensorschicht, die sich proportional zu der Resonanz-Laserposition ändert und in Echtzeit detektiert werden kann. Die Veränderung des Resonanz-Winkels wird in Winkelsekunden angegeben und gegen die Zeit aufgetragen.

In dieser Arbeit wurde das PKI-Peptid (5-24) als Ligand und die C-Untereinheit als mobiler Analyt zur Bestimmung kinetischer Konstanten der C-Untereinheit eingesetzt.

Das PKI-Peptid wurde gemäß des Standardprotokolls für Immobilisierungen über eine EDC/NHS-Kopplungschemie kovalent an die CMD-Matrix der gerührten Küvette gebunden (Affinity Sensors, 199x). Eine einheitliche Immobilisierung war dadurch gewährleistet, daß das PKI-Peptid nur ein primäres Amin hat, über das die Kopplung ablaufen kann. Die Bindungskurven wurden in PBS/T in Gegenwart von Magnesium (15 mM) und ATP (200  $\mu$ M) in einem Proteinkonzentrationsbereich aufgenommen, dessen untere Grenze bei einem Zehntel des erwarteten  $K_D$  lag und dessen obere Grenze bei  $10 \cdot K_D$  lag (0,5 nM - 200 nM). Aus den erhaltenen Affinogrammen wurden die Dissoziations-Gleichgewichtskonstanten mit der FASTfit-Software von Affinity Sensors wie folgt berechnet, wobei die kinetische und die thermodynamische Auswertung zu den gleichen Werten für  $K_D$  führen sollten:

### Kinetische Auswertung:

- Messung von  $k_{\text{on}}$  bei verschiedenen Analyt-Konzentrationen [A]
- Auftragen von  $k_{\text{on}}$  gegen [A]
- Fitting:

$$k_{\text{on}} = k_{\text{ass}} \cdot [A] + k_{\text{diss}} \quad (1)$$

- Berechnen von  $K_{D(\text{kin})}$  aus  $k_{\text{ass}}$  und  $k_{\text{diss}}$ , die dem Fit (1) entnommen werden können:

$$K_{D(\text{kin})} = \frac{k_{\text{ass}}}{k_{\text{diss}}} \quad (2)$$

### Thermodynamische Auswertung:

- Messung des Bindungssignals ( $R_{\text{eq}}$ ) im Gleichgewicht der Bindungsreaktion bei verschiedenen Analyt-Konzentrationen [A]
- Auftragen von  $R_{\text{eq}}$  gegen [A]
- Fitting:

$$R_{\text{eq}} = R_{\text{max}} \cdot \left[ \frac{[A]}{K_{D(\text{therm})} + [A]} \right] \quad (3)$$

- Berechnen von  $K_{D(\text{therm})}$  aus (3)

mit  $K_D$ : Dissoziationskonstante [Mol/l];  $[A]$ : Analyt-Konzentration;  $k_{diss}$ : Dissoziations-Geschwindigkeitskonstante;  $k_{ass}$ : Assoziations-Geschwindigkeitskonstante;  $R_{eq}$ : Bindungssignal im Gleichgewicht der Bindungsreaktion;  $R_{max}$ : maximales Bindungssignal, das gemessen wurde.

<u>PBS/T:</u>	2,7	mM	Kaliumchlorid
	137	mM	Natriumchlorid
	0,05	% (v/v)	Tween 20
	1	mM	DTT
	10	mM	Phosphat-Puffer, pH 7,4

Die Messungen am IAsys Auto<sup>+</sup> wurden im Zusammenarbeit mit Herrn T. Schneider (Abteilung Pathochemie, DKFZ, Heidelberg) durchgeführt.

#### 4.10 Konjugation von Fluoreszenzfarbstoffen an Proteine

Um mikroinjizierte Proteine direkt in den injizierten Zellen detektieren zu können, wurden die zu injizierenden Proteine mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und so im Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. In dieser Arbeit wurde der Farbstoff Cy3 (Amersham, Braunschweig), ein orange fluoreszierendes Indocarbocyanin (Absorptionsmaximum 550 nm, Extinktionsmaximum 570 nm), das mit Rhodaminfiltern betrachtet werden kann, verwendet.

Der Cy3-Farbstoff liegt als monofunktioneller NHS-Ester vor, der mit jeweils einer freien Aminogruppe des Proteinmoleküls reagieren kann. Für die Kopplung wurde eine Stöchiometrie von 1 zwischen Farbstoff und Protein angestrebt.

Bei der Kopplungsreaktion wurde ATP und Magnesiumchlorid zugegeben, um eine Inaktivierung der Kinase-Aktivität durch eine Farbstoffmarkierung des Lysin 72 zu verhindern.

<u>Kopplungsansatz (1 ml)</u>	1	mg	Protein
	8	mM	ATP
	14	mM	Magnesiumchlorid
	0,1	M	Natriumcarbonat, pH 8,5
	1	Pack	Cy3

mit Mikroinjektionspuffer bis 1 ml auffüllen

Die Kopplung wurde für 30 Minuten bei RT durchgeführt und dann durch Zugabe von 5 mM Glycin terminiert. Nicht gebundene Farbstoffmoleküle wurden durch Aufgabe des Reaktionsansatzes auf eine Gelfiltrationssäule (DG 10-Säule, Pharmacia, Freiburg), die zuvor mit Mikroinjektionspuffer equilibriert worden war, entfernt. Das fluoreszenzmarkierte Protein wurde mit ca. 4 ml Mikroinjektionspuffer eluiert und über Centricon-Konzentratoren (s. *Material und Methoden* 4.3) einkonzentriert.

Um das Farbstoff/Protein-Verhältnis (D/P) zu bestimmen, wurde die Absorption des Protein bei 280 nm ( $A_{280}$ ) und die Absorption des gebundenen Cy3 bei 552 nm ( $A_{552}$ ) gemessen. Die fluoreszenzmarkierte Probe sollte so verdünnt werden, daß die gemessene Absorption in einem Bereich zwischen 0,5 und 1 liegt. Aus den bestimmten Absorptionen ließen sich unter Kenntnis der molaren Extinktionskoeffizienten von Protein ( $\epsilon_P$  für PKA C $\alpha$ : 52195 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) und Farbstoff ( $\epsilon_D$  für Cy3: 150000 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>) die vorliegenden Konzentrationen sowie das Farbstoff/Protein-Verhältnis (D/P) wie folgt bestimmen:

$$\text{Farbstoff-Konzentration:} \quad [\text{Cy3}] = \frac{(A_{552})}{\epsilon_D}$$

$$\text{Protein-Konzentration:} \quad [\text{Protein}] = \frac{A_{280} - (0,08 \cdot A_{552})}{\epsilon_P}$$

$$\text{Farbstoff/Protein-Verhältnis:} \quad \frac{D}{P} = \frac{[\text{Farbstoff}]}{[\text{Protein}]}$$

Die Berechnung wurde um die Absorption des Farbstoffs bei 280 nm korrigiert, die ca. 8 % der Absorption bei 552 nm entspricht.

#### 4.11 Massenspektrometrische Untersuchungen

Die massenspektrometrischen Messungen wurden mit nanoESI von Herrn Prof. Dr. W.D. Lehmann und Herrn A. Schlosser (Abteilung Zentrale Spektroskopie, DKFZ, Heidelberg) an einem Triple-Quadrupol (TSQ 700, Thermoquest) durchgeführt. Die Proben wurden zuvor mit C18 Zip Tips (Millipore, USA) entsalzt.

## 5 Mikroinjektion von Proteinen in Zellkulturzellen

Die Mikroinjektion ist eine der effizientesten Methoden, um Makromoleküle in Zellen einzuführen. Die Mikroinjektion in adhärent wachsende Zellkulturzellen mit Kapillaren wurde von Graessmann [Graessmann *et al.* 1980] entwickelt. Die Methode macht es möglich, einzelne Zellen als Studienobjekt für komplexe zelluläre Vorgänge, Strukturen und Funktionen *in vivo* zu nutzen. Eine Reihe von Molekülen wie Proteine, Nukleinsäuren und Farbstoffe können injiziert werden.

Die Injektionslösung kann dabei direkt in Kern oder Cytoplasma appliziert werden. Für die Mikroinjektion werden feine Kapillaren verwendet, mit einem Spitzendurchmesser von unter 1 µm. Der Experimentator verfolgt den Injektionsvorgang an einem Mikroskop. Zur Injektion wird die zu injizierende Zelle von der Kapillarspitze penetriert. Die Probenlösung wird durch einen an der Kapillare angelegten Druck in die Zelle abgegeben. Normalerweise beträgt das Injektionsvolumen bei Cytoplasma-Injektionen 0,05 pl und bei Kern-Injektionen 0,02 pl, was etwa 5 bis 10 % des Zellvolumens gleichkommt. Das entspricht ungefähr einer Verdünnung der Probenkonzentration durch die Injektion um den Faktor 10 bis 20.

Die Limitation der Methode ist die Anzahl an Zellen, in die in einer bestimmten Zeit Probe injiziert werden kann.

### 5.1 Kultivierung und Handhabung der Zellen für die Mikroinjektionsexperimente

Alle Mikroinjektionsexperimente wurden an Vero-Zellen (ATCC CCL 81) durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine adhärent wachsende Zelllinie, die aus der Niere einer gesunden gelbgrünen afrikanischen Meerkatze (*Cercopithecus sabaeus*) etabliert wurde (Yasumura, 1963).

Die in dieser Arbeit verwendeten Vero-Zellen wurden von Herrn Dr. R. Pepperkok (ICRF, London, Großbritannien) bezogen.

Die Vero-Zellen wurden als Monolayer-Zellen in 25 cm<sup>2</sup>-Gewebekulturflaschen in Minimal Essential Medium (MEM), 5 % fetalem Kälberserum und Kanamycin (100 UG/ml) im Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % kultiviert.

Die Vero-Zellen wurden zweimal in der Woche passagiert. Die Passagierung lief wie folgt ab:

- Absaugen des Kulturmediums
- Inkubation der Zellen in 5 ml Trypsinlösung (0,06 % Trypsin, 0,02 % EDTA in PBS) für 2,5 Minuten bei 37 °C im Brutschrank
- Absaugen der Trypsinlösung
- Resuspension der nur noch locker an der Kulturschale anhaftenden Zellen in 10 ml Kulturmedium
- Entnahme eines Aliquots der Zellsuspension zur Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer
- Überführen von  $2 \cdot 10^5$  bis  $5 \cdot 10^5$  Zellen in neue Kulturflaschen

<u>PBS:</u>	137	mM	Natriumchlorid
	2,68	mM	Kaliumchlorid
	80,1	mM	Dinatriumhydrogencarbonat
	1,47	mM	Kaliumdihydrogencarbonat

Um eine konstante Qualität des Zellmaterials zu gewährleisten, wurde alle vier bis sechs Wochen ein frisches Aliquot der in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen aufgetaut.

Für die Mikroinjektion wurden die Zellen auf Deckgläschen aufgezogen. Die Zellen wurden mindestens 24 Stunden zuvor ausplattiert. Die Kultivierung fand in 58 cm<sup>2</sup>-Schalen (Falcon, beschichtet) mit bis zu 20 Glasdeckgläschen (rund, Durchmesser von 10 mm) statt. Eine 70 % ige Konfluenz der Zellen wurde angestrebt. Dazu wurden  $1,5 \cdot 10^6$  Zellen pro Schale angesetzt. Nach 24 Stunden war mit einer Zelldichte von  $3 \cdot 10^6$  Zellen pro Schale zu rechnen. Für die Mikroinjektion wurden die Deckgläschen in eine Petrischale transferiert, die Carbonat-freies Medium beinhaltete, da der CO<sub>2</sub>-Gehalt der Umgebungsluft zu niedrig ist, um den gewünschten pH-Wert zu halten. Aus diesem Grund wurde HEPES-gepuffertes Medium verwendet.

### Vorbereitung der Deckgläschen

Die Deckgläschen wurden mit Aceton und dest. Wasser gereinigt, um eventuelle Verunreinigungen zu entfernen. Nach dem Trocknen wurde mit einem Diamantschreiber ein Kreuz zentral in die Deckgläschen geritzt, welches als Orientierungshilfe während des experimentellen Ablaufes diente. Die Deckgläschen wurden autoklaviert.

## 5.2 Kapillaren

Als Injektionskapillaren wurden Fertiglaskapillaren, Femtotips I (Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg), verwendet. Sie haben eine Kunststofffassung zum Einschrauben in den Eppendorf-Kapillarhalter. Ihr Innendurchmesser beträgt 0,5 µm, ihr Außendurchmesser 1 µm. Sie zeichnen sich durch die hohe Reproduzierbarkeit ihrer Form und des Öffnungsdurchmessers aus.

Außerdem wurden selbst ausgezogene Glaskapillaren benutzt. Die verwendeten Rohkapillaren waren aus Borsilikatglas (GC120TF-10, Clark Electromedical Instruments, UK). Diese Kapillaren haben einen äußeren Durchmesser von 1,2 mm, einen Wanddurchmesser von 0,13 mm und ein dünnes Innenfilament (0,1 mm).

### Ziehen von Injektionskapillaren

Das Ausziehen der Rohkapillaren wurde mit Hilfe eines Sutter Instruments Puller (Modell P-87, USA) durchgeführt. Die Rohkapillaren werden in den Puller eingespannt, in dem sie an den Enden arretiert werden. Die Mitte der Rohkapillare ist von einem Heizfilament umgeben, durch das die Kapillare lokal angeschmolzen werden kann. Nach 10 bis 15 Sekunden werden die Kapillarenenden ruckartig auseinander gezogen, wodurch sich Form und Öffnung ergeben.

Die Kapillaren werden vorzugsweise kurz vor der Injektion gezogen, da sie direkt nach dem Ausziehen aufgrund der hohen Temperatur steril sind.

- Einspannen der Rohkapillare in die Halterungen des Pullers, wobei das Filament nicht berührt werden darf
- Auswählen eines Programmes (Druck: 370 hPa, Temperatur: 630, Zug: 170, Geschwindigkeit: 100, Zeit: 135)
- Auslösen des Pull-Vorganges

Durch Veränderung der Temperatureinstellung kann der Spitzendurchmesser verändert werden. Es gilt: Je höher die Temperatur, desto kleiner die Öffnung.

### 5.3 Injektionsproben

Zur Untersuchung der Lokalisation der C-Untereinheit der PKA wurde Cy3-markierte, myristylierte rekombinante C $\alpha$ -Untereinheit (rC $\alpha$ myr-Cy3) injiziert. Als Kontrolle für den aktiven Transport wurde mit FLOUS- bzw. Cy3-markiertes BSA-NLS verwendet [Cordes *et al.* 1997]. Diese fluoreszenzmarkierten BSA-Moleküle, an die mehrere NLS-Peptide gekoppelt waren, wurden von Herrn H.-R. Rackwitz (DKFZ, Heidelberg) und Herrn D. Görlich (ZMBH, Uni Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Als Diffusionskontrolle wurde Cy3-gekoppelter Trypsininhibitor aus Sojabohnen (STI-Cy3) (Sigma, Deisenhofen) und Maltosebindendes Protein (MBP-Cy3) (New England Biolabs, USA) eingesetzt. Kernausschluß wurde durch Injektion von Antikörpern mit Fluoreszenzmarkierung erreicht (Antikörper s. *Material und Methoden* 1.3).

### Probenvorbereitung

Für eine erfolgreiche Mikroinjektion ist die Probenvorbereitung von großer Bedeutung. Eine Injektion von Probe zu hoher Konzentrationen, von präzipitiertem oder aggregiertem Probenmaterial, toxischen Pufferkomponenten oder Puffer mit ungeeigneten Bedingungen (pH, osmotischer Druck) kann zu einer Schädigung oder Absterben der injizierten Zellen führen.

Die Pufferbedingungen mußten somit an Zellen und Probenmaterial gleichermaßen angepaßt werden. Die Probe und alle Zusätze wurden, wenn möglich, in Mikroinjektionspuffer verdünnt bzw. gelöst.

Die Konzentration der Probe in der Injektionslösung lag in der Regel bei 1 mg/ml, maximal bei 4 mg/ml.

<u>Mikroinjektionspuffer:</u>	2	mM	EDTA
	10	% (w/v)	Glyzerin
	1	mM	DTT
	25	mM	Kaliumphosphat, pH 6,8

Der Mikroinjektionspuffer wurde sterilfiltriert (0,2  $\mu$ m Porendurchmesser). DTT wurde immer frisch zugesetzt.

Um die C-Untereinheit der PKA von den regulatorischen Untereinheiten (R-Untereinheiten) dissoziiert untersuchen zu können, wurde der Injektionsprobe cAMP in einer Konzentration

von 5 mM zugesetzt. Die Konzentrationen aller weiteren coinjizierten Substanzen sind dem Ergebnisteil zu entnehmen.

### **Befüllen der Injektionskapillaren**

Um ein Verstopfen der Kapillare zu vermeiden, wurde die Injektionsprobe zuvor bei 14000 \* g für mindestens 10 Minuten bei 4 °C zentrifugiert. Die Injektionsprobe wurde mit Hilfe eines Microloaders (Eppendorf, Hamburg), einer sehr lang ausgezogenen Pipettenspitze, von hinten in die Kapillare appliziert. Das dünne innere Filament der Kapillare unterstützt den Transport der Probelösung durch die Kapillarkräfte in die Spitze der Kapillare. Typischerweise werden die Kapillaren mit einem Volumen von 0,2 bis 2 µl befüllt.

Die Kapillare sollte nach dem Beladen zügig in den Kapillarhalter des Mikroinjektors eingespannt und die Spitze in das Injektionsmedium in der Kulturschale auf dem Mikroskopisch, die die zu injizierenden Zellen enthält, eingetaucht werden, da die Gefahr besteht, daß die Probe in der Kapillarspitze eintrocknet und somit die Kapillare verstopft.

## **5.4 Mikroinjektion mit dem halbautomatischen System von Eppendorf**

### **Apparatur**

Die Mikroinjektion erfolgte mit dem halbautomatischen Eppendorfsystem.

Die Mikroinjektion wurde an einem inversen Mikroskop (Zeiss Axiovert 35) durchgeführt, da nur dieses genug Raum für die Kapillare und den Bewegungsroboter läßt. Es wurde mit Phasenkontrastoptik gearbeitet.

Der Mikromanipulator (Model 5170) steuert die Manipulation der Kapillare in x-, y- und z-Achse, setzt das z-Achsen-Limit als definierte Injektionsebene um und führt die automatisierte axiale Injektionsbewegung aus. Die Auslösung der Injektionsfunktion wird über eine Fußtaste gesteuert.

Der Mikroinjektor (Transjektor 5242) stellt den Druck (Injektionsdruck) bereit, der benötigt wird, damit die Probe von der Kapillare in die Zelle gelangt. Am Mikroinjektor können drei verschiedene Drücke und die Injektionszeit eingestellt werden:

- Kompensationsdruck (zum Schutz der Injektionslösung gegen Vermischung mit dem Medium aufgrund der Kapillarkräfte): 50 - 100 hPa
- Injektionsdruck: 100 - 150 hPa
- Reinigungsdruck (zum Freispülen verstopfter Kapillaren): 5000 - 6000 hPa
- Injektionszeit (Zeitdauer, über die Injektionsdruck gehalten wird): 0,1 - 0,3 Sekunden

### **Einbringen der Kapillare in das Mikroskopfeld, Setzen der Limits und Mikromanipulation**

Da die Kapillarspitze leicht abbricht, z.B., wenn sie gegen den Boden der Kulturschalen gestoßen wird, ist bei Ihrer Handhabung Vorsicht geboten.

### **Zentrieren der Kapillaren**

- Einstellen des Mikromanipulator auf ‚fast‘ im dynamischen Modus
- Zentrieren der Kapillare über der Mitte des Deckgläschens per Augenmaß
- Absenken der Kapillare, bis die Kapillarenspitze das Medium berührt
- Einstellen eines Objektivs mit kleiner Vergrößerung (3,6x) und Fokussieren auf die Zellen
- Zentrieren der Kapillarspitze im Sichtfeld und weiteres Absenken der Spitze
- Einstellen eines Objektivs mit hoher Vergrößerung (40x)
- Weiteres Absenken der Kapillare, bis Öffnung der Kapillare sowie Zellen im Fokus sind

### Setzen der Limits

- Einstellen des Mikromanipulator auf ‚slow‘-Modus
- Fokussieren der Zellen
- Absenken der Kapillarspitze bis diese in derselben Fokusebene wie die Zellen ist
- Festsetzen des unteren z-Limits durch Drücken der ‚limit‘-Taste
- Bewegen der Kapillare aus der Fokusebene, so daß die Kapillare frei über die Zellen bewegt werden kann

### Mikromanipulation und Injektion

Bei der automatisierten Injektion mit dem Eppendorf-System wird eine axiale Bewegung ausgeführt, um die Zelle zu penetrieren. Diese Bewegung resultiert aus der simultanen Bewegung in der x- und z-Achse des Motors des Manipulators. Wenn die Kapillare das vorgegebene z-Limit erreicht hat, wechselt der Mikromanipulator vom Kompensations- zum Injektionsdruck und hält diesen so lange, wie die Injektionszeit gewählt wurde. Der Druck wechselt dann automatisch wieder zum Kompensationsdruck und die Kapillare wird wieder zum Ausgangspunkt bewegt.

Zur Injektion ist die Kapillare mit dem Joystick des Mikromanipulators über die Zelle zu bringen, in die die Probelösung injiziert werden soll. Bei Kerninjektionen wird die Kapillare direkt über den Kern gefahren. Injektionen in das Cytoplasma werden unmittelbar neben dem Kern ausgeführt, dort wo die Stärke des Cytoplasmas am größten ist.

Der Injektionsvorgang wird über das Fußpedal ausgelöst.

Für die Injektionen gilt: Bei einem gegebenen Durchmesser der Öffnung an der Kapillarspitze nimmt die Auslaßrate linear zu dem angesetzten Druck zu und linear mit steigender Viskosität der Probelösung ab.

Die Anzahl der Injektionen wurde durch einen Zähler erfaßt. Gewöhnlich wurden ca. 50 Injektionen pro Ansatz durchgeführt, was in der Regel einer Injektionszeit von 2 Minuten entsprach.

Bei der Injektion wurde darauf geachtet, daß die injizierten Zellen einen gewissen Abstand zueinander hatten, da Nachbarzellen ohne Fluoreszenzfarbstoff zur Bestimmung der Eigenfluoreszenz, ein Wert der als Hintergrund bei der Auswertung von den Meßwerten subtrahiert wurde, benötigt wurden.

### 5.5 Inkubation der injizierten Zellen

Die Zellen wurden nach der Mikroinjektion für 1 - 30 Minuten bei 37 °C, 98 % Luftfeuchtigkeit, 5 % CO<sub>2</sub> in Kulturmedium im Brutschrank inkubiert. Bei Experimenten, die bei 4 °C ablaufen sollten, wurden die Zellen in Kulturschalen mit HEPES-haltigem Medium bei Raumluft auf Eis inkubiert. Den Inkubationsmedien wurde in der Regel 5 mM 8-Br-cAMP zugesetzt, ein membranpermeables, nicht durch Phosphodiesterase hydrolysierbares cAMP-Analogon, das eine Bindung der C-Untereinheit an die R-Untereinheiten unterbindet. Andere Zusätze wie z.B. Inhibitoren wurden dem Medium in den dem Ergebnisteil zu entnehmenden Konzentrationen zugefügt.

## 5.6 Konservierung der Präparate

### Fixierung mit Paraformaldehyd

Zur Fixierung der Zellen wurden diese für 10 Minuten in einer 3 % igen Paraformaldehyd-Lösung bei RT inkubiert.

<u>PFA-Lösung (3 %):</u>	3	g	Paraformaldehyd (PFA)
	100	ml	PBS (pH, 7,4)

Das Paraformaldehyd wurden in 50 ml Wasser bei 65°C so lange gerührt, bis die Lösung klar wurde, anschließend der pH-Wert mit NaOH auf 7,4 eingestellt und 50 ml 2x PBS zugegeben. Die PFA-Lösung wurde partikelfrei filtriert und aliquotiert bei -20°C gelagert.

### Einbetten der Präparate

Die auf einem Deckgläschen gewachsenen Zellen wurden mit 5 µl Mowiol-Lösung auf einem Objektträger eingebettet. Die Präparate konnten so mehrere Wochen lichtgeschützt bei 4 °C gelagert werden.

<u>Mowiol-Lösung:</u>	2,4	g	Mowiol 4-88
	6	ml	Glyzerin
	6	ml	dest. Wasser
	12	ml	0,2 m Tris, pH 8,6
	2,5	% (w/v)	DABCO

Glycerin, Wasser und Mowiol wurden zusammengegeben und 2 Stunden bei RT geschüttelt. Nach Zugabe von 12 ml Tris-Puffer wurde die Lösung bei 50 °C für ca. 3 Stunden inkubiert. Um ein vorzeitiges Ausbleichen der Präparate zu verhindern, wurde das Anti-Photobleaching-Reagenz, DABCO, dazugegeben. Die fertige Mowiol-Lösung wurde filtriert und bei -20 °C gelagert.

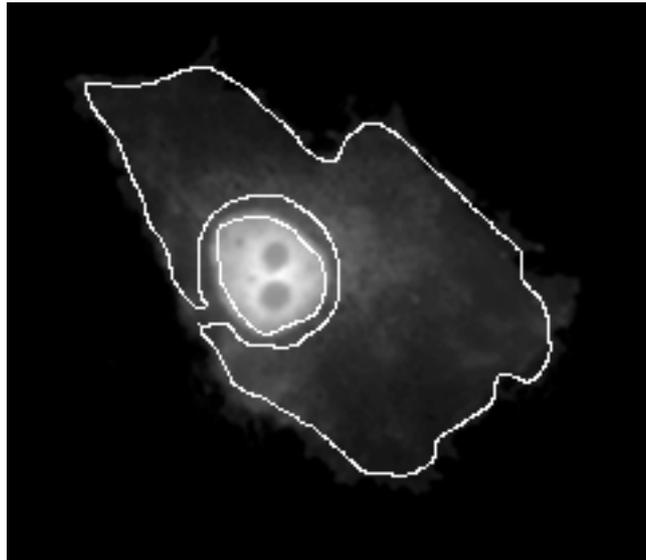
## 5.7 Detektion und Auswertung

Digitalisierte Bilder der fluoreszenten Zellen wurden mit einem Axioplan Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen; Lampe: XBO 75 W, HBO 100 W; Filter BP 365, FT 395, LP 397) ausgestattet mit einer computergesteuerten CCD Kamera (Photometrics Ltd Quantix) aufgenommen. Aufnahme und Auswertung der Bilder erfolgte mit der IPLab Spectrum Software (Version 3.1.2, Signal Analytics Corp.).

Zur Quantifizierung der kompartimentspezifischen Fluoreszenzintensitäten wurde die gesamte Fläche von Kern und Cytoplasma herangezogen (Abb. 7). Die durch Abzug des Hintergrundes (mittlerer Grauwert benachbarter, nicht injizierter Zellen) korrigierten Kern- und Cytoplasma-Fluoreszenzintensitäten wurden für jede Zelle separat ermittelt; aus diesen wurde dann das Kern-Cytoplasma-Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten jeder einzelnen Zelle berechnet (Pepperkok et al., 1993). Anschließend wurde ein Mittelwert aller Kern-Cytoplasma-Verhältnis-Werte der Zellen eines Ansatzes genommen. Die Standardabweichung  $s$  des Mittelwertes wurde nach folgender Formel berechnet:

$$s = \pm \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{(n-1)}}$$

mit  $n$ : Stichprobenumfang,  $\bar{x}$ : Mittelwert und  $x_i$ : Meßwert



**Abbildung 7: Auswahl der Auswertebereiche zur Quantifizierung der kompartimentspezifischen Fluoreszenzintensitäten**

Die Quantifizierung wurde über digitale Fluoreszenzmikroskopie mit der IPLab Spectrum Software (Version 3.1.2, Signal Analytics Corp.) durchgeführt.

## 6 Indirekte Immunfluoreszenz

Zur Lokalisation der R-Untereinheiten der PKA und des Proteinkinase-Inhibitors in der intakten Zelle wurden indirekte Immunfluoreszenzstudien durchgeführt.

Die Zellen wurden wie für die Mikroinjektionsexperimente auf Glasdeckgläschen kultiviert (s. *Material und Methoden* 5.1). Die Immunfluoreszenzfärbung der Zellen wurde wie folgt durchgeführt:

Durchführung:

- Fixieren der Zellen für 10 Minuten in 3 % (w/v) Paraformaldehyd in PBS
- Waschen der Zellen für 15 Minuten mit PBS
- Permeabilisieren der Zellen für 4 Minuten in 0,1 % (v/v) Triton X-100
- Waschen der Zellen für 15 Minuten mit PBS
- Inkubation der permeabilisierten und fixierten Zellen mit dem in 1 % (w/v) BSA/PBS verdünnten Primärantikörper für 20 Minuten bei RT
- Waschen der Zellen für 15 Minuten mit PBS
- Inkubation der Zellen mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, der in 1 % (w/v) BSA/PBS verdünnt wurde, für 20 Minuten bei RT
- Waschen der Zellen für 15 Minuten mit PBS
- Eindeckeln der Zellen mit je 5  $\mu$ l Mowiol/DABCO (s. *Material und Methoden* 5.6) pro Glasdeckgläschen auf Objektträgern

Die Präparate wurden bei 4 °C gelagert. Sie wurden mit Hilfe des Axiphot-Mikroskops der Firma Zeiss betrachtet und mit 400 ASA Kodak-Filmen dokumentiert oder mit einem Fluoreszenz-Mikroskop der Firma Zeiss und der daran angeschlossenen CCD-Kamera, die über die Software IPLab Spectrum (*Material und Methoden* 5.7) gesteuert wurde, fotografisch festgehalten.

## 7 Importkinetik / Import Assay

Eine zur Mikroinjektion alternative Methode ist der Import-Assay. Bei dieser Art von Assay wird die Cytoplasmamembran von Zellen mit Digitonin permeabilisiert, wodurch ein Eindringen von Proteinen aus dem die Zellen umgebenden Medium möglich wird. Da sie Kernmembran intakt bleibt, können damit Kernimportstudien gemacht werden.

Die permeabilisierte HeLa-Zellen wurden ähnlich hergestellt, wie in der Methode von Adam *et al.* [Adam *et al.* 1990] beschrieben. HeLa-Zellen wurden auf 12 mm Deckgläschen aufgezogen, mit kaltem Import-Puffer gewaschen, und in Digitonin-haltigen Import-Puffer (60 µg Digitonin / ml) für 16 Minuten auf Eis permeabilisiert. Die permeabilisierte Zellen wurden zweimal in kaltem Import-Puffer ohne Digitonin gewaschen. Nach Entfernen überschüssigen Puffers von den Deckgläschen wurde 25 - 30 µl Import-Lösung auf die Digitonin-permeabilisierten HeLa-Zellen gegeben. Der Import-Reaktionsansatz konnte neben der fluoreszenzmarkierten Importprobe, ein Energie-regenerierendes System (Energie-Mix), Komponenten des Ran-GTPase-Systems (Ran-Mix) und Cytosol aus Retikulozyten enthalten [Görlich *et al.* 1995].

Bei Endpunktbestimmungen wurden die permeabilisierten HeLa-Zellen auf den Deckgläschen nach Aufgabe der Probelösung, Inkubation und Entfernen der Probelösung in 4 % PFA-Lösung fixiert (s. *Material und Methoden* 5.6). Die Auswertung der in Mowiol eingebetteten Präparate erfolgte zu einem späteren Zeitpunkt am Fluoreszenzmikroskop.

Sollten Kinetiken aufgenommen werden, so wurden die Deckgläschen mit den permeabilisierten HeLa-Zellen am konfokalen Mikroskop eingespannt und mit Hilfe einer applizierten Lösung eines FITC-markierten Proteins (2 µM Nukleoplasmin mit deletiertem NLS oder IBB-Core-Pentamer), das vom Kern ausgeschlossen blieb, in Fokus gebracht. Die Vorinkubation diente auch gleichzeitig der Blockierung unspezifischer Bindungen. Danach wurde diese Proteinlösung vorsichtig entfernt und 25 - 30 µl eines Import-Reaktionsansatzes auf die Zellen gegeben. Die Scans am konfokalen Mikroskop wurden direkt durch den Import-Reaktionsansatz gemacht, wobei das Probenmaterial durch den Rhodamin-Kanal detektiert wurde.

Die Import-Kinetiken wurden mit Hilfe von Frau K. Ribbeck, Abteilung D. Görlich, ZMBH in Heidelberg durchgeführt.

Sollte der Effekt von Faktoren wie der dominant-negativen Importin  $\beta$ - Mutante (45-462) (2 µM) oder der Ran-GTP-Mutante RanQ69L-GTP (20 µM) überprüft werden, so wurden die permeabilisierten HeLa-Zellen für wenige Minuten mit diesen Mutanten vorinkubiert.

Die Import-Experimente wurden bei RT durchgeführt.

<u>Import- Puffer:</u>	120	mM	Kaliumacetat
	5	mM	Magnesiumacetat
	250	mM	Sukrose
	0,5	mM	EGTA
	20	mM	Hepes, pH 7,5
<u>Ran-Mix (20x):</u>	3	mM	Ran-GTP
	0,3	µM	NTF2
	0,3	µM	RanBP1
	0,2	µM	Rna1p
<u>Energie-Mix (20x):</u>	1	mM	ATP
	1	mM	GTP
	20	mM	Kreatininphosphat
	50	µg/ml	Kreatininkinase
	0,1	U/µl	Apyrase

Das Digitonin, der Ran- und Energie-Mix sowie die verwendeten Importfaktoren wurden von der Abteilung Herrn Dr. D. Görlich, ZMBH, Heidelberg zur Verfügung gestellt.

## 8 Depletion

### Bindungsassay

Um die Interaktion der C-Untereinheit der PKA mit möglichen nukleären Transportfaktoren oder anderen Bindungspartner zu finden, wurden Bindungsassays durchgeführt. Dafür wurde rC $\alpha$ myr biotinyliert und an Streptavidin-Agarose immobilisiert [Gorlich *et al.* 1995]. Die Affinitätsmatrix wurde mit einem cytosolischen Extrakt aus Retikulozyten (Promega) inkubiert. Das nach der Inkubation durch rC $\alpha$ myr von Bindungspartnern depletierte Cytosol wurde entfernt und eingefroren. Nach ausgiebigem Waschen des Sepharosematerials wurde die gebundenen Proteine mit 1,5 M Magnesiumchlorid eluiert, präzipitiert und in SDS-haltigen Probenpuffer aufgenommen. Detektiert wurden die eluierten Proteine nach Trennung im SDS-Gel und anschließender Coomassie-Färbung.

Der durch rC $\alpha$ myr depletierte cytosolische Extrakt wurde in Import-Assays eingesetzt (s. *Material und Methoden 7*). So konnte überprüft werden, ob das Importverhalten von rC $\alpha$ myr durch die vorherige Depletion des Cytosols beeinflusst wurde.

Als Kontrolle wurde Retikulozytenextrakt mit Streptavidin-Agarose ohne Liganden behandelt. Die Vorgehensweise bei dieser Pseudodepletion entsprach der des Depletionsansatzes.

Durchführung der Biotinylierung:

- Lösen von EZ-Link™NHS-Biotin (Pierce, Rockford, USA) in wasserfreiem DMSO (10mg/ml)
- Reaktionsansatz (0,5 ml):
 

1	mg	Ligand in PBS
0,1	M	Natriumcarbonat, pH 8,5
8	mM	ATP
14	mM	Magnesiumchlorid
- Zugabe eines dreifach molaren Überschuss an NHS-Biotin zum Reaktionsansatz
- Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur
- Abtrennen von nicht gebundenem Biotin über 10DG-Säule (Biorad)
- Protein-Bestimmung der gesammelten Fraktionen zur Detektion des biotinylierten Protein

Durchführung der Depletion:

- Equilibrieren der Streptavidin-Agarose mit PBS
- Binden des biotinylierten Liganden (2mg/ml) an Streptavidin-Agarose für 30 min auf Eis
- Abtrennen der Beads vom Überstand und Waschen der Beads mit PBS zum Entfernen nicht gebundenen Liganden
- Inkubation von 100 bzw. 200  $\mu$ l Affinitätsmatrix mit 100  $\mu$ l Cytosol im Batchverfahren für 3 Stunden bei 4 °C (Zugabe von 1 mM 8Br-cAMP und 2x Energiemix)
- Waschen der Beads mit 4x 1 ml Waschpuffer
- Elution mit 150  $\mu$ l 1,5 M MgCl<sub>2</sub> / Waschpuffer
- Präzipitation der eluierten Proteine mit Isopropanol (Endkonzentration: 90 %)
- Aufnahme der präzipitierten Proteine in SDS-Probenpuffer
- Detektion der eluierten Proteine über SDS-PAGE

<u>Waschpuffer:</u>	10	mM	Hepes-KOH, pH 7,5
	30	mM	Kaliumacetat
	5	mM	Magnesiumacetat

# Ergebnisse

Für die Charakterisierung des Translokationsverhaltens der rekombinanten, myristylierten  $C\alpha$ -Untereinheit ( $rC\alpha myr$ ) in den Kern mittels Mikroinjektionsexperimenten und Import-Assays in permeabilisierte Zellen bedurfte es einer Reihe von Vorversuchen und 'Werkzeugen' wie Kontrollproteinen und Mutanten. In Teil 1 bis 3 des Ergebnisteils werden die Herstellung dieser 'Werkzeuge', die Vorversuche zur Optimierung der Auswertungsmethode und die Charakterisierung der verwendeten Proben mit Schwerpunkt auf  $rC\alpha myr$  beschrieben. Im Teil 4 werden die Untersuchungen dargestellt, die zum Translokationsverhalten von  $rC\alpha myr$  mittels Mikroinjektionsexperimenten und Import-Assays in permeabilisierte Zellen durchgeführt wurden. Der fünfte Teil beschäftigt sich mit den Experimenten, die zur Untersuchung der Retention von  $rC\alpha myr$  in Zellen gemacht wurden.

## 1 Erzeugung einer Mutante der $C\alpha$ -Untereinheit, von $C\alpha$ -Fusionsproteinen und von PKI

Im folgenden wird zunächst die Herstellung der  $C\alpha$ -Doppelmutante  $rC\alpha myr$  (H87Q/W196R), der Fusionsproteine  $C\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase und  $C\alpha$ (1-40)-GST und des Proteinkinase-Inhibitors (PKI) beschrieben. Diese Proteine wurden für die Untersuchung des Mechanismus der Kern-Cytoplasma-Translokation eingesetzt.

### 1.1 Herstellung der $C\alpha$ -Doppelmutante $rC\alpha myr$ (H87Q/W196R)

Es wurde eine Doppelmutante der  $C\alpha$ -Untereinheit  $rC\alpha myr$  (H87Q/W196R) kloniert und exprimiert, die unter physiologischen Bedingungen durch die R-Untereinheiten nicht inhibiert werden kann und somit in Abwesenheit von PKI als konstitutiv aktiv gilt [Orellana *et al.* 1993].

Die Mutagenesen der Aminosäurereste Histidin 87 zu Glutamin und Tryptophan 196 zu Arginin wurden im Vektor pT7-7- $C\alpha$  mit dem 'Quik Change Site Directed Mutagenesis Kit' durchgeführt (s. *Material und Methoden* 3.5.1). Die Einführung der Mutationen erfolgte

nacheinander. Aufgrund des hohen GC-Gehalts der Primer für den Austausch des Tryptophans 196 wurde hier die Annealing-Temperatur von 55 °C auf 58 °C erhöht (Primer: s. *Anhang*). Der Erfolg des Basen-Austausches wurde durch Sequenzierung nachgewiesen.

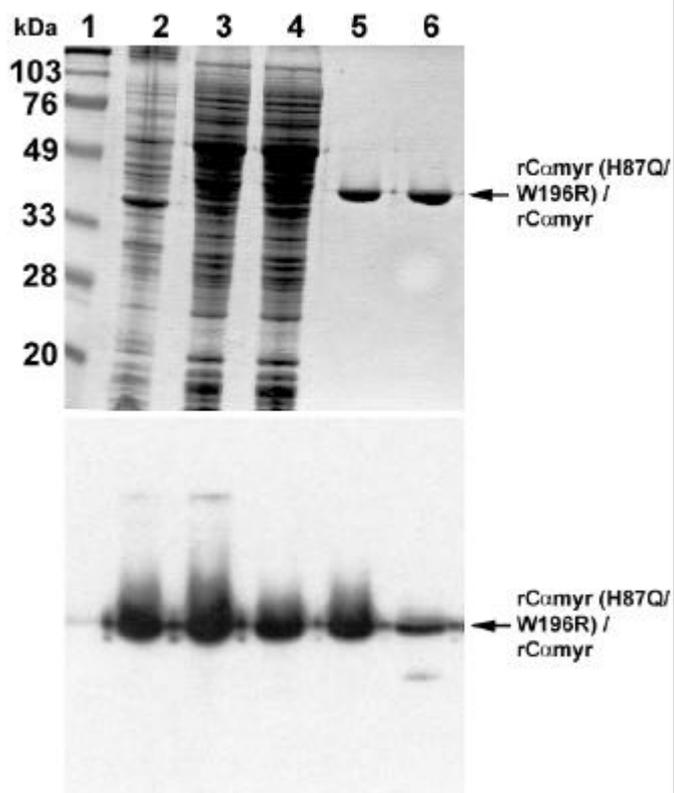
Um rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R) am N-Terminus zu myristylieren, wurde die C $\alpha$ -Doppelmutante mit der die Myristylierung katalysierenden N-Myristyltransferase in BL21(DE3) coexprimiert (s. *Material und Methoden 2.7*). Die Aufreinigung von rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R) erfolgte im ersten Schritt über die PKI(5-24)-Affinitätschromatographie. Daß die Bindung der Mutante an PKI(5-24) möglich war, kann als deutlicher Hinweis auf ihre katalytische Aktivität gewertet werden. Im zweiten Schritt erfolgte die Nachreinigung über Mono-S-Ionenaustauscherchromatographie. Das bei der Mono-S-Säulenchromatographie erhaltene Elutionsprofil für rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R) entsprach dem des myristylierten Wildtyps (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Überprüfung der Expression und Reinigung von rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R) erfolgte über gelelektrophoretische Trennung, Nachweis über Antikörper im Western Blot und Massenspektrometrie.

Wie aus Abbildung 8 zu ersehen ist, zeigt rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R) im 12 %-igen SDS-Gel (Abb. 8A) das gleiche Laufverhalten (Spur 5) wie der Wildtyp (Spur 6) und kann im Immunoblot (Abb. 8B) über einen C $\alpha$ -spezifischen Antikörper detektiert werden (Spur 5).

Durch die massenspektrometrische Untersuchung des Mono-S-Eluats konnte bestätigt werden, daß es sich bei dem exprimierten und gereinigten Protein tatsächlich um rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R) handelte. Sie ergab, daß die C $\alpha$ -Doppelmutante rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R) myristyliert und zum größten Teil zweifach phosphoryliert (Peak A, Abb. 2), in geringen Mengen auch dreifach phosphoryliert vorlag (Peak B, Abb. 2). Das erwartete Molekulargewicht konnte mit weniger als einem Dalton Abweichung bestimmt werden. Die Messungen wurden von Herrn W. D. Lehmann und Herrn A. Schlosser (Abteilung Zentrale Spektroskopie, DKFZ, Heidelberg) durchgeführt.

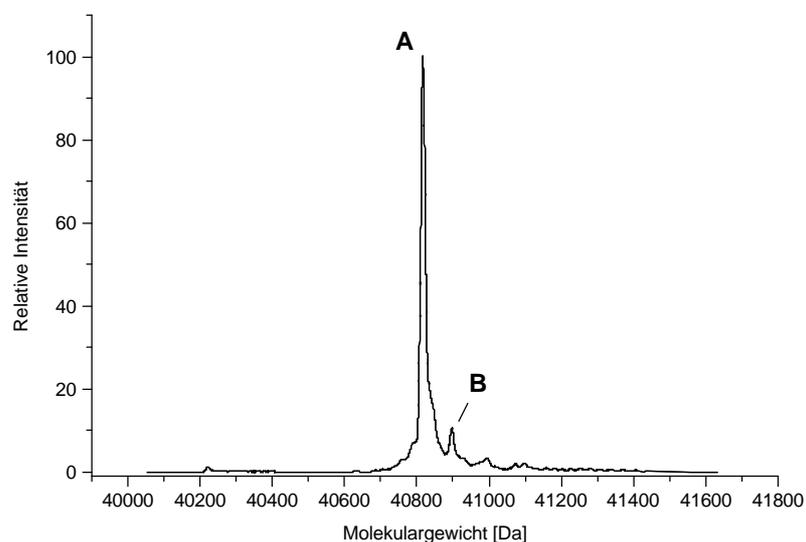
Abbildung 9 zeigt das Elektrosprayionisations-Massenspektrum (ESI-Massenspektrum) von rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R).



**Abbildung 8: Kontrolle der rCamyr (H87Q/W196R)-Expression in *E. coli* BL21(DE3) und der rCamyr (H87Q/W196R)-Präparation mittels SDS-PAGE (A) und Western Blot (B)**

Das mit Coomassie gefärbte SDS-Gel ist unter A dargestellt. Nach Trennung im 12 %-igen SDS-Gel und anschließendem Transfer auf eine PVDF-Membran wurde diese mit dem Antikörper anti-C $\alpha$  (C-20) in einer 1:5000 Verdünnung analysiert. Der Immunoblot ist unter B abgebildet.

1: Molekulargewichtsstandard; 2: Sediment des Rohlysats nach Ultrazentrifugation; 3: Überstand des Rohlysats nach Ultrazentrifugation; 4: Durchlauf der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie; 5: Mono-S-Eluat von rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R); 6: Mono-S-Eluat von rC $\alpha$ myr (WT) als Kontrolle.



**Abbildung 9: ESI-Massenspektrum von in *E. coli* exprimiertem rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)**

Die Messungen wurden im nano-ESI-Betrieb an einem Tripel Quadrupol durchgeführt. Die Ionisationsmethode war Positiv-Elektrosprayionisation. Die MS-Massentrennung wurde im TOF (time of flight)-reflex-Modus betrieben. Die MS-Messungen wurden von Herrn W. D. Lehmann und Herrn A. Schlosser (Abteilung Zentrale Spektroskopie, DKFZ, Heidelberg) durchgeführt.

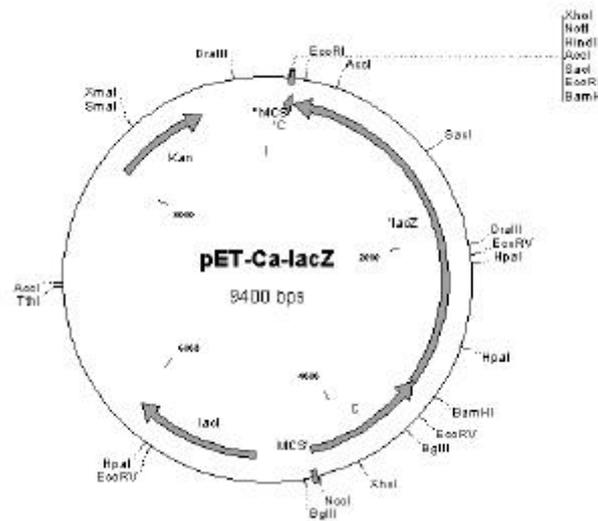
Peak **A**: zweifach phosphorylierte rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R) (gemessenes Molekulargewicht: 40819,5 Da; theoretisches Molekulargewicht: 40819 Da); Peak **B**: dreifach phosphorylierte rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R) (gemessenes Molekulargewicht: 40899,9 Da; theoretisches Molekulargewicht: 40899 Da)

## 1.2 Herstellung der C $\alpha$ -Untereinheit als $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsprotein

Um das Molekulargewicht der C $\alpha$ -Untereinheit über die für die passive Diffusion in den Kern angenommene Ausschlußgröße von 60 kDa zu bringen, wurde ein Fusionsprodukt aus C $\alpha$ -Untereinheit (41 kDa) und  $\beta$ -Galaktosidase (116 kDa) hergestellt. Das Fusionsprotein mit einer Größe von 157 kDa ist mehr als dreimal so groß als die C $\alpha$ -Untereinheit allein und liegt damit weit über der Ausschlußgrenze.

Als Expressionsvektor wurde der Vektor pET28b aufgrund seiner gegenüber dem Vektor pT7-7 höheren Expressionsrate gewählt. Der verwendete Vektor enthielt bereits das C $\alpha$ -Gen (pET28b-His-C $\alpha$ ) (s. *Anhang*). Um dieses samt His-tag zu entfernen, wurde er mit NcoI und BamHI geschnitten. Dabei wurden die für die weiteren Klonierungen notwendigen Schnittstellen generiert. Das C $\alpha$ -Gen für die beabsichtigte Fusion mit  $\beta$ -Galaktosidase wurde entsprechend mittels PCR modifiziert. Mit pT7-7-C $\alpha$  als Template wurde am 3'-Ende eine NcoI-Schnittstelle und am 5'-Ende eine BamHI-Schnittstelle eingefügt, wobei gleichzeitig das Stopp-Codon entfernt wurde (Primer: s. *Anhang*). Durch die Einführung zweier Basen, die das Codon für Glycin ergänzten, wurde das Leseraster erhalten. Das PCR-Produkt, d.h. das C $\alpha$ -Gen mit 3'-NcoI- und 5'-BamHI-Schnittstelle und ohne Stopp-Codon, wurde mit dem ebenfalls mit NcoI und BamHI geschnittenen Vektor ligiert. Nach der Ligation des C $\alpha$ -(NcoI/BamHI)-Fragments in pET28b (NcoI/BamHI) wurde der ligierte Vektor mit BamHI gespalten. Das im pMC 1871 Vektor (s. *Anhang*) vorliegende lacZ-Gen wurde über die BamHI-Schnittstellen in das pET28b-C $\alpha$ -Konstrukt eingefügt. Um nach Spaltung des Vektors pMC1871 mit BamHI das ausgeschnittene lacZ-Fragment von einem zweiten entstandenen Fragment ähnlicher Größe zu unterscheiden, wurde letzteres mit Tth111 geschnitten. Das lacZ (BamHI/BamHI)-Fragment wurde in den am 5'-Ende dephosphorylierten Vektor pET28b-C $\alpha$  (BamHI/BamHI) ligiert. Die Orientierung des lacZ-Gens nach der Ligation in den Vektor konnte über eine Restriktionsspaltung mit DraIII überprüft werden. Zur weiteren Kontrolle wurde das Konstrukt sequenziert.

In Abbildung 10 ist die Plasmidkarte des klonierten Vektors pET28b-C $\alpha$ -lacZ abgebildet.

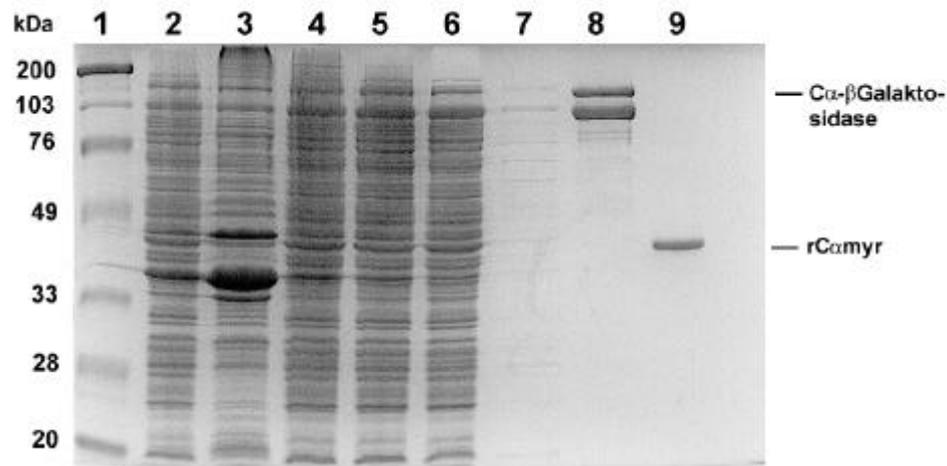


**Abbildung 10: Plasmidkarte des Vektors pET28b, in den das Ca-Gen und das lacZ-Gen kloniert wurden (pET28b-Ca-lacZ)**

Das Fusionsprotein ließ sich gemäß der für die  $C\alpha$ -Untereinheit verwendeten Vorschrift exprimieren und über PKI-Affinitätschromatographie reinigen. Die erfolgte Bindung des Fusionsproteins an PKI legt nahe, daß die Kinase-Aktivität der  $C\alpha$ -Untereinheit durch die Fusion mit  $\beta$ -Galaktosidase nicht wesentlich beeinträchtigt ist.

Die Kontrolle der Expression und der Reinigung über PKI(5-24)-Affinitätschromatographie erfolgte über elektrophoretische Trennung im 10 %-igen SDS-Gel. Das mit Coomassie gefärbte SDS-Gel ist in Abbildung 11 abgebildet. Bei dem PKI-Eluat zeigten sich zwei dominante Banden (Abb. 11, Spur 8). Den Proteinen dieser Banden kann ein Molekulargewicht von 157 kDa, dem theoretischen Molekulargewicht des Fusionsproteins, und von ca. 100 kDa zugeordnet werden. Bei letzterem könnte es sich um ein Abbauprodukt handeln. Da sowohl das 157 kDa als auch das 100 kDa große Protein bei der PKI-Affinitätschromatographie an das PKI-Peptid spezifisch gebunden hat, ist anzunehmen, daß bei beiden Proteinen die  $C\alpha$ -Untereinheit intakt ist und der Größenunterschied durch eine Verkürzung des  $\beta$ -Galaktosidase-Anteils zustande kommt. Aufgrund der Spezifität des PKI(5-24)-Affinitätsmaterials ist ein Binden des  $\beta$ -Galaktosidaseanteils an PKI nicht anzunehmen.

Da sowohl das intakte als auch das verkürzte Fusionsprotein erheblich größer waren als 60 kDa, wurde auf eine weitere Reinigung verzichtet und bei den sich anschließenden Mikroinjektionsexperimenten das Gemisch eingesetzt.



**Abbildung 11: Expression in *E. coli* BL21(DE3) und Reinigung des Fusionsproteins C $\alpha$ -b-Galaktosidase**

Die Trennung erfolgte im 10 %-igen SDS-Gel. Die Proteine wurden durch Färbung mit Coomassie detektiert.

1: Molekulargewichtsstandard; 2: Rohlysate; 3: Sediment nach Ultrazentrifugation des Rohlysats; 4: Überstand nach Ultrazentrifugation des Rohlysats; 5: Durchlauf-Fraktion der PKI(5-24)-Affinitätschromatographie; 6: Waschfraktion (TMN 50-Puffer); 7: Waschfraktion (TMN 250-Puffer); 8: eluierte Fraktion; 9: rekombinante C $\alpha$ -Untereinheit als Kontrolle

### 1.3 Konstruktion des C $\alpha$ (1-40)-GST-Fusionsproteins

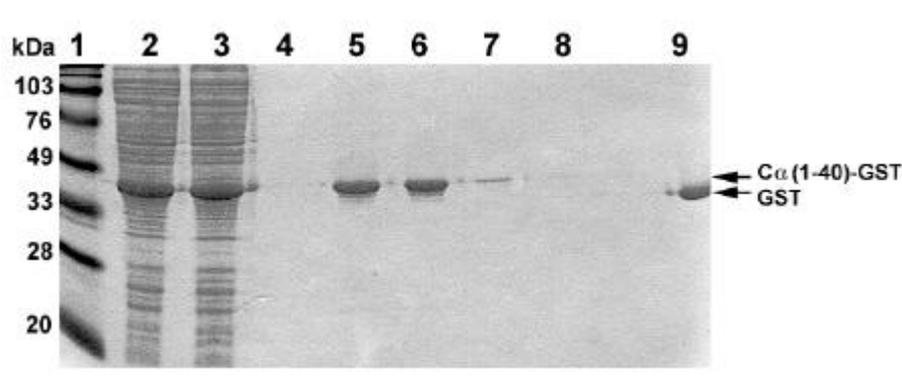
Um den Einfluß des N-Terminus von rC $\alpha$ myr auf die Verteilung des Enzyms in der Zelle zu untersuchen, wurde ein Fusionsprotein, bestehend aus den ersten 40 Aminosäuren der C $\alpha$ -Untereinheit und einer sich daran C-terminal anschließenden Glutathion-S-Transferase (GST), hergestellt (in Zusammenarbeit mit Herrn A. Girod (jetzt EMBL, Heidelberg) und Herrn T. Schneider, DKFZ, Heidelberg).

Die Klonierung erfolgte über zwei unabhängige PCR-Schritte (s. *Material und Methoden* 3.5.2). Das für die ersten 40 Aminosäuren der C $\alpha$ -Untereinheit (C $\alpha$ (1-40)) kodierende DNA-Fragment wurde unter Einführung einer HindIII-Schnittstelle am 3'-Ende amplifiziert. Als Template diente das C $\alpha$ -Gen in dem Vektor pBluescript (s. Anhang). Das GST-Gen wurde mit dem Vektor pGEX4T2 als Template amplifiziert, wobei am 3'-Ende ein Stopp-Codon und eine BamHI-Schnittstelle eingefügt wurden. Am 5'-Ende wurde eine HindIII-Schnittstelle generiert, über die anschließend die beiden amplifizierten und mit HindIII-verdauten Fragmente ligiert werden konnten. Das Konstrukt konnte über seine 5'-Nde- und seine 3'-BamHI-Schnittstellen sowohl in einen pET28b- als auch einen pT7-7-Expressionsvektor kloniert werden.

Exprimiert wurde das  $C\alpha(1-40)$ -GST-Fusionsprotein in nicht myristylierter und durch Coexpression mit der N-Myristyltransferase in myristylierter Form. Außerdem wurde als Kontrolle GST allein hergestellt.

Die Reinigung erfolgte über Glutathion-Affinitätschromatographie nach der unter *Material und Methoden* 4.2.3 angegebenen Vorschrift.

Die Expression und die Reinigung der Proteine wurde zunächst im SDS-Gel kontrolliert (Abb. 12). Erwartungsgemäß co-migrierte das Fusionsprotein  $C\alpha(1-40)$ -GST (30 kDa) (Spur 5 und 6, Abb. 12) mit etwas höherem Molekulargewicht als GST (26 kDa) (Spur 9, Abb. 12). Nach diesem Ergebnis war anzunehmen, daß es sich bei dem exprimierten und aufgereinigten Protein um  $C\alpha(1-40)$ -GST handelte.



**Abbildung 12: Kontrolle der Reinigung des  $C\alpha(1-40)$ -GST-Fusionsproteins**

Das GST-Fusionsprotein wurde über eine Glutathion-Säule mit PBS als Elutionspuffer gereinigt. Die Trennung erfolgte in einem 10 %-igen SDS-Gel. Die Detektion der Proteine im Gel erfolgte über Coomassie-Färbung.

1: Molekulargewichtsstandard; 2: Überstand nach Ultrazentrifugation des bakteriellen Rohlysats; 3: Durchlauf-Fraktion der Glutathion-Affinitätschromatographie; 4: eluierte Fraktion 1; 5: eluierte Fraktion 2; 6: eluierte Fraktion 3; 7: eluierte Fraktion 4; 8: eluierte Fraktion 5; 9: GST als Kontrolle

Zur weiteren Kontrolle der exprimierten Proteine wurden diese massenspektrometrisch untersucht. Die MS-Untersuchungen ergaben jedoch aus unbekanntem Gründen keine aussagekräftigen Ergebnisse. Die gemessenen Molekulargewichte zeigten große Abweichungen zu den erwarteten (Ergebnisse nicht gezeigt).

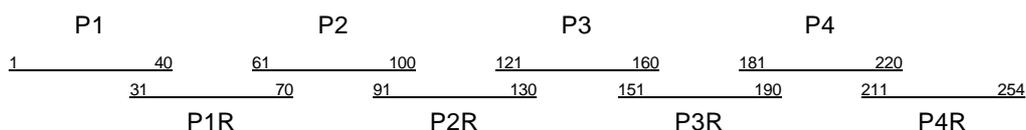
Da die erfolgte Reinigung der Proteine über das Glutathion-Affinitätsmaterial für eine Integrität des GST-Anteils des Fusionsproteins sprach, wurden Veränderungen im N-terminalen Bereich der Fusionsproteine angenommen. Aus diesem Grund wurden die Proteine N-terminal über das Edman-Verfahren ansequenziert (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Aminosäure-Sequenzierung der ersten N-terminalen Aminosäuren des nicht myristylierten  $C\alpha(1-40)$ -GST-Fusionsproteins ergab, daß die ersten fünf Aminosäuren korrekt vorlagen. Das Ergebnis legt nahe, daß der N-Terminus des Proteins korrekt exprimiert

wurde. Das freie GST-Protein hatte zu 80 % noch das N-terminale Methionin und zeigt darüber hinaus ebenfalls keine Veränderungen. Anders verhält es sich mit der Sequenzierung des N-terminal myristylierten Fusionsproteins, das aufgrund seiner N-terminalen Modifikation nicht ansequenzierbar sein sollte. Hier zeigte sich, daß zu 95 % die Myristylsäure und die ersten fünf Aminosäuren, bei den restlichen 5 % sogar die ersten 17 Aminosäuren fehlten. Für die weiteren Experimente wurde nur das nicht myristylierte Fusionsprotein C $\alpha$ (1-40)-GST und GST eingesetzt.

#### 1.4 *De novo*-Synthese des Proteinkinase-Inhibitors PKI

Der thermostabile Proteinkinase-Inhibitor PKI ist der physiologische Inhibitor der C-Untereinheit der PKA. Das PKI-Protein besitzt eine inhibitorische Domäne mit hoher Affinität zum aktiven Zentrum der C-Untereinheit in Anwesenheit von Magnesium und ATP. Einer weiteren Domäne des Proteins kann die Funktion eines NES, eines Kernexport-Signals, zugeordnet werden [Hauer *et al.* 1999]. Es wird angenommen, daß das Signal erst nach Bindung der C-Untereinheit der PKA exponiert wird. PKI hat somit nicht nur Einfluß auf die katalytische Aktivität der C-Untereinheit, sondern auch auf deren Lokalisation in der Zelle. Da der kommerziell erwerbliche PKI nur eine geringe inhibitorische Wirkung zeigte, wurde PKI in Eigenherstellung gewonnen. Weil die cDNA des Gens nicht zur Verfügung stand, wurde die PKI-DNA-Sequenz *de novo* über ein Reihe von PCR-Schritten hergestellt. Dazu wurden acht lange Oligonukleotid-Primer von ca. 40 bp Länge synthetisiert (Herr W. Weinig, DKZF, Heidelberg), die sich um 9 bp überlappten (Abb. 13). Aus diesen sollte die komplette DNA-Sequenz des PKI-Gens entstehen. Zusätzlich wurden acht kurze Primer synthetisiert, die jeweils am 5'-Ende der langen Primer hybridisierten und so die Amplifikation der entstandenen Genabschnitte ermöglichten.

Die Sequenzen der langen und der kurzen Primer ist dem *Anhang* zu entnehmen. In Abbildung 13 sind die acht langen Primer, aus denen PKI über die *de novo*-Synthese zusammengesetzt wurde, schematisch dargestellt.



**Abbildung 13: Primer für die *de novo*-Synthese der DNA-Sequenz des Proteinkinase-Inhibitors PKI über PCR**

Die Sequenzen der Oligonukleotid-Primer P1 - P4 und P1R - P4R sind dem *Anhang* zu entnehmen.

In einer ersten Reihe von PCR-Schritten wurden jeweils zwei der sich überlappenden Primer, P1, P2, P3 und P4 mit den jeweils in 9 bp komplementären Primern P1R, P2R, P3R und P4R hybridisiert, elongiert und amplifiziert. Von den vier PCR-Produkten wurden Ansatz 1 (bp 1-70) und 2 (bp 61-130) sowie 3 (bp 121-190) und 4 (bp 181-220) in einer zweiten Reihe von PCR-Schritten zusammengefügt. Im letzten PCR-Schritt wurde aus den zwei entstandenen PCR-Produkten (bp 1-130 und 121-254) das komplette Gen zusammengesetzt. Das PCR-Produkt, welches auch flankierende Schnittstellen enthält, wurde mit NdeI und BamHI geschnitten, um das PKI-Gen in ebenfalls mit NdeI/BamHI-geschnittene Vektoren (pT7-7 und pET28b) zu ligieren.

Die Expression von PKI im pET28b-Vektor erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) (s. *Material und Methoden* 4.1). Die geernteten *E. coli*-Bakterien wurden in Tris-Puffer (10 mM Tris, 10 mM NaCl, 1 mM EDTA) mit Ultraschall aufgeschlossen (Kumer *et al.*, JBC). Eine Vorreinigung des thermo- und säurestabilen Inhibitors konnte durch Fällen der nicht hitzeresistenten Proteine bei 95 °C im Wasserbad sowie durch Einstellen des pH-Wertes mit HCl auf pH 5 und anschließender Zentrifugation erzielt werden. Zur weiteren Aufreinigung wurde der PKI-haltige Überstand nach Bindung an DE-52-Cellulose (Whatman, Maidstone, GB) mit einem linearen Natriumchlorid-Gradienten (Endkonzentration: 0,5 M) in 5 mM Natrium-Acetat-Puffer eluiert [Walsh *et al.* 1971].

Fraktionen, in denen im Kinase-Assay (s. *Material und Methoden* 4.9) Inhibitor-Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurden vereinigt und durch Gelfiltrationschromatographie über eine Sepharose 12 HR10/30-Säule (Pharmacia, Freiburg) mit PBS als Laufpuffer (s. *Material und Methoden* 4.8) nachgereinigt. Der Nachweis des PKI-Proteins gelang über SDS-PAGE und im Western Blot mit einem anti-PKI $\alpha$ -Antikörper (s. *Material und Methoden* 4.5 / 4.6). Die inhibitorische Aktivität des PKI gegenüber der C $\alpha$ -Untereinheit konnte im Kinase-Assay gezeigt werden (s. *Material und Methoden* 4.9).

## 2 Vorversuche zur quantitativen Bestimmung von Fluoreszenzintensitäten in Kern und Cytoplasma und dem sich daraus ergebenden Quotienten $F_{K/C}$

Ein wesentlicher Teil dieser Arbeit befaßt sich mit der quantitativen Auswertung von Kern-Cytoplasma-Verhältnissen fluoreszenzmarkierter Proteine nach Mikroinjektion in eukaryontische Zellen oder nach Einsatz im Import-Assay mit permeabilisierten Zellen.

Zur quantitativen Auswertung wurden digitale Bilder der fluoreszenten Zellen aufgenommen (s. *Material und Methoden* 5.7). Die Kamera setzte dabei die absoluten Fluoreszenzintensitäten, die u.a. abhängig von der Konzentration der fluoreszenzmarkierten Probe, der Art des Farbstoffs, der Schichtdicke des Einbettungsmediums, dem verwendeten Filter, der Lichtintensität der Lampe, der Blende, der Belichtungszeit und der Fokusebene sind, in relative Grauwerte um. Diese Grauwerte sind über einen Faktor mit der Fluoreszenzintensität verknüpft. Der Faktor variiert entsprechend den Kameraeinstellungen, die darauf abzielen, eine Belichtung möglichst innerhalb eines linearen Meßbereichs (Grauwerte 0 - 4095) der Kamera zu erreichen. Für die Aufnahme eines Sets von Experimenten wurden deshalb identische Kameraeinstellungen verwendet. Von daher sind Aufnahmen nur innerhalb eines Experiments, nicht aber mit denen anderer Experimente quantitativ vergleichbar.

Für das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten in Kern und Cytoplasma auf der Basis der von der Kamera produzierten Grauwerte wird im folgenden das Kürzel  $F_{K/C}$  benutzt. Die angegebenen mittleren  $F_{K/C}$ -Werte beziehen sich auf die  $F_{K/C}$ -Werte von bis zu 50 Zellen eines Experimentationsansatzes.

Durch die quantitative Bestimmung des Verhältnisses der Fluoreszenzintensität in Kern und Cytoplasma war es möglich, die Signifikanz der Unterschiede in der Verteilung der Fluoreszenzintensität aufzuzeigen, die bei einem rein optischen Vergleich von Einzelzellen wegen des Umfangs der Streuung zu möglicher Fehlinterpretation geführt hätte. Um die Eigenarten der Quantifizierungsmethode abzuschätzen, wurden der Einfluß der Zelllinie, des Auswertungsbereichs, der Eigenfluoreszenz und der Konzentration der injizierten Probe auf die ermittelten  $F_{K/C}$ -Werte untersucht und die Methode anschließend entsprechend optimiert.

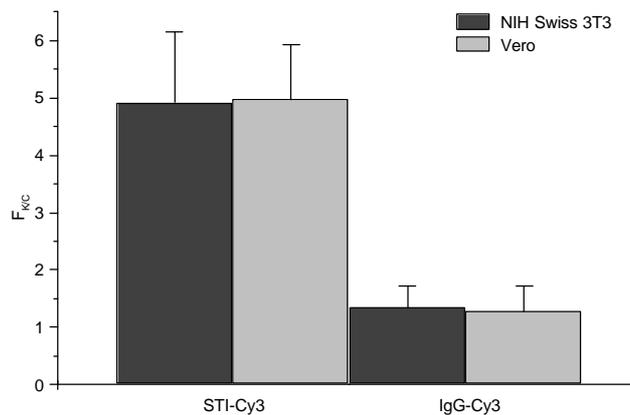
### 2.1 Einfluß der Zelllinie auf $F_{K/C}$

Bei den im Vorfeld dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde hauptsächlich mit adhärent wachsenden murinen NIH Swiss 3T3-Zellen gearbeitet [Pepperkok *et al.* 2000]. Da bei dieser Zelllinie im Verlauf der Kultivierung ein Verlust der Kontaktinhibierung auftrat, was zu Schwierigkeiten bei der Injektion und der quantitativen Auswertung der gemessenen Fluoreszenzwerte führte, wurden Vero-Zellen (s. *Material und Methoden* 5.1) zur

Durchführung der Experimente dieser Arbeit ausgewählt. Ausschlaggebend bei der Wahl dieser Zelllinie für die Mikroinjektionsexperimente war, daß ihre Zellen flach, nicht zu klein und von überwiegend einheitlicher Morphologie sind.

Um zu überprüfen, inwieweit die Morphologie der Zelllinie Einfluß auf die  $F_{K/C}$ -Werte hat, wurde nicht kernmembrangängiges Immunglobulin (IgG) und in den Kern diffundierender Trypsininhibitor aus Sojabohnen (STI) in das Cytoplasma beider Zelllinien mikroinjiziert.

Abbildung 14, in der ein beispielhaftes Experiment darstellt ist, zeigt die mittleren  $F_{K/C}$ -Werte nach Mikroinjektion von Cy3-markiertem IgG (IgG-Cy3) und ebenso markiertem STI (STI-Cy3) in Vero- und NIH 3T3-Zellen. Bei Zellen beider Zelllinien lagen die Mittelwerte der Kern-Cytoplasma-Verhältnisse der gemessenen Fluoreszenzintensitäten sowohl für IgG-Cy3 (Vero:  $1,3 \pm 0,4$ ; NIH:  $1,2 \pm 0,4$ ) als auch für STI-Cy3 (Vero:  $5,0 \pm 1,0$ ; NIH:  $4,9 \pm 1,2$ ) auf sehr ähnlichem Niveau. Die optisch ähnliche Morphologie der Zellen spiegelt sich demnach in den ähnlichen  $F_{K/C}$ -Werten wider. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit vorwiegend mit Vero-Zellen gearbeitet, da diese einfacher und reproduzierbarer kultiviert werden konnten als NIH Swiss 3T3-Zellen.



**Abbildung 14: Vergleich des  $F_{K/C}$ -Werts von STI-Cy3 bzw. IgG-Cy3 in NIH Swiss 3T3-Zellen mit denen in Vero-Zellen**

Den Zellen wurden IgG-Cy3 (Kernausschluß) oder STI-Cy3 (Diffusion) mikroinjiziert (s. *Ergebnisse* 4.1.1). Die Fixierung der Zellen erfolgte ohne vorherige Inkubation. Die Fluoreszenz wurde mit einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop detektiert. Das Verhältnis zwischen nukleärer und cytoplasmatischer Fluoreszenzintensität wurde, wie unter *Material und Methoden* 5.7 und *Ergebnisse* 2 beschrieben, bestimmt.

## 2.2 Einfluß der Auswertebereiche innerhalb der Zellen auf $F_{K/C}$

Die quantitativen Auswertungen der Fluoreszenzintensitäten in Kern und Cytoplasma erfolgte auf der Basis digitaler Aufnahmen der fluoreszenten Zellen. Wie bereits in der Einleitung dieses Unterkapitels und unter *Material und Methoden* 5.7 beschrieben, wurden

bei der Digitalisierung der Daten die absoluten Fluoreszenzintensitäten in relative Grauwerte umgewandelt, d.h., jedem Bildpunkt wurde ein Grauwert zwischen 0 und 4095 zugeordnet. Zur Quantifizierung der kompartimentspezifischen Fluoreszenzintensitäten war es notwendig, Bereiche aus Kern und Cytoplasma auszuwählen, deren Grauwerte über diese Flächen integriert und gemittelt wurden. Der Quotient aus den so ermittelten mittleren Grauwerten ergab das bereits zuvor definierte Verhältnis  $F_{K/C}$ .

In dieser Arbeit wurden drei Möglichkeiten der Auswahl in Betracht gezogen.

Bei der ersten Möglichkeit wird die gesamte Fläche des Kerns und des Cytoplasmas zur Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten berücksichtigt (s. *Material und Methoden* Abb. 7). Bei dieser Art der Auswertung ist zu bedenken, daß das Cytoplasma zu den Zellrändern hin dünner, das Volumen unter der Fläche entsprechend geringer und damit die gemessene Fluoreszenzintensität immer schwächer wird. Je größer eine Zelle in der Fläche ist, desto größer ist auch der Randbereich schwächerer Intensität und desto kleiner ist die für das Cytoplasma ermittelte Fluoreszenzintensität. Durch diesen Effekt nimmt die Form einer Zelle Einfluß auf die Höhe des Verhältniswertes  $F_{K/C}$ . Mit größer werdender Fläche der Zelle steigt der resultierende Wert für  $F_{K/C}$ . Der Fehler kann durch Auswertung einer genügend großen Anzahl von Zellen und die Auswahl von Zellen ähnlicher Morphologie während der Mikroinjektion minimiert werden.

Diese durch die Morphologie der Zelle entstandene Fehlerquelle kann durch die zweite Auswertungsmethode weitestgehend ausgeschaltet werden. Bei dieser Methode wird ein Kreis konstanter Größe als Schablone der auszuwertenden Fläche verwendet. Diese Schablone wird auf den Kernbereich und den Bereich des kernnahen Cytoplasmas angewendet, wodurch beide Auswertebereiche annähernd die gleiche Dicke bzw. ein vergleichbares Volumen aufweisen. Die ermittelten Fluoreszenzintensitätswerte basieren demnach auf ähnlichen Volumina. Ein Einfluß der Morphologie der Zelle auf die Cytoplasma-vermittelte Intensität kommt hier weniger zum Tragen. Nachteil der Methode ist, daß die Auswahl der Bereiche subjektiv getroffen wird. Außerdem kann sie nur angewendet werden, wenn die Probe sich absolut diffus über die Zelle verteilt. Bei Bindung der Probe an spezifische Strukturen wird die Methode der Verteilung der Probe nicht mehr gerecht.

Bei einer dritten Methode werden anders als bei der vorhergehenden nicht nur ein Bereich, sondern drei Bereiche im Cytoplasma ausgewertet und ihre Fluoreszenzintensitäten gemittelt. Die Bereiche im Cytoplasma sollen dabei Zonen unterschiedlicher Dicke des Cytoplasmas repräsentieren, was zwar einen gewissen Vorteil bei einer Ungleichverteilung der Probe im Cytoplasma bedeutet, die Methode jedoch noch mehr von der subjektiven Wahrnehmung des auswertenden Betrachters abhängig macht.

Die Auswertungen wurden in dieser Arbeit nach der ersten Methode durchgeführt, da diese aus den oben genannten Gründen am geeignetsten erschien. Da sich je nach

Auswertungsmethode unterschiedlich hohe Werte für  $F_{K/C}$  ergaben, wurden letztlich alle Auswertungen nur auf eine Art und Weise ausgeführt. Dadurch blieb die Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleistet.

### 2.3 Einfluß der Eigenfluoreszenz (Hintergrund) auf $F_{K/C}$

An Zellen, die nicht mit fluoreszenzmarkierten Konjugaten behandelt wurden, konnte trotzdem ein gewisses Fluoreszenzsignal gemessen werden. Ursache dafür ist die Eigenfluoreszenz der zelleigenen Moleküle. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten mikroinjizierter Zellen wurden um diesen Wert korrigiert, da er unabhängig von der Verteilung der fluoreszenten Probe war und bei der Bestimmung der Verteilungsverhältnisse zu falschen Werten führte. Je geringer der Unterschied zwischen dem Wert des Meßsignals und dem der Eigenfluoreszenz war, was besonders für die cytoplasmatischen Fluoreszenzintensitäten galt, desto deutlicher zeigte sich der Einfluß auf den  $F_{K/C}$ -Wert.

Aus Gründen der Vereinfachung wurde der Eigenfluoreszenz-Wert der gesamten Zelle und nicht die Werte für Kern und Cytoplasma getrennt bestimmt und von den Rohdaten subtrahiert. Der sich dadurch ergebene Unterschied in den  $F_{K/C}$ -Werten gegenüber einer Subtraktion der für Kern und Cytoplasma getrennt bestimmten Werte war minimal (Ergebnisse nicht gezeigt).

### 2.4 Einfluß der optischen Kontamination auf $F_{K/C}$

Nach Mikroinjektion von Proben, die nicht kerngängig sind, wie z.B. IgG-Cy3, waren die gemessenen Fluoreszenzintensitäten im Kern nach Subtraktion der Eigenfluoreszenz größer als Null. Die mit solchen Proben ermittelten  $F_{K/C}$  lagen in der Regel um einen Wert von 1,2. Der Grund für die ermittelten zu hohen Fluoreszenzintensitäten im Kern war der Beitrag der Fluoreszenz im Cytoplasma an der Kernfluoreszenz. Die Fluoreszenz des oberhalb und unterhalb des Kerns liegenden Cytoplasmas trug bei der in dieser Arbeit gewählten Art der Auswertung zu der Fluoreszenz des Kerns bei.

Für die ermittelte mittlere Kern- (K) bzw. Cytoplasma-Fluoreszenzintensität (C) nach Abzug der Eigenfluoreszenz ist anzunehmen:

$$K = K_T + a \cdot C_T \quad (1)$$

$$C = C_T \quad (2)$$

mit  $K_T$ : wahre mittlere Kern-Fluoreszenzintensität;  $C_T$ : wahre mittlere Cytoplasma-Fluoreszenzintensität;  $a$ : Faktor, um den  $K_T$  bei Kernausschluß zu hoch ist ( $K/C$  bei Kernausschluß = 1,2)

Aus (1) und (2) ergibt sich für das Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten aus Kern und Cytoplasma:

$$\frac{K}{C} = \frac{(K_T + a \cdot C_T)}{C_T} \quad (3)$$

Für den Fall des Kernausschlusses ist  $K_T = 0$ , und es gilt:

$$\frac{K}{C} = a \quad (4)$$

Durch Umformung von (3) ergibt sich unter Zuhilfenahme von (1) und (2) folgende Korrektur des Verhältnisses der Fluoreszenzintensitäten aus Kern und Cytoplasma:

$$\frac{K_T}{C_T} = \frac{K}{C} - a \quad (5)$$

Als Näherung an das wahre Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten aus Kern und Cytoplasma könnte demnach das für den Kernausschluß bestimmte Verhältnis von 1,2 von den mittels Fluoreszenz ermittelten Kern-Cytoplasma-Verhältnissen subtrahiert werden.

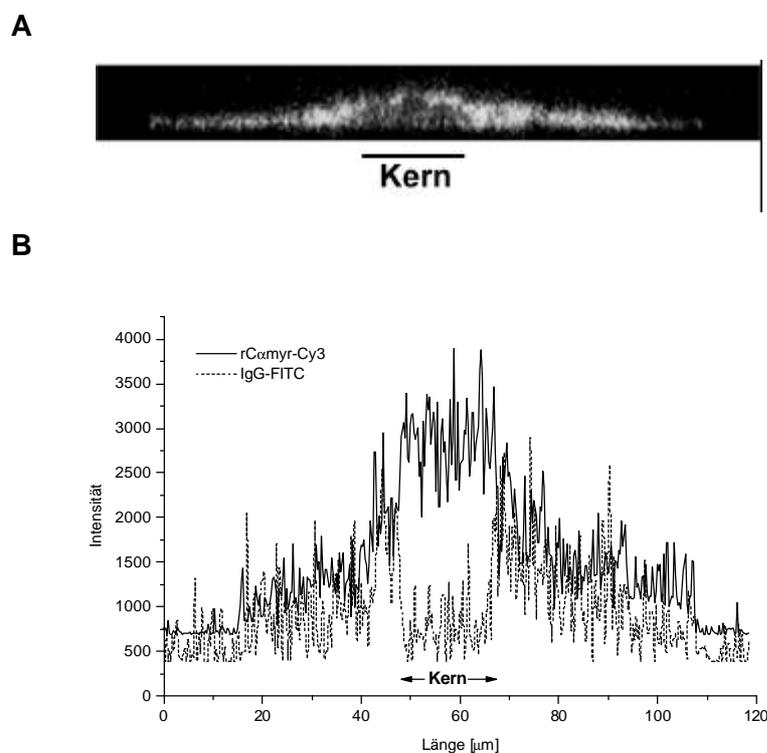
Da die vorangegangenen Überlegungen jedoch von vereinfachten Annahmen ausgehen, wurde in dieser Arbeit der Korrekturfaktor von 1,2 nicht von den ermittelten mittleren  $F_{K/C}$ -Werten subtrahiert, sondern lediglich als gestrichelte Linie bei der Darstellung der Ergebnisse gezeigt. Um den Korrekturfaktor berücksichtigen zu können, hätte dieser für jedes Mikroinjektionsexperiment bestimmt werden müssen. Dazu hätte fluoreszenzmarkiertes IgG coinjiziert werden müssen. Davon wurde jedoch abgesehen, da sich die Fluoreszenzen verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe gegenseitig beeinflussen können, was im Hinblick auf die quantitative Auswertung der Fluoreszenzintensitäten nicht sinnvoll ist. Die Korrektur wurde in der Besprechung der Ergebnisse nicht berücksichtigt, da sich nichts an der Qualität der Ergebnisse, sondern nur an deren Quantität ändert.

Um den Beitrag der Fluoreszenzintensität im Cytoplasma zur Fluoreszenzintensität im Kern noch besser abschätzen zu können, wurde fluoreszenzmarkiertes Immunglobulin G (IgG-DTAF), das vom Kern ausgeschlossen wird, sowie fluoreszenzmarkierte rekombinante myristylierte  $C\alpha$ -Untereinheit (rC $\alpha$ myr-Cy3), die sich zwischen Kern und Cytoplasma verteilt,

in Zellen coinjiziert. Über konfokale Laserscanning-Mikroskopie (CLSM) wurden jeweils mit Filtern für Cy3 und DTAF Rasteraufnahmen von Einzelzellen gemacht. Die Rasteraufnahmen konnten zu einer dreidimensionalen Abbildung der beiden Proben in den Zellen zusammengesetzt werden.

Der optische Längsschnitt durch die NIH Swiss 3T3-Zelle ist in der Abbildung 15A gezeigt. In der Abbildung 15B sind die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der Cy3-markierten  $\alpha$ -Untereinheit r $\alpha$ myr-Cy3 und IgG-DTAF über den in Abbildung 15A gezeigten optischen Längsschnitt dargestellt.

Wird an der dicksten Stelle der Zelle eine Abschätzung des Anteils des Cytoplasmas an der Gesamtdicke der Zelle vorgenommen, so kommt man auf Werte zwischen 25 und 30 %, was sich mit Literaturdaten deckt [Peters 1984].



**Abbildung 15: Optischer Längsschnitt durch die Rasteraufnahmen einer NIH Swiss 3T3-Zelle nach Coinjektion von r $\alpha$ myr-Cy3 und IgG-DTAF**

In NIH 3T3-Zellen wurde r $\alpha$ myr-Cy3 mit IgG-DTAF, 5 mM cAMP und 1 mM DTT coinjiziert und für 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Fluoreszenz der fixierten Zellen wurde im CLSM detektiert.

**A:** Optischer Längsschnitt durch eine NIH Swiss 3T3-Zelle, in die zuvor r $\alpha$ myr-Cy3 und IgG-DTAF injiziert wurde. Die im Cytoplasma (hell) detektierte Fluoreszenz ergab sich durch die Summe der Fluoreszenzintensitäten von r $\alpha$ myr-Cy3 und IgG-DTAF. Die Kernfluoreszenz (dunkel) resultiert nur aus der Anwesenheit von r $\alpha$ myr-Cy3, da IgG-DTAF vom Kern ausgeschlossen bleibt.

**B:** Darstellung der gemessenen Fluoreszenzintensitäten von r $\alpha$ myr-Cy3 (durchgezogene Linie) und IgG-DTAF (gestrichelte Linie) über den unter A gezeigten optischen Längsschnitt.

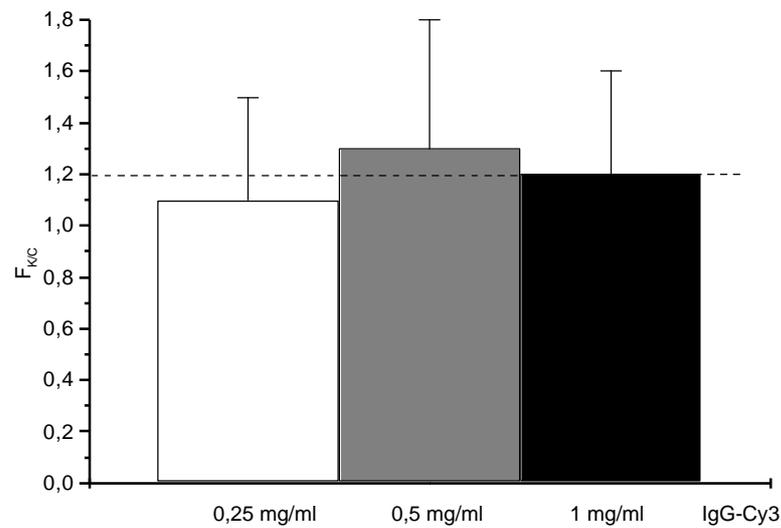
Eine Möglichkeit, die optische Kontamination der Fluoreszenzintensität im Kern durch die Fluoreszenzintensität des Cytoplasma zu umgehen, ist die Aufnahme der Zellen über CLSM. Da bei dieser Art der Mikroskopie nur bestimmte Ebenen in der Zelle beleuchtet und damit gezielt zur Emission der Fluoreszenz angeregt werden können, ist es möglich, optische Schnitte durch die Zelle zu legen. Eine Verfälschung der Meßwerte durch die Fluoreszenz darüber oder darunter liegender Bereiche kann weitestgehend ausgeschlossen werden. Von dieser Aufnahmeweise wurde jedoch wegen fehlender Dauerverfügbarkeit eines CLSM und der bei Serienexperimenten von bis zu 50 Zellen viel zu zeitraubenden Aufnahmetechnik bei den Mikroinjektionsexperimenten kein Gebrauch gemacht.

## **2.5 Einfluß der Konzentration der injizierten Proben auf $F_{K/C}$ bei nicht kerngängigen Proben**

Um den Einfluß der Konzentration einer injizierten Probe auf die unter *Ergebnisse 2.4* beschriebene optische Kontamination und damit auf  $F_{K/C}$  einer injizierten Probe, die nicht kerngängig ist, verstehen zu lernen, wurde Cy3-markiertes IgG (IgG-Cy3) in unterschiedlichen Konzentrationen (1, 0,5 und 0,25 mg/ml) in das Cytoplasma von Vero-Zellen injiziert. Die Zellen wurden unmittelbar nach der Injektion fixiert. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop. Ausgewertet wurden jeweils 2 Experimente pro Ansatz auf die unter *Material und Methoden 5.7* und *Ergebnisse 2.1* beschriebenen Art und Weise.

In Abbildung 16 ist das Ergebnis eines exemplarischen Experiments dargestellt. Es zeigt die  $F_{K/C}$ -Werte von IgG-Cy3 nach Injektion dreier Konzentrationen an IgG-Cy3.

Eine Abhängigkeit der optischen Kontamination von der eingesetzten Konzentration an Probe war demnach nicht zu beobachten. Die Auswertung ergab, daß die  $F_{K/C}$ -Werte unabhängig von der injizierten Konzentration bei einem Wert um 1,2 lagen. Die Gesamt-Fluoreszenzintensität einer Zelle, die sich als abhängig von der Konzentration der injizierten Probe erwies, scheint somit keinen Einfluß auf den  $F_{K/C}$ -Wert zu haben.



**Abbildung 16:  $F_{K/C}$  in Abhängigkeit von der injizierten Konzentration an IgG-Cy3**

Das Cy3-markierte IgG (IgG-Cy3) wurde in unterschiedlichen Konzentrationen (1, 0,5 und 0,25 mg/ml) bei RT in das Cytoplasma von Vero-Zellen mikroinjiziert (s. *Material und Methoden 5*). Unmittelbar nach der Injektion wurden die Zellen in PFA fixiert. Die Fluoreszenz wurde mit einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop detektiert. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten und die Berechnung der  $F_{K/C}$ -Werte erfolgte wie unter *Material und Methoden 5.7* und *Ergebnisse 2* beschrieben.

### 3 Charakterisierung der Proben für Mikroinjektion und Import-Assay

Bei der Charakterisierung der verwendeten Proben wurde der Fokus auf rC $\alpha$ myr gelegt. Um eine konstante Qualität des Enzyms zu gewährleisten, wurde es Kontrollen unterworfen, anhand derer das Protein charakterisiert werden konnte. Es wurden co- und posttranslationale Modifikationen wie Myristylierung und Phosphorylierungen kontrolliert. Außerdem wurde der Einfluß der Cy3-Farbstoffmarkierung auf Eigenschaften des Enzyms untersucht sowie das Diffusionsverhalten von rC $\alpha$ myr und von Kontrollproteinen miteinander verglichen.

#### 3.1 Bestimmung des Phosphorylierungsgrades über Kationenaustauscher-Chromatographie (Mono-S)

Die Myristylierung von rC $\alpha$ myr wurde durch Coexpression der C $\alpha$ -Untereinheit und N-Myristyltransferase erreicht (s. *Material und Methoden* 4.1). Durch Mono-S-Chromatographie des über PKI(5-24)-Affinitätschromatographie vorgereinigten myristylierten Enzyms konnte eine weitere Reinigung des Enzyms erzielt werden. Des Weiteren stellte der Reinigungsschritt eine Möglichkeit dar zu überprüfen, ob die cotranslationale Myristylierung erfolgt war. Eine Trennung nach Ladung und damit nach Phosphorylierungsstufen war bisher nur bei nicht myristylierter C $\alpha$ -Untereinheit möglich. Für diese war gezeigt worden, daß sie, anders als native, aus Gewebe isolierte C-Untereinheit nicht nur an den Resten Serin 338 und Threonin 197 phosphoryliert vorliegt, sondern auch Phosphatgruppen an Serin 10 und Serin 139 tragen kann [Herberg *et al.* 1993].

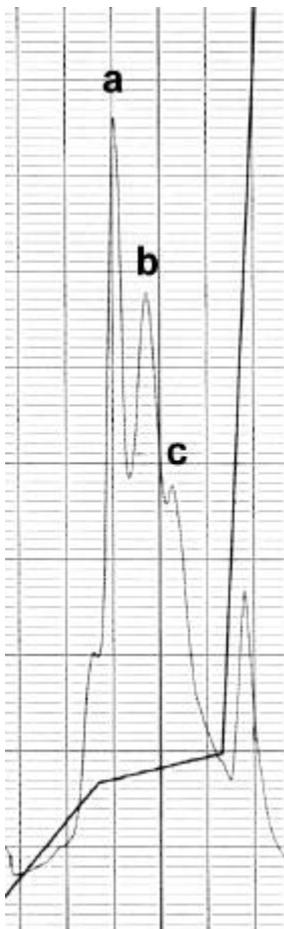
In der Regel gelang die Trennung von rC $\alpha$ myr in Formen unterschiedlichen Phosphorylierungsgrades mittels der Mono-S-Chromatographie nicht. Das Enzym eluierte bei 1 M Lithiumchlorid in einer Peakfraktion. Nur mit einem bestimmten Exemplar einer Mono-S-Säule gelang es, rC $\alpha$ myr während des Gradientenlaufs in die sich durch den Phosphorylierungsgrad unterscheidenden Enzymformen zu trennen. Was diese Säule von den anderen verwendeten Mono-S-Säulen unterscheidet, ist unbekannt. Mit dieser Säule ließ sich allerdings für myristyliertes Enzym nicht die Trennqualität erreichen, wie sie mit anderen Mono-S-Säulen für nicht myristylierte C $\alpha$ -Untereinheit erzielt wurde.

In Abbildung 17 ist ein typisches Elutionsprofil eines Mono-S-Chromatographielaufs unter Verwendung dieses Säulenexemplars mit rC $\alpha$ myr gezeigt. Die Reihenfolge im Auftreten der Fraktionen deckt sich mit dem abnehmenden Grad der Phosphorylierung der Enzymspezies wie durch massenspektrometrische Analyse (*Ergebnis* 3.2) gezeigt werden konnte. Dem Profil nach zu urteilen, liegt das Enzym überwiegend dreifach (T 197, S 338, S 10) (Peak b, Abb. 17) und vierfach (T 197, S 139, S 10, S 338) (Peak a, Abb. 17) phosphoryliert vor.

Nativem Enzym entsprechendes zweifach phosphoryliertes rC $\alpha$ myr (T 197, S 338) ist nur gering vertreten (Peak c, Abb. 17). Das entspricht auch dem Phosphorylierungsmuster des nicht myristylierten Enzyms [Girod 1997]. Es ist somit anzunehmen, daß die Myristylierung keinen entscheidenden Einfluß auf das Phosphorylierungsmuster hat. Dieses Ergebnis widerspricht jedoch den Beobachtungen von Girod [Girod 1997] an rC $\alpha$ myr aus Rind, die auch in dieser Arbeit verwendet wurde, und von Duronio *et al.* (1990) an rC $\alpha$ myr aus Maus [Duronio *et al.* 1990], daß sich durch die Myristylierung der Anteil mehr als zweifach phosphorylierten Enzyms zugunsten des zweifach phosphorylierten verringert.

Da, wie bereits erwähnt, der Grund für die hohe Trennleistung dieser speziellen Mono-S-Säule nicht bekannt war, hätte die Eigenschaft dieser Säule unwiederbringlich verloren gehen können. Um zu gewährleisten, daß über die gesamten Versuchsreihen gleichartige Probe zur Verfügung stand, wurde daher das nicht getrennte Gemisch für die durchgeführten Experimente verwendet.

Dies ist vor dem Hintergrund zu sehen, daß rC $\alpha$ myr nicht eingefroren werden kann, ohne an Aktivität zu verlieren, und bei 4 °C nur für 6 - 8 Wochen ohne größeren Aktivitätsverlust gelagert werden kann. Es war daher nicht möglich, alle Experimente mit Enzym der gleichen Präparation durchzuführen.



**Abbildung 17: Trennung unterschiedlich stark phosphorylierter Formen bakteriell exprimierter rC $\alpha$ myr durch Kationenaustauscherchromatographie** PKI(5-24)-affinitätsgereinigtes rC $\alpha$ myr wurde an eine Mono-S-FPLC-Säule (HR5/5) gebunden und mit einem Gradienten von 0 - 1 M LiCl eluiert (s. *Material und Methoden* 4.2.2).

Das Elutionsprofil zeigt drei Fraktionen, die über Massenspektrometrie untersucht wurden (*Ergebnisse* 3.2). Die Fraktion **a** enthält hauptsächlich eine vierfach phosphorylierte, Fraktion **b** eine dreifach phosphorylierte und Fraktion **c** eine zweifach phosphorylierte Form von rC $\alpha$ myr.

### 3.2 Bestimmung der Molekülmassen durch Massenspektrometrie

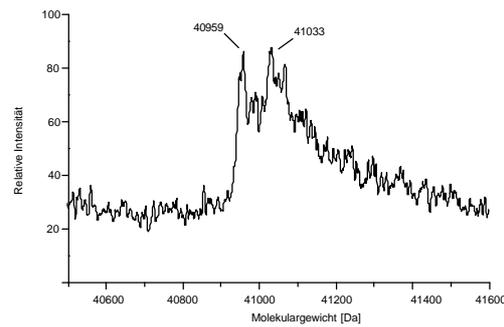
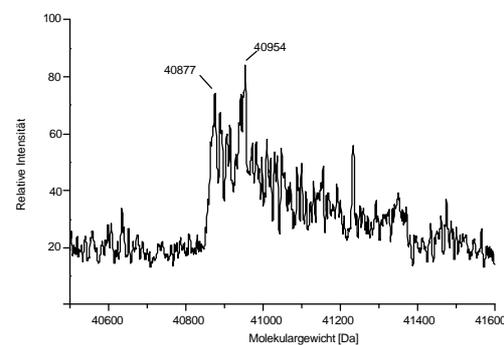
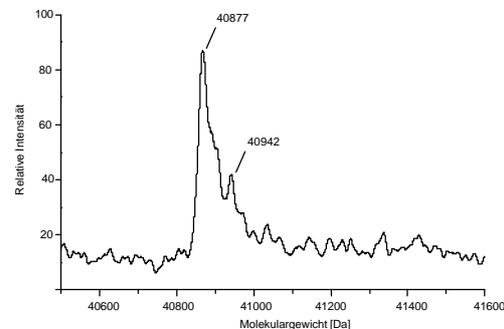
Eine weitere Möglichkeit zur Charakterisierung von rC $\alpha$ myr bot die bereits unter *Ergebnisse* 3.1 erwähnte Massenspektrometrie. Über das Molekulargewicht der exprimierten Proteine konnten Rückschlüsse auf deren Modifikationen, wie z.B. Phosphorylierungen, und auf die Degradation der C $\alpha$ -Untereinheit gezogen werden.

Dazu wurden Elutionsfraktionen der Mono-S-Ionenaustauscher-Chromatographie (Abb. 17) mittels ESI-Massenspektrometrie vermessen. Wie auch schon das Mono-S-Elutionsprofil (Abb. 17) vermuten läßt, kommt rC $\alpha$ myr anders als die native C $\alpha$ -Untereinheit nicht hauptsächlich nur zweifach, an den Resten Threonin 197 und Serin 338, phosphoryliert vor. Wie aus der Abbildung 18 hervorgeht, sind große Teile des Enzyms drei- und vierfach phosphoryliert. Das entspricht den gemachten Beobachtungen über das Vorkommen verschiedener Phosphorylierungsstufen für die rekombinante nicht myristylierte C $\alpha$ -Untereinheit aus Maus [Herberg *et al.* 1993; Yonemoto *et al.* 1993] oder die C $\alpha$ -Untereinheit bovinen Ursprungs [Girod 1997].

Es wurde sogar ein Molekulargewicht, das auf fünf Phosphorylierungen hindeutet, gemessen (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Position des fünften Phosphats konnte mittlerweile dem Aminosäurerest Serin 256 zugeordnet werden (persönliche Mitteilung, A. Schlosser, DKFZ).

Diese und andere massenspektrometrische Untersuchungen deuteten darauf hin, daß der Phosphorylierungsgrad von rC $\alpha$ myr mit zunehmender Expressionsdauer in *E. coli* zunahm. Um einen möglichst großen Anteil an zweifach phosphorylierter rC $\alpha$ myr zu bekommen, wurden die Expressionskulturen daraufhin nicht länger als 12 Stunden nach IPTG-Induktion inkubiert. Zur Gewinnung von rC $\alpha$ myr konstanter Qualität wurde versucht, die Expressionsdauer und die Expressionsbedingungen bei allen Expressionen gleichzuhalten.

Eine massenspektrometrische Analyse der Cy3-Farbstoffmarkierung von rC $\alpha$ myr-Cy3 gelang nicht.

**A****B****C**

### Abbildung 18: ESI-Massenspektrometrische Analyse von Fraktionen der Mono-S-Chromatographie von rC $\alpha$ myr

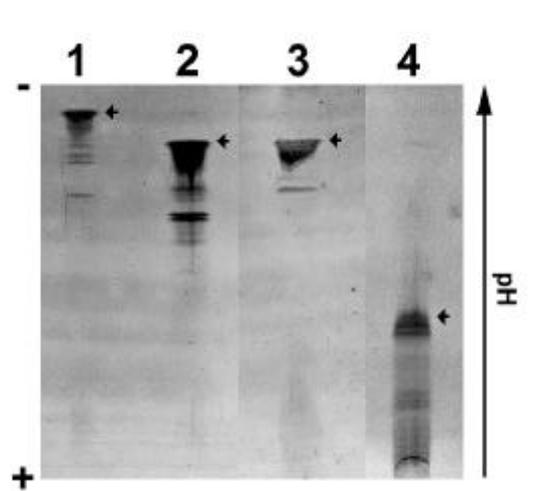
Die MS-Messung wurden von Herrn W. D. Lehmann und Herrn A. Schlosser (DKFZ, Heidelberg), wie in der Bildunterschrift 9 beschrieben durchgeführt. Die Nebenpeaks könnten z.B. durch Addukte hervorgerufen worden sein.

**A:** Fraktion a aus Abb. 17: vierfach (gemessenes Mr: 41033 Da; theoretisches Mr: 41018 Da) und dreifach phosphorylierte Form von rC $\alpha$ myr (gemessenes Molekulargewicht: 40959 Da; theoretisches Molekulargewicht: 40938 Da); **B:** Fraktion b aus Abb. 17: dreifach (gemessenes Molekulargewicht: 40954 Da; theoretisches Molekulargewicht: 40938 Da) und zweifach phosphorylierte Form von rC $\alpha$ myr (gemessenes Molekulargewicht: 40877 Da; theoretisches Molekulargewicht: 40858 Da); **C:** Fraktion c aus Abb. 17: hauptsächlich zweifach (gemessenes Molekulargewicht: 40877 Da; theoretisches Molekulargewicht: 40864 Da) und in geringen Mengen dreifach phosphorylierte Form von rC $\alpha$ myr (gemessenes Molekulargewicht: 40942 Da; theoretisches Molekulargewicht: 40938 Da).

### 3.3 Isoelektrische Fokussierung

Außer über Mono-S-Chromatographie und Massenspektrometrie waren indirekt über isoelektrische Fokussierung (IEF) Informationen über Myristylierung und Grad der Phosphorylierung der C $\alpha$ -Untereinheit zu erlangen. In Abbildung 19 ist ein isoelektrisches Fokussiergel abgebildet. Danach zeigt rC $\alpha$ myr (Spur 2; Abb. 19) das gleiche Fokussierungsverhalten wie die aus Rinderherz gewonnene C-Untereinheit (Spur 3; Abb. 19). Der isoelektrische Punkt von rC $\alpha$ myr unterschied sich dagegen deutlich von der nicht myristylierten, zweifach phosphorylierten C $\alpha$ -Untereinheit (Spur 1; Abb. 19). Zur Charakterisierung von rC $\alpha$ myr wurden das native und das nicht myristylierte Enzym als Kontrollen eingesetzt.

Zur Untersuchung des Translokationsverhaltens von rC $\alpha$ myr wurde fluoreszenzmarkiertes Enzym eingesetzt. Mit Hilfe von IEF wurde untersucht, ob der Fluoreszenzfarbstoff Cy3 Einfluß auf das Ladungsmuster von rC $\alpha$ myr nimmt. Die Fokussierung ergab, daß sich das Fokussierungsverhalten von rC $\alpha$ myr-Cy3 (Spur 4, Abb. 19) gegenüber dem nicht markierten Enzym (Spur 2, Abb. 19) durch die Markierung von rC $\alpha$ myr mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 veränderte. Die Einführung des Farbstoffs bedeutet einen negativen Ladungszuwachs für das Protein, wodurch das fluoreszenzmarkierte Protein in einem saureren pH-Bereich fokussiert. Diese Beobachtung stimmt mit der von Pepperkok et al. (2000) gemachten Beobachtung an Fluoreszein-markiertem Protein überein. Ein Einfluß der vom Fluoreszenzfarbstoff eingeführten negativen Ladungen auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr kann durch die Untersuchungen von Pepperkok et al. (2000) weitestgehend ausgeschlossen werden. Es wurde gezeigt, daß die Verteilung des Enzyms zwischen Kern und Cytoplasma unabhängig davon ist, ob dieses über direkte Markierung mit Fluoreszein oder Rhodamin oder über indirekte Immunfluoreszenz nachgewiesen wurde.



**Abbildung 19: Isoelektrische Fokussierung zur Charakterisierung von rCa myr**

Die IEF wurde wie in *Material und Methoden* 4.7 beschrieben durchgeführt. Die Proteinbanden wurden durch Coomassie-Färbung sichtbar gemacht. Die jeweilige Bande, in der sich die beschriebene Form des Enzyms befand, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Die Nebenbanden enthalten C-Untereinheiten anderen Phosphorylierungsgrades, mit anderen Phosphorylierungsmustern oder Abbauprodukte.

1: rekombinante C $\alpha$ -Untereinheit (rC $\alpha$ ) (zweifach phosphoryliert); 2: rekombinante myristylierte C $\alpha$ -Untereinheit (rC $\alpha$ myr) (Gemisch der Phosphorylierungsstufen); 3: natives Enzym aus Rind; 4: rC $\alpha$ myr mit Cy3-Markierung (rC $\alpha$ myr-Cy3).

### 3.4 Vergleichende Analyse von Dissoziationskonstanten mittels Resonant Mirror Affinographie

Über Resonant Mirror Affinographie konnten die Interaktionen zwischen der C $\alpha$ -Untereinheit und dem PKI(5-24)-Peptid gemessen werden. Aus den aufgenommenen Bindungskurven konnte die Dissoziationskonstante  $K_D$  berechnet werden, woraus Rückschlüsse auf die katalytische Aktivität gezogen werden konnten.

Es wurden vergleichende Untersuchungen an rC $\alpha$ myr und rC $\alpha$ myr-Cy3 bzw. rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R) durchgeführt. Das Ergebnis der Resonant Mirror Affinographie ist in Tabelle 1 zusammenfassend dargestellt.

Es zeigte sich, daß alle  $K_D$ -Werte der gemessenen Proben im unteren nanomolaren Größenordnungsbereich lagen. Dem Vergleich der  $K_D$ -Werte von nicht markiertem und von Cy3-markiertem rC $\alpha$ myr nach zu urteilen, scheint der Farbstofflabel Cy3 die Affinität zu dem Inhibitorpeptid PKI(5-24) und damit vermutlich auch die katalytische Aktivität der Kinase nicht wesentlich zu beeinträchtigen. Es ist nicht auszuschließen, daß der Unterschied zwischen den  $K_D$ -Werten von rC $\alpha$ myr und rC $\alpha$ myr-Cy3 in der unterschiedlichen Art und Weise der Bestimmung der Proteinkonzentration beider Proteine begründet liegt. Der Vergleich von Wildtyp rC $\alpha$ myr und rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R) zeigt, daß die Affinität von rC $\alpha$ myr

(H87Q/W196R) zu dem PKI-Peptid trotz ihres veränderten Bindungsverhaltens zu den R-Untereinheiten gegenüber der des Wildtyps nicht maßgeblich verändert war. Die diesbezüglich gemachten Beobachtungen von Orellana *et al.* (1992, Biochem 89)[Orellana und McKnight 1992] und Gibson *et al.* (1997) [Gibson *et al.* 1997] scheinen damit auch auf das in dieser Arbeit verwendete Enzym zuzutreffen.

	rC $\alpha$ myr	rC $\alpha$ myr-Cy3	rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)
K <sub>D</sub>	17 ± 1 nM	41 ± 6 nM	36 ± 13 nM

**Tabelle 1: Dissoziationskonstanten (K<sub>D</sub>) von rC $\alpha$ myr, rC $\alpha$ myr-Cy3 und rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)**

Vergleich der über Resonant Mirror Affinographie ermittelten Dissoziationskonstanten (K<sub>D</sub>) von rC $\alpha$ myr (WT) mit und ohne Cy3-Markierung und der C $\alpha$ -Doppelmutante rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R) gemessen an PKI(5-24) mit einem lasys Auto<sup>+</sup> (Affinity Sensors, UK).

Es wurden Enzymkonzentrationen von 0,5 - 200 nM in Gegenwart von 200  $\mu$ M ATP und 15 mM Magnesiumchlorid verwendet (s. *Material und Methoden* 4.9). Die angegebenen K<sub>D</sub>-Werte wurden aus den Ergebnissen des kinetischen und thermodynamischen Fits ermittelt. Die Resonant Mirror Affinographie-Messungen wurden in Zusammenarbeit mit Herrn T. Schneider (Abteilung Pathochemie, DKFZ, Heidelberg) durchgeführt.

### 3.5 Gelfiltrationschromatographie zum Vergleich des Diffusionsverhaltens von rC $\alpha$ myr mit dem anderer Proteine

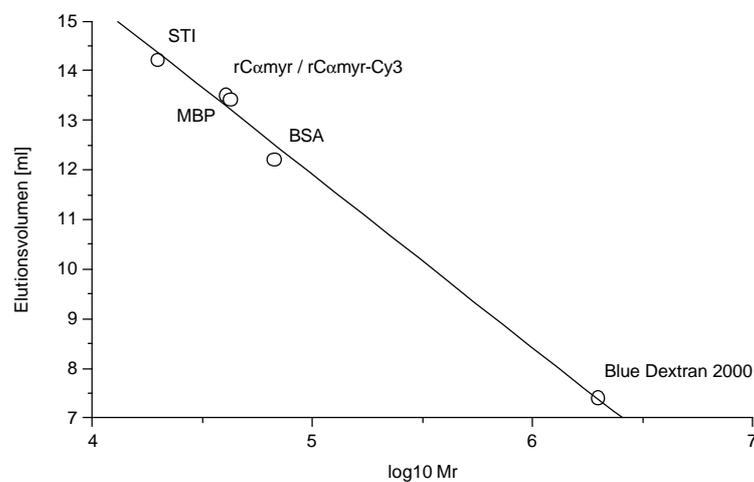
Im Verlauf der Untersuchung des Translokationsverhaltens von rC $\alpha$ myr über Mikroinjektionsexperimente zeigte sich die Notwendigkeit, eine dem rC $\alpha$ myr bezogen auf das Molekulargewicht und das Diffusionsverhalten ähnlichere Kontrolle als den Trypsininhibitor aus Sojabohnen (STI) zu finden. Das Molekulargewicht von STI beträgt 20 kDa und ist damit nur halb so hoch wie das von rC $\alpha$ myr.

Bei der Suche nach einer rC $\alpha$ myr ähnlicheren Diffusionskontrolle wurde das bakterielle Maltose-bindende Protein (MBP) in Betracht gezogen. MBP hat ein Molekulargewicht von 42,7 kDa und ist damit nur wenig größer als rC $\alpha$ myr (41 kDa). Zudem ist es wie rC $\alpha$ myr von globulärer Form [Bossemeyer *et al.* 1993; Spurlino *et al.* 1991]. Es wurde erwartet, daß beide Proteine ein ähnliches Diffusionsverhalten zeigen.

Um das zu überprüfen, wurde die Gelfiltrationschromatographie verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Formen biologischer Moleküle kann vom Molekulargewicht nicht direkt auf die effektive molekulare Größe und damit auf das Diffusionsverhalten geschlossen werden. Die Gelfiltrationschromatographie stellt ein Hilfsmittel dar, mit dem das Diffusionsverhalten

von Molekülen über ihre Elutionsvolumina oder ihre Retentionszeiten miteinander verglichen werden können.

Zunächst wurde das Laufverhalten der verwendeten Superose 10 HR10/30-Säule für diesen Zweck getestet. Dazu wurden BSA, STI, r $\alpha$ myr, r $\alpha$ myr-Cy3, MBP bzw. Blue Dextran 2000 auf die Gelfiltrationssäule aufgetragen und bei identischer Flußrate von 0,15 ml/min eluiert. Die Moleküle eluierten gemäß ihres Molekulargewichts: Die Moleküle größeren Molekulargewichts hatten eine kürzere Retentionszeit als die kleineren Molekulargewichts. Wie aus Abbildung 20 hervorgeht, korrelierte das Elutionsvolumen linear mit dem dekadischen Logarithmus der Molekulargewichte der verwendeten Moleküle.



**Abbildung 20: Lineare Korrelation des Elutionsvolumens gelfiltrationschromatographierter Proteine mit dem dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts (Mr)**

STI, r $\alpha$ myr, r $\alpha$ myr-Cy3, MBP, BSA und Blue Dextran 2000 wurden über eine Superose 10 HR10/30-Säule chromatographiert. Als Laufpuffer wurde PBS mit einer Flußrate von 0,15 ml/min eingesetzt. Der Schreibervorschub betrug 0,25 cm/ml. Die Elutionsvolumina wurden anhand des Schreiberausdrucks ermittelt. STI eluierte bei 14,2 ml, r $\alpha$ myr bei 13,6 ml (unabhängig von der Cy3-Markierung), MBP bei 13,4 ml, BSA bei 12,2 ml und Blue Dextran 2000 bei 3,7 ml (Ausschlußvolumen).

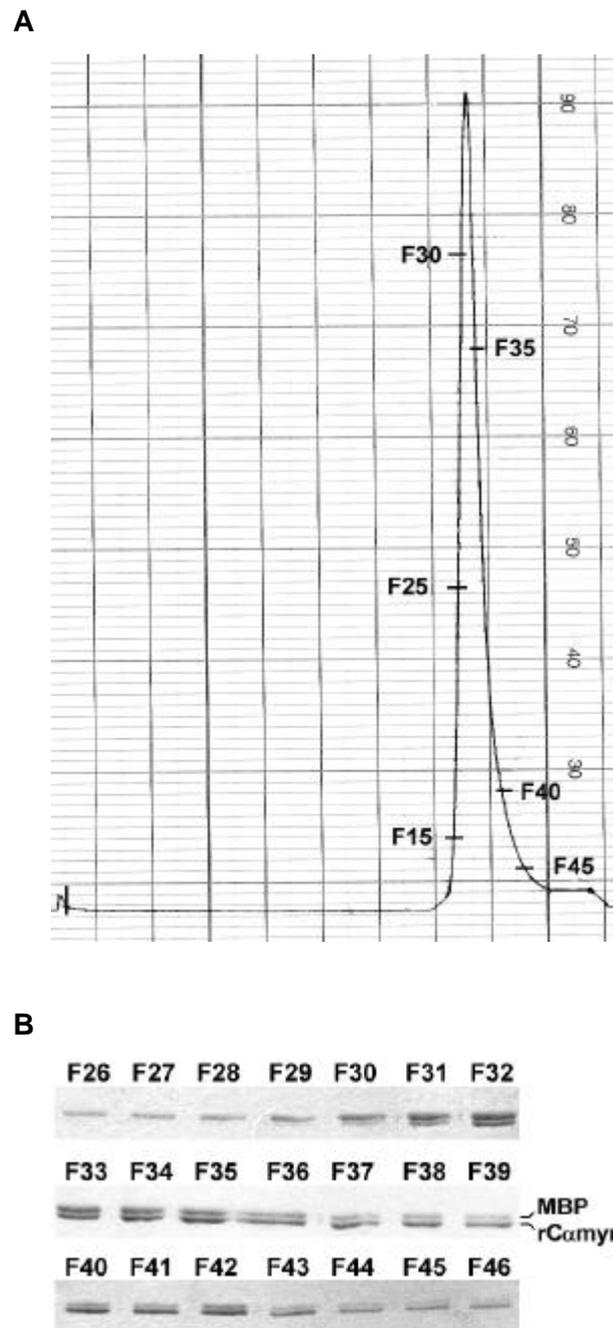
Wie der Vergleich der Elutionsvolumina zeigt, war das Elutionsverhalten von r $\alpha$ myr bzw. r $\alpha$ myr-Cy3 (Peakmaximum nach 13,6 ml) dem von MBP (Peakmaximum nach 13,4 ml) ähnlicher als dem von STI (Peakmaximum nach 14,2 ml). Das Diffusionsverhalten von r $\alpha$ myr bzw. r $\alpha$ myr-Cy3 ist folglich dem von MBP sehr viel ähnlicher als dem von STI.

Wurden MBP und rC $\alpha$ myr zusammen chromatographiert, wie in Abbildung 21A gezeigt ist, so eluierten sie in einer Peakfraktion. Die Analyse der Elutionsfraktionen der Gelfiltration zeigte im SDS-Gel (Abb. 21B), daß MBP und rC $\alpha$ myr gemäß ihres Molekulargewichts nur geringfügig versetzt eluiert wurden. Das Diffusionsverhalten der beiden globulären Proteine MBP und rC $\alpha$ myr kann als nahezu identisch bezeichnet werden. Da für MBP als bakterielles Protein ein aktiver Signal-vermittelter Transport in Eukaryontenzellen auszuschließen ist, stand mit MBP eine für die Untersuchungen des Translokationsverhaltens von rC $\alpha$ myr geeignete Diffusionskontrolle zur Verfügung.

In Abbildung 21A ist ein typisches Elutionsprofil der Gelfiltration eines Gemisches aus rC $\alpha$ myr und MBP dargestellt. Abbildung 21B zeigt die Coomassiefärbung der Elutionsfraktionen.

Des weiteren wurde untersucht, ob das Diffusionsverhalten von rC $\alpha$ myr durch Fluoreszenzmarkierung mit Cy3 verändert wurde. Es zeigte sich, daß dies nicht der Fall war.

Das Elutionsverhalten von rC $\alpha$ myr und von der fluoreszenzmarkierten Form rC $\alpha$ myr-Cy3 auf der Gelfiltrationssäule war identisch (Abb. 20). Der Fluoreszenzfarbstoff wirkt sich demnach nicht auf das Diffusionsverhalten von rC $\alpha$ myr aus.



**Abbildung 21: Vergleich des Diffusionsverhaltens von rC $\alpha$ myr und MBP über Gelfiltrationschromatographie**

rC $\alpha$ myr (180  $\mu$ g) und MBP (120  $\mu$ g) wurden zusammen über eine Superose 10HR10730-Säule chromatographiert. Als Laufpuffer wurde PBS verwendet. Die Flußrate betrug 0,1 ml/min, der Schreibervorschub 0,25 cm/ml. Es wurden während des Laufes 50 und 100  $\mu$ l Fraktionen gesammelt.

**A:** Chromatogramm der Gelfiltration des Gemisches aus rC $\alpha$ myr und MBP. Die Fraktionen 15, 25, 30, 35, und 40 wurden in das Chromatogramm eingezeichnet.

**B:** Analyse der Elutionsfraktionen F 26 – F 46 der Gelfiltration eines Gemisches aus rC $\alpha$ myr und MBP (Abb. 21A) in SDS-Gelen.

## 4 Untersuchungen zur Kern-Cytoplasma-Translokation von rC $\alpha$ myr

Harootunian *et al.* postulierten 1993 [Harootunian *et al.* 1993], daß die C $\alpha$ -Untereinheit der PKA zwischen Cytoplasma und Kern diffundieren kann. Ein Jahr später wurde beobachtet, daß die C $\alpha$ -Untereinheit durch den Proteinkinase-Inhibitor PKI auch aktiv aus dem Kern exportiert werden kann [Fantozzi *et al.* 1994]. Untersuchungen der Abteilung in Kooperation mit Herrn R. Pepperkok ergaben, daß Unterschiede in der interzellulären Verteilung des Enzyms in Abhängigkeit von posttranslationalen Modifikationen beobachtet werden können [Girod 1997; Pepperkok *et al.* 2000].

Vor diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit überprüft, ob die Translokation von rC $\alpha$ myr in den Kern mit dem Modell der Diffusion ausreichend erklärt ist oder ob andere Mechanismen die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr beeinflussen. Zur Untersuchung der Translokation von rC $\alpha$ myr und ihrer Charakteristika wurden Mikroinjektionsexperimente an Vero-Zellen (s. *Ergebnisse* 4.1) und später auch Import-Assays an permeabilisierten HeLa-Zellen (s. *Ergebnisse* 4.2) durchgeführt.

### 4.1 Untersuchungen zur Kern-Cytoplasma-Translokation von rC $\alpha$ myr in Mikroinjektionsexperimenten

In den Mikroinjektionsexperimenten wurde der Translokationsmechanismus von rC $\alpha$ myr analysiert. Dazu wurde der Einfluß verschiedener Parameter wie Molekülgröße, N-Terminus von rC $\alpha$ myr, Temperatur, Energie, freie Verfügbarkeit von Bindungsstellen am Kernporenkomplex (NPC), NLS, katalytische Aktivität und aktiver Export auf die Kern-Cytoplasma-Translokation von rC $\alpha$ myr untersucht. Die daraus resultierende intrazelluläre Verteilung wurde mit den entsprechenden Daten von Kontrollproteinen für Diffusion oder aktiven Import verglichen.

#### 4.1.1 Vergleich der intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr mit der von Kontrollproteinen

In einem ersten Schritt wurde die intrazelluläre Verteilung von Cy3-markiertem rC $\alpha$ myr (rC $\alpha$ myr-Cy3) mit der anderer fluoreszenzmarkierter Moleküle mit bekannten Translokationsmodi quantitativ verglichen. Der Vergleich der Höhe der im Mittel erreichten  $F_{KC}$ -Werte sollte Hinweise auf den Mechanismus der Kern-Cytoplasma-Translokation geben. Als Kontrollmoleküle für den Kernausschluß wurde Cy3-markiertes Immunglobulin G (IgG-Cy3) und RITC-markiertes Dextran 70S (RITC-Dextran 70S) eingesetzt. Beide können aufgrund ihres Molekulargewichts (IgG-Cy3: 150 kDa; RITC-Dextran 70S: 70 kDa) und ihrer Form nicht passiv durch die Kernporen diffundieren. Sie werden in Ermangelung eines NLS

nicht aktiv in den Kern importiert und verbleiben deshalb im Cytoplasma. Für die Diffusion wurden der Trypsininhibitor aus Sojabohnen (STI) [Breeuwer und Goldfarb 1990; Dabauvalle *et al.* 1988; Peters 1986] und das bakterielle Maltose-bindende Protein (MBP) als Kontrollen ausgewählt. STI ist mit seinem Molekulargewicht von 21 kDa nur etwa halb so groß wie rC $\alpha$ myr, während MBP mit 42,7 kDa etwas größer ist als rC $\alpha$ myr. Sowohl STI als auch MBP waren Cy3-markiert. Als Positivkontrolle für den aktiven Import wurde FLUOS-markiertes BSA (66 kDa), an das mehrere NLS-Peptide gekoppelt worden waren (FL-BSA-NLS), verwendet. Sein Kernimport verläuft über den klassischen NLS-vermittelten Weg [Yoneda *et al.* 1987].

Die fluoreszenzmarkierten Proben wurden in das Cytoplasma von Vero-Zellen injiziert. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen fixiert. Die Fluoreszenz wurde im herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop detektiert, mit einer CCD-Kamera digitalisiert und anschließend quantifiziert. Die angegebenen  $F_{K/C}$ -Werte geben den Mittelwert der in bis zu 50 Einzelzellen bestimmten Kern-Cytoplasma-Verteilungsverhältnisse der eingesetzten Proben an.

In Abbildung 22A sind die mittleren  $F_{K/C}$ -Werte von rC $\alpha$ myr-Cy3 und der Kontrollmoleküle graphisch dargestellt. In Abbildung 22B sind Aufnahmen von Vero-Zellen mit typischer Verteilung der fluoreszenzmarkierten Proben gezeigt.

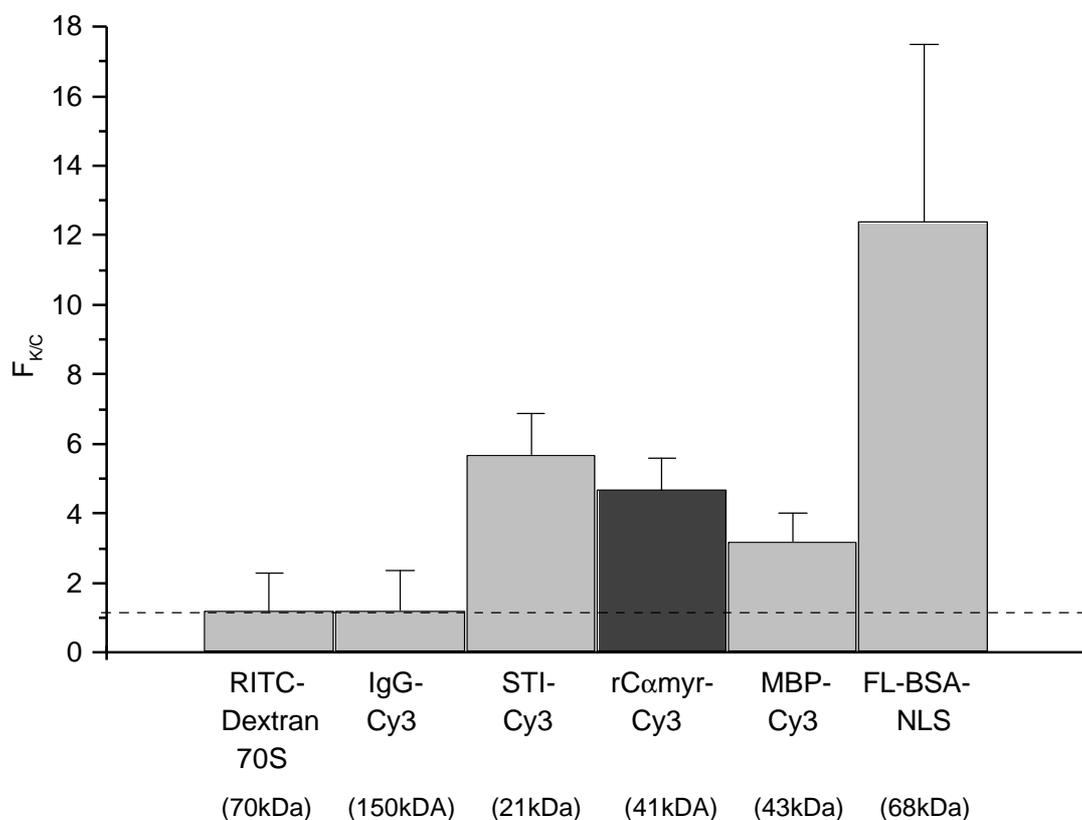
Wie aus den Abbildungen hervorgeht, unterscheidet sich die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 deutlich von der der Kontrollen für den Kernausschluß. Während IgG-Cy3 (Abb. 22B b) und RITC-Dextran 70S (Abb. 22B a) im Cytoplasma verbleiben, kann im Falle von rC $\alpha$ myr-Cy3 eindeutig Fluoreszenz in Cytoplasma und Kern nachgewiesen werden (Abb. 22B d). Das drückt sich auch in den ermittelten  $F_{K/C}$ -Werten aus. Die mittleren  $F_{K/C}$ -Werte von IgG-Cy3 und RITC-Dextran 70S liegen in einem Bereich um 1,2 (s. *Ergebnisse* 2.4). rC $\alpha$ myr-Cy3 erreicht dagegen nach 30-minütiger Inkubation einen  $F_{K/C}$ -Wert von  $4,7 \pm 0,9$  und liegt damit wesentlich darüber.

Ein deutlicher Unterschied ist auch beim Vergleich der intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 und FL-BSA-NLS zu erkennen. Der mittlere  $F_{K/C}$ -Wert von FL-BSA-NLS ist wesentlich höher als der sich im Mittel bei rC $\alpha$ myr-Cy3 und den anderen Kontrollen ergebende  $F_{K/C}$ -Wert. Die auffallend hohen  $F_{K/C}$ -Werte gründen darin, daß sich bei FL-BSA-NLS kein Verteilungsgleichgewicht zwischen Kern und Cytoplasma einstellt, sondern daß es zu einer Akkumulation des gesamten FL-BSA-NLS im Kern kommt (Abb. 22B f). Eine Rückkehr von FL-BSA-NLS in das Cytoplasma ist ohne NES weder über aktiven Export noch aufgrund seiner Größe von mehr als 60 kDa über Diffusion möglich. Die für das Cytoplasma gemessene Intensität liegt dabei nur etwas über dem Fluoreszenzhintergrund, so daß der Wert für  $F_{K/C}$  direkt von der injizierten Konzentration an FL-BSA-NLS abhängt.

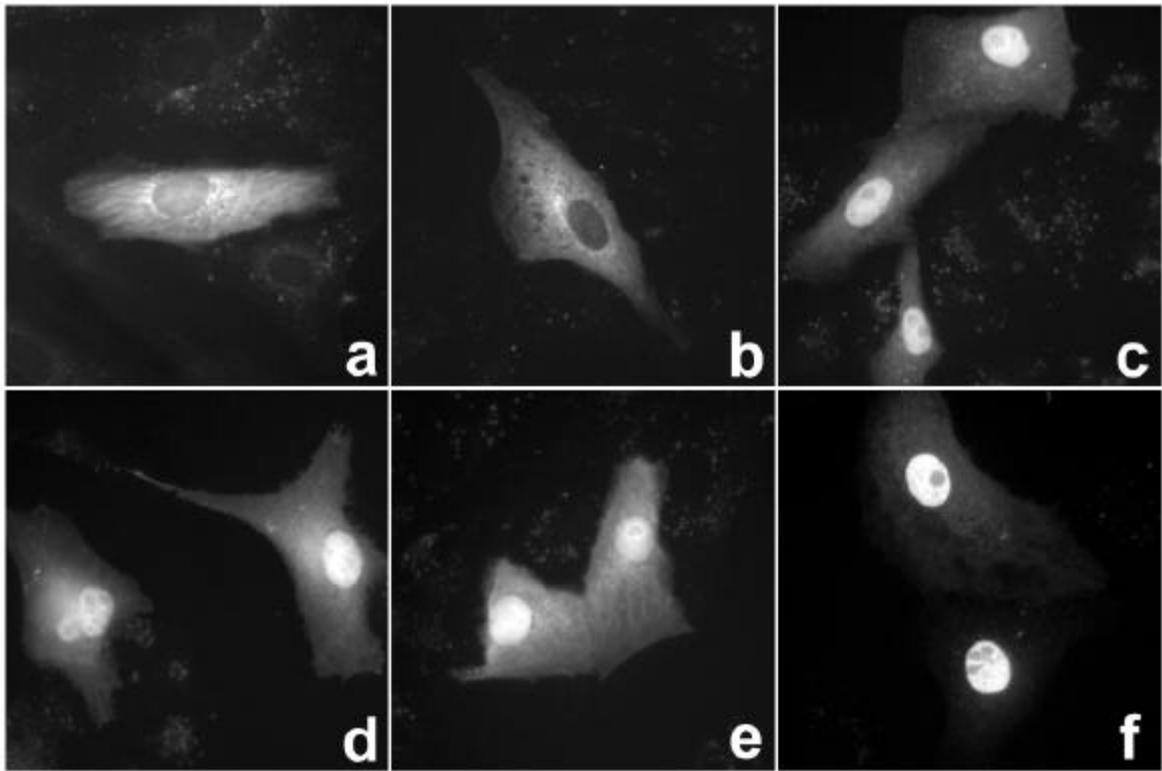
Erstaunlicherweise war die Verteilung der beiden Diffusionskontrollen STI-Cy3 und MBP-Cy3 voneinander verschieden. Während STI-Cy3 zumindest teilweise im Kern zu akkumulieren scheint (Abb. 22B c), ergab sich für MBP-Cy3 (Abb. 22B e) eine gleichmäßige Verteilung zwischen Kern und Cytoplasma. Der nach Mikroinjektion von STI-Cy3 im Mittel erreichte Wert für  $F_{K/C}$  lag nach 30-minütiger Inkubation um 50 % über dem nach Injektion von MBP-Cy3. Es zeigte sich, daß r $\alpha$ myr-Cy3 weder der Verteilung von MBP-Cy3 noch der von STI-Cy3 entsprach. Der  $F_{K/C}$ -Wert von r $\alpha$ myr liegt im Mittel zwischen den für die beiden Diffusionskontrollen ermittelten Verteilungsverhältnisse.

Der Vergleich der Verteilung und der ermittelten  $F_{K/C}$ -Werte erlaubt somit noch keine Aussage über den möglichen Transportmechanismus von r $\alpha$ myr. Es kann lediglich angemerkt werden, daß sich von den eingesetzten Kontrollen MBP-Cy3 und STI-Cy3 dem r $\alpha$ myr-Cy3 am ähnlichsten verhalten haben.

## A



## B



**Abbildung 22: Vergleich der intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 in Vero-Zellen mit der von fluoreszenzmarkierten Kontrollmolekülen**

Für die Mikroinjektionsexperimente wurden Vero-Zellen auf Deckgläschen ausplattiert und für 24 Stunden kultiviert. Die Mikroinjektionen wurden in gekühltem HEPES-gepuffertem Medium mit einer halbautomatischen Mikroinjektionsapparatur von Zeiss durchgeführt. Die Mikroinjektionsproben RITC-Dextran 70 S, IgG-Cy3, STI-Cy3, rC $\alpha$ myr-Cy3, MBP-Cy3 bzw. FL-BSA-NLS wurden zusammen mit 5 mM cAMP und 1 mM DTT in das Cytoplasma von Vero-Zellen injiziert. Die Konzentration der injizierten Proben betrug 1 mg/ml mit Ausnahme der von FL-BSA-NLS, das in einer Konzentration von 2 mg/ml eingesetzt wurde. Unmittelbar nach der Mikroinjektion wurden die Zellen in Medium mit 5 mM 8-Br-cAMP 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend mit PFA fixiert. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop.

Die gestrichelte Linie bei der Darstellung der Ergebnisse zeigt den Korrekturfaktor von 1,2 an, um den die ermittelten  $F_{K/C}$ -Werte eigentlich korrigiert werden müßten, um dem Effekt der optischen Kontamination gerecht zu werden (s. *Ergebnisse 2.4*).

**A:**  $F_{K/C}$ -Werte der Mikroinjektionsproben nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C in Vero-Zellen. Die  $F_{K/C}$ -Werte wurde, wie unter *Material und Methoden 5.7* und *Ergebnisse 2* beschrieben, bestimmt.

**B:** Lokalisation von RITC-Dextran 70 S (**a**), IgG-Cy3 (**b**), STI-Cy3 (**c**), rC $\alpha$ myr-Cy3 (**d**), MBP-Cy3 (**e**) und FL-BSA-NLS (**f**) in Vero-Zellen nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C.

#### 4.1.2 Translokationsstudien mit C $\alpha$ -Fusionsproteinen

##### Intrazelluläre Verteilung des C $\alpha$ -b-Galaktosidase-Fusionsproteins in Vero-Zellen

Eine Möglichkeit, relativ schnell einen Hinweis darauf zu bekommen, ob ein Protein durch Diffusion oder aktiven Import in den Zellkern gelangt, besteht darin, sein Molekulargewicht soweit zu vergrößern, daß es nicht mehr über Diffusion in den Kern gelangen kann. Es bleibt vom Kern ausgeschlossen. Sollte das vergrößerte Protein dennoch im Kern nachgewiesen werden können, so muß es aktiv dorthin importiert werden sein. Die Ausschlußgrenze für Moleküle, die noch passiv über Diffusion in den Kern gelangen können, wird mit 40 - 60 kDa angegeben [Schulz und Peters 1986]. rC $\alpha$ myr liegt mit 41 kDa demnach noch in dem für Diffusion möglichen Molekulargewichtsbereich.

Um das Molekulargewicht von rC $\alpha$ myr über diese Größenausschußgrenze zu bringen, wurde ein 158 kDa großes C $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsprotein hergestellt (s. *Ergebnisse* 1.2). Das Cy3-markierte C $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsprotein wurde in das Cytoplasma von Vero-Zellen injiziert. Nach Inkubation der Zellen für 10 bzw. 30 Minuten bei 37°C wurden diese fixiert. Die Auswertung des Experiments erfolgte nach der unter *Material und Methoden* 5.7 und *Ergebnisse* 2 beschriebenen Weise.

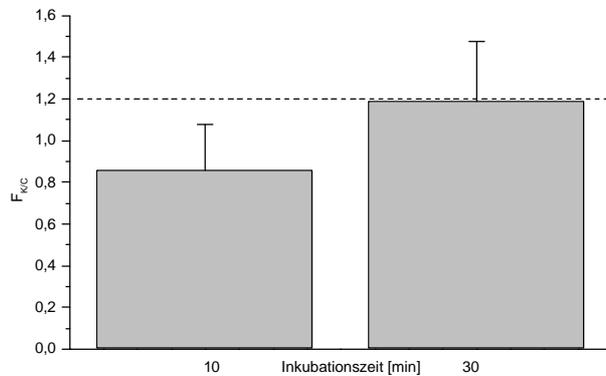
Es wurde nachgewiesen, daß das C $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsprotein vom Kern ausgeschlossen bleibt. Dies war bereits bei der Betrachtung der Zellen im Fluoreszenzmikroskop festzustellen. Die quantitative Auswertung der digitalen Aufnahmen bestätigte dies. Während rC $\alpha$ myr-Cy3 einen  $F_{K/C}$ -Wert um 5 erreicht (Abb. 22), führte eine Fusion zu einem  $F_{K/C}$ -Wert von unter 1,2 (Abb. 23). Ein  $F_{K/C}$ -Wert von 1,2 war bereits unter *Ergebnisse* 2.4 als Kernausschluß festgelegt worden.

Die Verteilung des C $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsproteins in Vero-Zellen entsprach der von Molekülen wie z.B. IgG (Abb. 22B b), die aufgrund ihres hohen Molekulargewichts und eines fehlenden Kernlokalisationssignals vom Kern ausgeschlossen werden.

Dieses Ergebnis bestätigt die von Harootunian *et al.* gemachten Beobachtungen mit einem GST-C $\alpha$ -Fusionsprotein [Harootunian *et al.* 1993], das ebenfalls vom Kern ausgeschlossen blieb. Bei dem von Harootunian *et al.* verwendeten Fusionsprotein lag, anders als bei dem Fusionsprotein in dieser Arbeit, eine Fusion über den N-Terminus der C $\alpha$ -Untereinheit vor. Die Möglichkeit, daß ein aktiver Import durch diese Blockierung des N-Terminus verhindert werden könnte, kann durch die hier gezeigten Ergebnisse jedoch verworfen werden.

Dieses Experiment gibt einen starken Hinweis darauf, daß rC $\alpha$ myr nicht Signal-vermittelt in den Kern importiert wird. Es kann jedoch nicht endgültig ausgeschlossen werden, daß rC $\alpha$ myr aktiv in den Kern importiert werden kann. Die Möglichkeit, daß rC $\alpha$ myr ein

fakultatives NLS besitzt, daß unter anderen als den hier gewählten Bedingungen und eventuell erst im Zusammenspiel mit anderen Faktoren aktiviert bzw. exponiert wird, bleibt bestehen.



#### Abbildung 23: Verteilung des Ca-b-Galaktosidase-Fusionsproteins in Vero-Zellen

$F_{K/C}$  von Cy3-markiertem  $C\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase-Fusionsprotein nach 10 und 30-minütiger Inkubation bei 37 °C in Vero-Zellen. Die Mikroinjektionsexperimente wurden, wie in *Ergebnisse* 4.1.1 angegeben, durchgeführt und ausgewertet.

#### Intrazelluläre Verteilung des Ca(1-40)-GST-Fusionsproteins in Vero-Zellen

Kernlokalisierungssignale wie das ‚klassische‘ NLS, das zuerst beim Simianvirus 40 großen T-Antigen gefunden wurde, bestehen aus einer kurzen Sequenz basischer Aminosäurereste.

Das Vorkommen eines solchen Clusters basischer Aminosäuren kann ein Hinweis auf aktiven Signal-vermittelten Import sein. Der N-Terminus der  $C\alpha$ -Untereinheit mit Myristylierungsmotiv und amphipatischer  $\alpha$ -Helix enthält eine Reihe basischer Aminosäuren (AS (6-28): **AKKGS EQSVK EFLAK AKEDF LKK**).

Um zu überprüfen, ob diesem eine Signalfunktion beim Kernimport zukommt, wurde ein Fusionsprotein aus den ersten 40 Aminosäuren der  $C\alpha$ -Untereinheit und Glutathion-S-Transferase (GST) hergestellt (s. *Ergebnisse* 1.3). Als Kontrolle wurde Cy3-markiertes GST (GST-Cy3), von dem bekannt ist, daß es zwischen Kern und Cytoplasma diffundiert, allein injiziert. Ein Vergleich der intrazellulären Verteilung beider Proteine nach Mikroinjektion in das Cytoplasma von Vero-Zellen sollte Auskunft über das Vorhandensein eines NLS im N-Terminus von r $C\alpha$ myr geben.

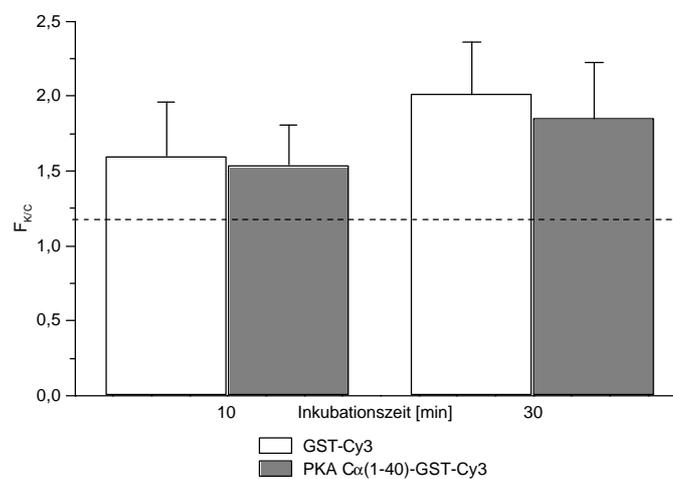
In Abbildung 24 ist das Ergebnis des Experiments quantitativ ausgewertet (24A) und an Vero-Zellen (24B) exemplarisch gezeigt.

Wie aus Abbildung 24A hervorgeht, sind die  $F_{K/C}$ -Werte beider Proteine unabhängig von der Inkubationszeit nahezu identisch. Das Fusionsprotein (Abb. 24B a) verhält sich wie das passiv durch Diffusion in den Kern gelangende GST (Abb. 24B b).

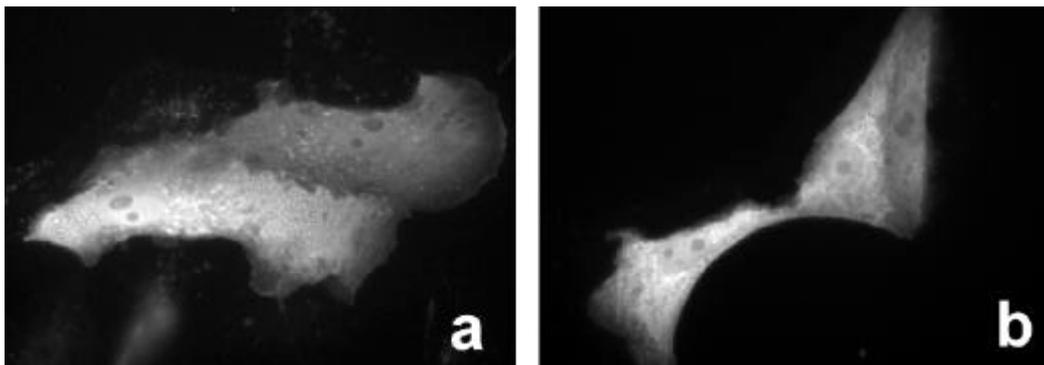
Diesem Experiment nach zu urteilen, stellt die Sequenz basischer Aminosäuren des N-Terminus von rC $\alpha$ myr kein NLS für den aktiven Import dar. Zudem scheinen im Fusionsprotein weder Myristylsäure noch amphipatische A-Helix einen Einfluß auf die Translokation von GST zu haben.

Auffällig ist, daß das Verhältnis  $F_{K/C}$  des fluoreszenzmarkierten Fusionsproteins im Mittel deutlich geringere Werte erreicht als das des intakten rC $\alpha$ myr-Cy3.

### A



### B



#### Abbildung 24: Einfluß des N-Terminus von rC $\alpha$ myr auf das Translokationsverhalten von GST-Cy3

In Vero-Zellen wurde GST-Cy3 bzw. Cy3-gekoppeltes C $\alpha$ (1-40)-GST-Fusionsprotein (C $\alpha$ -GST-Cy3) in Mikroinjektionspuffer mit 5mM cAMP und 1 mM DTT injiziert. Unmittelbar nach der Injektion wurden die Zellen in Medium mit 5 mM 8-Br-cAMP für 10 bzw. 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend fixiert. Die Mikroinjektionsexperimente wurden, wie in *Ergebnisse* 4.1.1 angegeben, durchgeführt und ausgewertet.

**A:**  $F_{K/C}$  von GST-Cy3 bzw. C $\alpha$ (1-40)-GST-Cy3 nach 10- und 30-minütiger Inkubation

**B:** Lokalisation von GST-Cy3 (**a**) bzw. C $\alpha$ (1-40)-GST-Cy3 (**b**) in nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C fixierten Vero-Zellen. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop.

#### 4.1.3 Einfluß der Temperatur auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr und Kontrollproteinen in Vero-Zellen

Nach bisherigen Vorstellungen läßt sich der aktive Transport von Molekülen in den Zellkern im Gegensatz zu passiver Diffusion durch Erniedrigung der Temperatur blockieren [Richardson *et al.* 1988; Schulz und Peters 1987]. Aus diesem Grund wurde das Translokationsverhalten der zu untersuchenden Moleküle bei Temperaturniedrigung als Kriterium für die Bestimmung ihrer Translokationsmechanismen herangezogen.

Zur Aufklärung des Translokationsmechanismus von rC $\alpha$ myr wurde die intrazelluläre Verteilung des Enzyms im Hinblick auf eine mögliche Beeinträchtigung durch Erniedrigung der Temperatur überprüft und mit der von Kontrollproteinen verglichen. Dazu wurden die fluoreszenzmarkierten Proben in das Cytoplasma von Vero-Zellen injiziert und die Zellen nach der Mikroinjektion entweder bei 37 °C oder bei 4 °C inkubiert.

Unter Abbildung 25 sind die Ergebnisse der Untersuchung zur Temperaturabhängigkeit dargestellt. Der Abbildung 25A sind Aufnahmen von Vero-Zellen mit beispielhafter Verteilung der fluoreszenten Proben nach 30-minütiger Inkubation bei 37 °C bzw. 4 °C zu entnehmen. Abbildung 25B zeigt die mittleren  $F_{K/C}$ -Werte, die sich aus der intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 bzw. der Kontrollproteine nach 10- bzw. 30-minütiger Inkubation bei 37 °C bzw. 4 °C ergeben.

Wie schon aus der Abbildung 25A hervorgeht, wird die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 (Abb. 25A e+f) sowie die der Kontrollproteine FL-BSA-NLS (Abb. 25A a+b) und MBP-Cy3 (Abb. 25A g+h) durch Erniedrigung der Inkubationstemperatur von 37 °C auf 4 °C deutlich beeinträchtigt. Ist nach Inkubation bei 37 °C eine deutliche Kernfluoreszenz zu erkennen, so kann nach Inkubation bei 4 °C kaum Fluoreszenz im Kern detektiert werden. Dagegen waren bei der Diffusionskontrolle STI-Cy3 keine temperaturbedingten Unterschiede in der Kern-Cytoplasma-Verteilung festzustellen (Abb. 25A c+d).

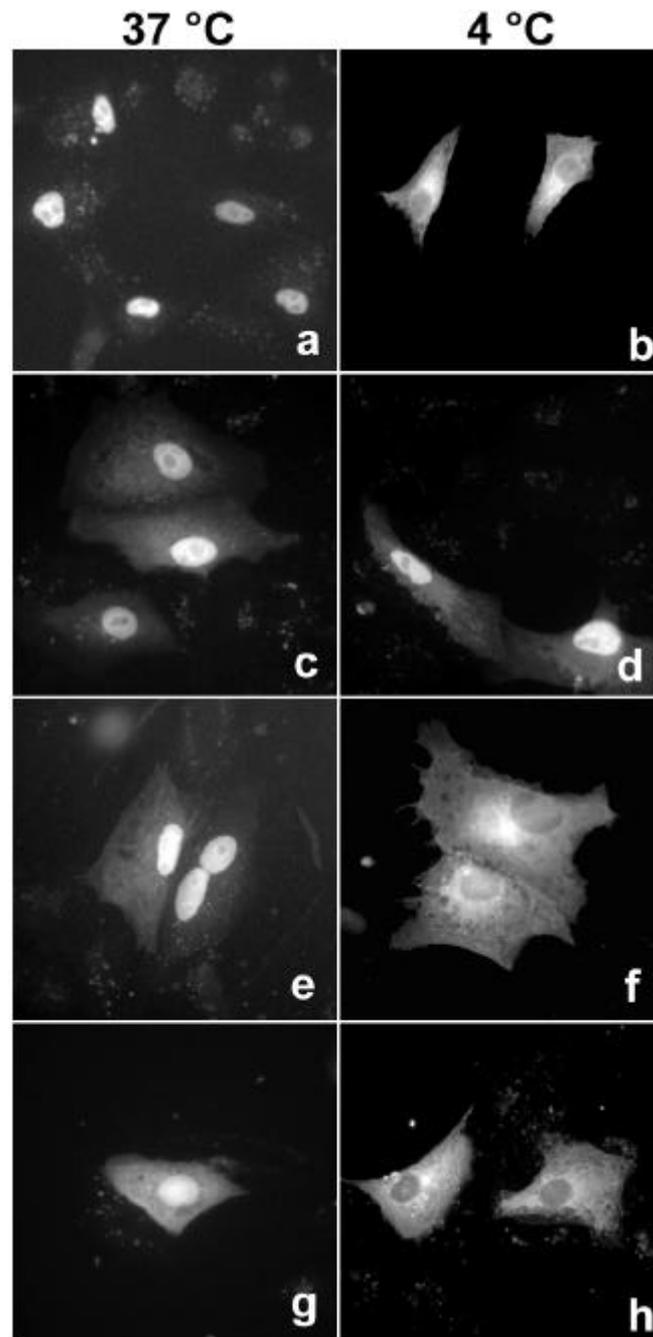
Die quantitative Auswertung der Experimente (Abb. 25B) bestätigt die zuvor gemachten Beobachtungen. So liegen die  $F_{K/C}$ -Werte von rC $\alpha$ myr-Cy3, MBP-Cy3 und FL-BSA-NLS im Mittel nach Inkubation bei 4 °C kaum über dem für den Kernausschluß bestimmten mittleren  $F_{K/C}$ -Wert von 1,2 (s. *Ergebnisse* 2.4), wohingegen sich für den  $F_{K/C}$ -Wert von STI-Cy3 unverändert ein Wert von 7 ergibt.

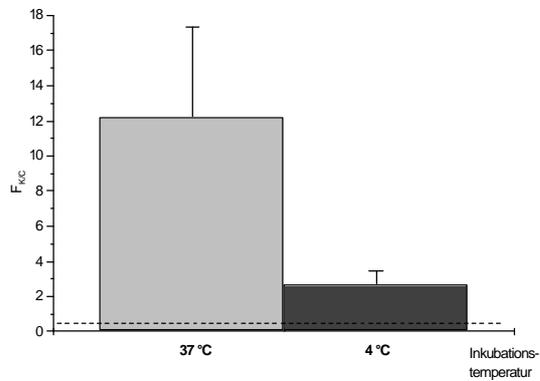
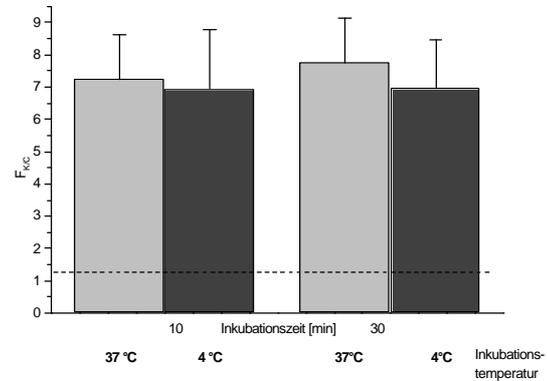
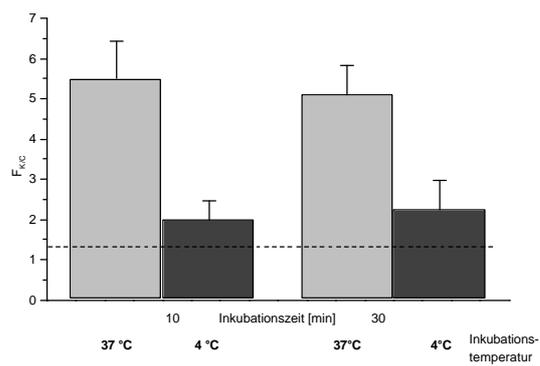
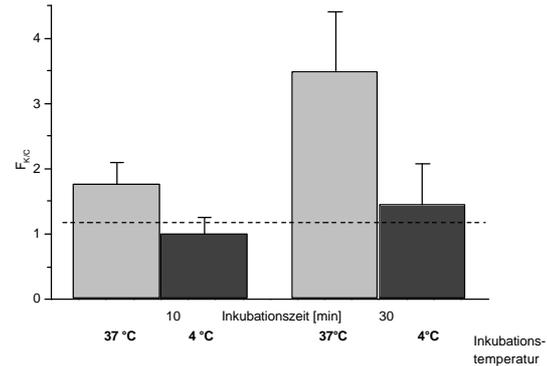
Während das Verhalten von FL-BSA-NLS und von STI-Cy3 der eingangs beschriebenen Beobachtung von Schultz und Peters (1987) und von Richardson *et al.* (1988) entspricht, scheint der bei MBP-Cy3 beobachtete Effekt dieser zu widersprechen. Hier läßt sich bei 4 °C eine klare Beeinträchtigung der Diffusion erkennen (Abb. 25A d, 25B g+h). Da sich die beiden Diffusionskontrollen STI und MBP maßgeblich in ihrem Molekulargewicht unterscheiden, ist zu vermuten, daß darin auch der Grund für das so andersartige Verhalten

bei einer Temperatur von 4°C liegen könnte. Offenbar gilt für die Diffusion großer Moleküle, daß die Temperatur diesen Vorgang beeinflusst, bei kleineren Molekülen hingegen nicht.

Eine eindeutige Aussage über den Translokationsmechanismus von rC $\alpha$ myr erlaubt das Experiment somit nicht, da die Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 zwar die bei der Kontrolle für den aktiven Import FL-BSA-NLS beobachteten Abhängigkeit von der Temperatur zeigt, diese aber auch bei der Diffusionskontrolle MBP-Cy3 beobachtet werden konnte.

A



**B****a****b****c****d**

**Abbildung 25: Einfluß der Inkubationstemperatur auf die Kern-Cytoplasma-Verteilung der  $C_a$ -Untereinheit rCa myr-Cy3 und Kontrollen in Vero-Zellen**

Die fluoreszenzmarkierten Injektionsproben wurden den Vero-Zellen zusammen mit 1 mM DTT und 5 mM cAMP in gekühltem Medium injiziert. Unmittelbar nach der Injektion wurden die Zellen in Medium mit 5 mM 8-Br-cAMP für 10 und 30 Minuten bei 4 °C bzw. 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PFA fixiert. Die Mikroinjektionsexperimente wurden, wie in *Ergebnisse* 4.1.1 angegeben, durchgeführt und ausgewertet.

**A:** Typische Lokalisation von FL-BSA-NLS (**a, b**), STI-Cy3 (**c, d**), rCa myr-Cy3 (**e, f**) und MBP-Cy3 (**g, h**) nach 30-minütiger Inkubation bei 4 °C bzw. 37 °C fixierten Vero-Zellen. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop.

**B:**  $F_{K/C}$  von FL-BSA-NLS (**a**), STI-Cy3 (**b**), rCa myr-Cy3 (**c**) und MBP-Cy3 (**d**) nach 10- und 30-minütiger Inkubation bei 4 °C bzw. 30 °C

#### 4.1.4 Einfluß der Verfügbarkeit von Energie auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr und Kontrollproteinen in Vero-Zellen

Die 'Energie'-Abhängigkeit der intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr und Kontrollproteinen wurde anhand von Experimenten untersucht, in denen das zelluläre ATP depletiert bzw. das Ran-GTP-System durch Verwendung einer GTP-Hydrolyse-defizienten Ran-Mutante sowie durch den Einsatz nicht hydrolysierbarer GTP-Analoga beeinträchtigt wurde.

#### Einfluß der ATP-Verfügbarkeit auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr und Kontrollproteinen

Ein weiteres Kriterium für den aktiven Kern-Cytoplasma-Transport kann der Energiebedarf sein. Newmeyer und Forbes konnten zeigen, daß durch Depletion von ATP der aktive Import von Proteinen in den Kern, z.B. beim klassischen NLS-vermittelten Import, blockiert werden kann [Newmeyer und Forbes 1988]. Eine Beeinträchtigung der Diffusion von Molekülen in den Kern wurde dagegen nicht beobachtet. Der Grund für die ATP-abhängige Inhibition des aktiven Transports ist jedoch noch unbekannt, da bisher weder für den aktiven Import noch für den aktiven Export ein ATP-abhängiger Schritt identifiziert wurde [Talcott und Moore 1999].

Um eine Erschöpfung der ATP-Reserven in den Vero-Zellen zu erreichen, wurden die Zellen vor der Mikroinjektion für 30 Minuten in 5,6 mM 2-Desoxy-D-Glukose (Inhibition der Glykolyse) und 10 mM Natriumazid (Blockierung der Atmungskette) inkubiert [Harootunian *et al.* 1993; Schmalz *et al.* 1998]. Die Inkubation nach der Mikroinjektion wurde ebenfalls in Gegenwart der beiden Inhibitoren durchgeführt.

In Abbildung 26 sind die Ergebnisse exemplarischer Experimente zur ATP-Depletion zusammengefaßt.

Es zeigte sich, daß die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 sowie von MBP-Cy3 und FL-BSA-NLS im Gegensatz zu der von STI-Cy3 durch die Erschöpfung der ATP-Reserven in den Vero-Zellen beeinflusst wurde.

Bei FL-BSA-NLS, der Positivkontrolle für den NLS-vermittelten aktiven Transport, wurde, wie unter diesen Bedingungen erwartet, der Import in den Kern deutlich inhibiert. FL-BSA-NLS verblieb im Cytoplasma, seine Akkumulation im Kern blieb aus (Abb. 26B b). Der mittlere  $F_{K/C}$ -Wert von FL-BSA-NLS bestätigte diese Beobachtung (Abb. 26A a). Er lag nur wenig über dem von Molekülen, die aus dem Kern ausgeschlossen wurden (s. *Ergebnisse* 2.4).

Die Diffusion von STI-Cy3 wurde durch Entzug des ATP in den Vero-Zellen nicht beeinträchtigt (Abb. 26A b, 26B c+d). Unabhängig von dem zellulären ATP-Spiegel ergaben sich für die intrazelluläre Verteilung von STI-Cy3  $F_{K/C}$ -Werte um 5,5 (Abb. 26A b).

Ganz anders als STI-Cy3 verhielt sich MBP-Cy3. Obwohl MBP-Cy3 wie auch STI-Cy3 über Diffusion in den Kern gelangt, zeigte sich hier nach 15 Minuten eine geringfügige, nach 30 Minuten jedoch eine deutliche Reduktion des  $F_{K/C}$ -Wertes um 60 % (Abb. 26A d). In den Vero-Zellen in Abbildung 26B g+h ist dieser Effekt deutlich zu erkennen.

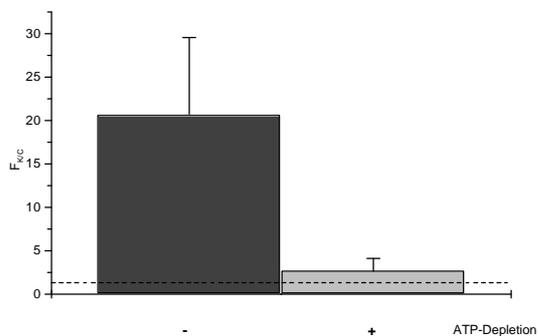
Wie bereits in *Ergebnisse* 4.1.3 vermutet wird, könnte auch hier ein Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Ergebnissen der beiden Diffusionskontrollen und ihren unterschiedlichen Molekulargewichten bestehen.

Für rC $\alpha$ myr-Cy3 zeigt das Experiment ein dem für MBP-Cy3 ähnliches Ergebnis. Auch hier war nach 30 Minuten durch den ATP-Entzug eine eindeutig geringere Kernfluoreszenz zu erkennen (Abb. 26B f). Die  $F_{K/C}$ -Werte von rC $\alpha$ myr-Cy3 ergaben nach 30-minütiger Inkubation unter ATP-Depletion im Mittel um 45 % geringere Werte als in unbehandelten Zellen (Abb. 26B c).

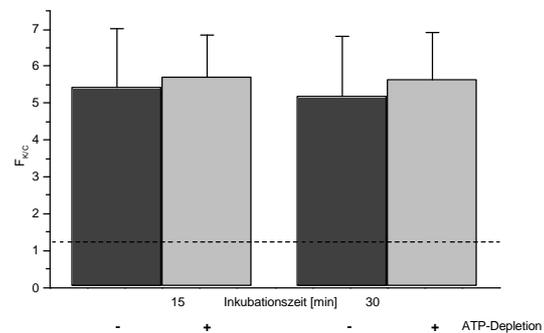
Auch in diesem Experiment ist durch den Vergleich mit MBP-Cy3 als Kontrolle der für rC $\alpha$ myr-Cy3 gezeigte Effekt nicht als eindeutiger Hinweis auf aktiven Transport zu interpretieren.

## A

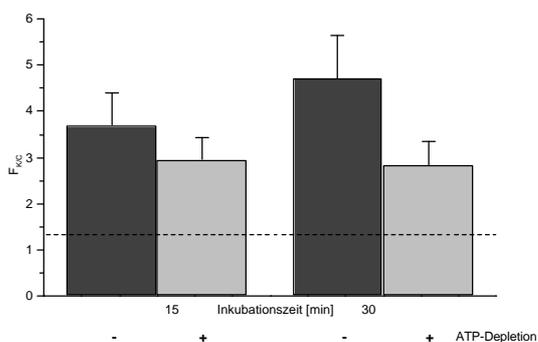
**a**



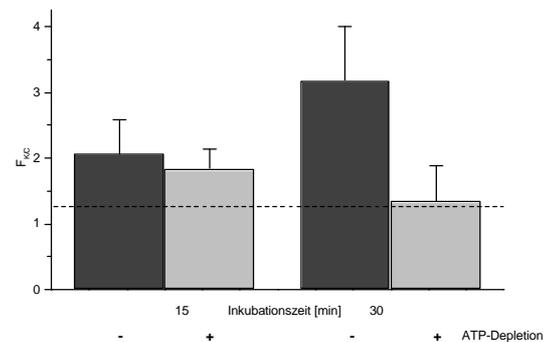
**b**



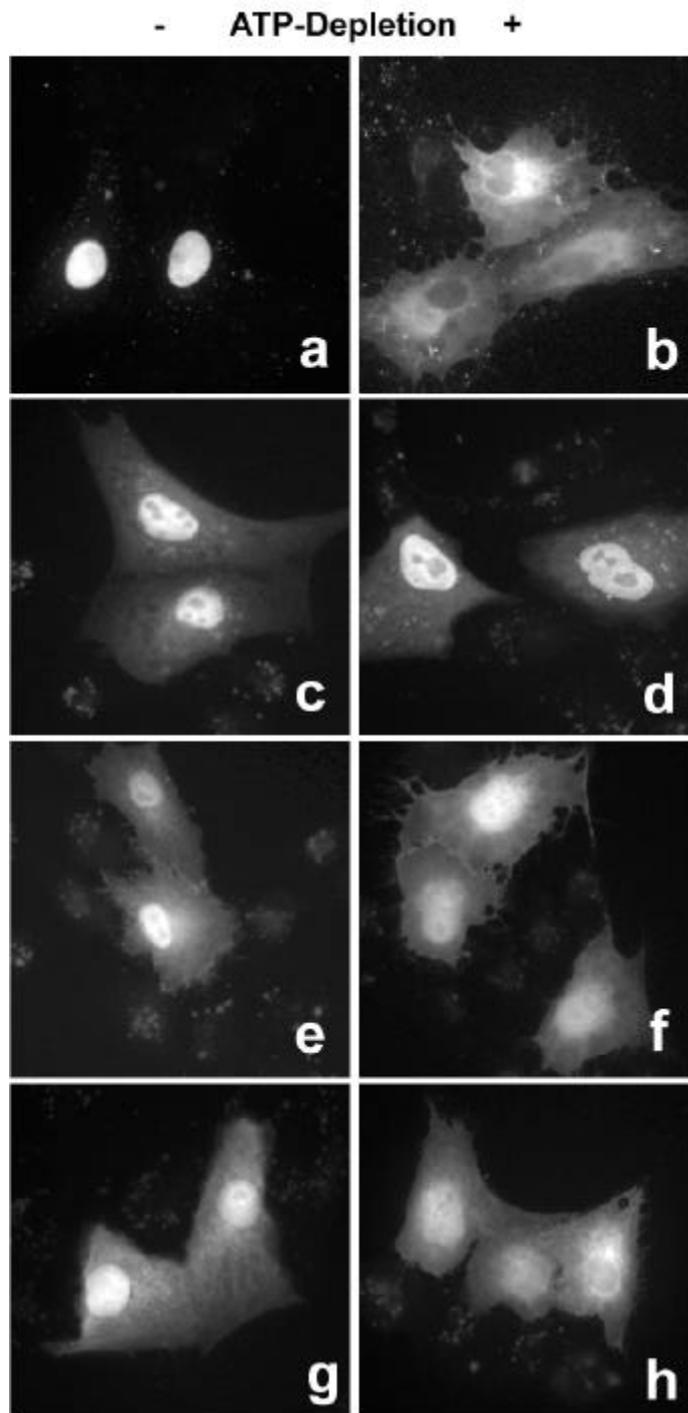
**c**



**d**



B



**Abbildung 26: Intrazelluläre Verteilung von rCamyr-Cy3 und Kontrollen in Vero-Zellen unter ATP-Depletion**

Die Vero-Zellen wurden zur Erschöpfung der ATP-Reserven für 30 Minuten in Glukose-freiem Medium mit 5,6 mM 2-Desoxy-D-Glukose und 10 mM Natriumazid bei 37 °C vorinkubiert. Anschließend wurden den Vero-Zellen in kaltem PBS die fluoreszenzmarkierten Injektionsproben injiziert, denen 1 mM DTT und 5 mM cAMP zugesetzt waren. Unmittelbar nach der Injektion wurden die Zellen in Glukose-freiem Medium mit 5 mM 8-Br-cAMP und 5,6 mM 2-Desoxy-D-Glukose sowie 10 mM Natriumazid für 15 bzw. 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PFA fixiert. Die Mikroinjektionsexperimente wurden, wie in *Ergebnisse* 4.1.1 angegeben, durchgeführt und ausgewertet.

**A:**  $F_{K/C}$  von FL-BSA-NLS (**a**), STI-Cy3 (**b**), r $\alpha$ myr-Cy3 (**c**) und MBP-Cy3 (**d**) nach 15- bzw. 30-minütiger Inkubation in Vero-Zellen

**B:** Lokalisation von FL-BSA-NLS (**a**, **b**), STI-Cy3 (**c**, **d**), r $\alpha$ myr-Cy3 (**e**, **f**) und MBP-Cy3 (**g**, **h**) in unbehandelten und in ATP-depletierten Vero-Zellen nach 30-minütiger Inkubation. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop.

### **Einfluß von Ran-GTP bzw. Ran(Q69L)-GTP auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr und FL-BSA-NLS als Kontrolle für aktiven Import**

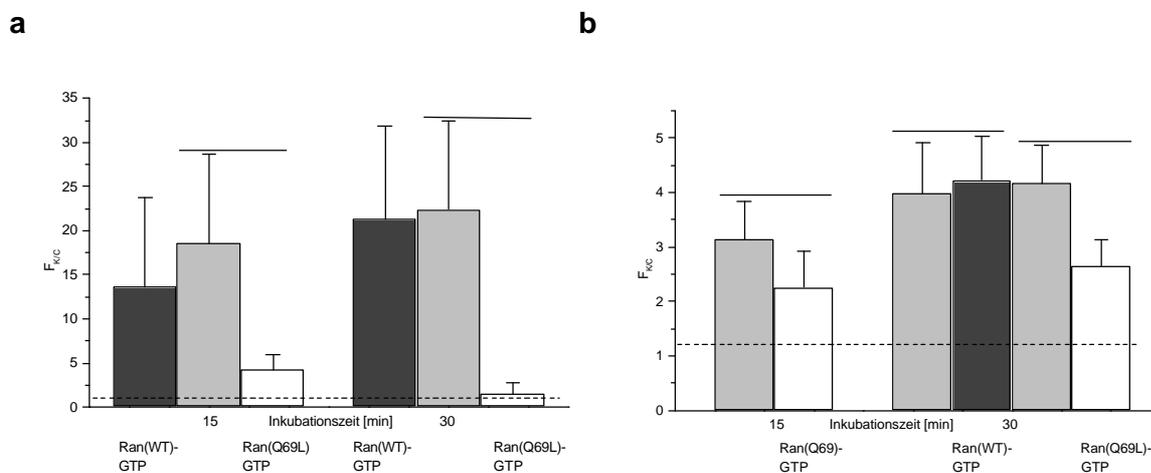
Der aktive Import von Importsubstraten mit klassischem NLS, wie von FL-BSA-NLS, über Importin  $\alpha$  und  $\beta$  ist von der Gegenwart der GTPase Ran in GTP-gebundener Form abhängig. Ran-GTP spielt dabei sowohl bei der Dissoziation des Importkomplexes im Kern als auch bei dem Recycling der Transportrezeptoren eine Rolle. Eine direkte Abhängigkeit des aktiven Imports von der bei der GTP-Hydrolyse durch Ran freiwerdenden Energie konnte bisher allerdings noch nicht gezeigt werden. Aufgrund der Bedeutung von Ran-GTP für viele aktive Transportwege wurde sein Einfluß als Kriterium für aktiven Transport herangezogen. Um eine Abhängigkeit der Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 auf den Ran-GTP-Bedarf hin zu überprüfen, wurde eine Punktmutante der GTPase, Ran(Q69L), die GTP zwar binden, aber nicht mehr hydrolysieren kann, in Mikroinjektionsexperimenten eingesetzt. Die in der GTP-gebundenen Form blockierte Ran(Q69L)-Mutante bildet stabile Komplexe mit Importinen wie Importin  $\beta$  aus, die so nicht in der Lage sind, mit den NLS-haltigen Substraten Importkomplexe zu formen [Dickmanns *et al.* 1996; Hughes *et al.* 1998]. Der aktive Import ist damit blockiert.

Um die Translokation von rC $\alpha$ myr auf ihre Abhängigkeit von Ran-GTP hin zu untersuchen, wurde in ersten Experimenten zunächst Ran(Q69L)-GTP bzw. zur Kontrolle Wildtyp Ran-GTP zusammen mit rC $\alpha$ myr-Cy3 in das Cytoplasma der Vero-Zellen coinjiziert. Zur Kontrolle wurde FL-BSA-NLS, mit dem durch RanQ69L-GTP eine Inhibition des Imports erwartet wurde, eingesetzt. Daß selbst bei dem Ran-GTP-abhängigen Import von FL-BSA-NLS nur marginale Effekte sichtbar wurden (Ergebnisse nicht gezeigt), zeigte die Notwendigkeit, das zelluläre Importsystem bereits vor dem eigentlichen Experiment mit RanQ69L-GTP abzusättigen.

In einer zweiten Folge von Experimenten wurde deshalb zuerst Ran(Q69L)-GTP bzw. Ran-GTP in die Vero-Zellen injiziert und erst nach einer halbstündigen Inkubation in einer zweiten Injektion die fluoreszenzmarkierte Probe. Das Wiederfinden der injizierten Zellen nach der Inkubation wurde durch ein zur Orientierungshilfe in die Deckgläschen geritztes Kreuz gewährleistet. Dennoch gab es in jedem Ansatz Zellen, in die nur beim ersten oder zweiten Mal injiziert wurde und auch solche, in die zweimal injiziert wurde. Um bei der Auswertung zwischen den Zellen mit und den Zellen ohne Ran-GTP- bzw. Ran(Q69L)-GTP-Vorbehandlung unterscheiden zu können, wurde beim ersten Injektionsschritt FITC-markiertes IgG coinjiziert. Vero-Zellen, in die nur bei der zweiten Injektion injiziert wurde, wurden als unbehandelte Kontrolle analysiert.

In Abbildung 27 sind die durch quantitative Auswertung der Experimente ermittelten Verhältnisse  $F_{K/C}$  von FL-BSA-NLS (a) und r $\alpha$ myr-Cy3 (b) mit und ohne vorherige Ran-GTP- bzw. Ran(Q69L)-GTP-Behandlung gezeigt.

Durch die Vorinkubation der Zellen mit der Hydrolyse-defizienten Ran-Mutante wurde der Import von FL-BSA-NLS fast vollständig unterdrückt (Abnahme um 94 %), während eine Vorinkubation mit Wildtyp Ran-GTP keine Veränderung des Importverhaltens ergab (Abb. 27 a). Wie aus Abbildung 27 b deutlich wird, wird die intrazelluläre Verteilung von r $\alpha$ myr-Cy3 ebenfalls durch Vorinkubation mit der Ran(Q69L)-Mutante beeinträchtigt. Jedoch zeigt sich hier eine geringere Inhibierung der Translokation in den Kern (Abnahme um 37 %). Die Vorinkubation mit Wildtyp Ran-GTP veränderte die Verteilung des Enzyms nicht.



**Abbildung 27: Intrazelluläre Verteilung von r $\alpha$ myr-Cy3 und FL-BSA-NLS in Abhängigkeit von Ran-GTP oder Ran(Q69L)-GTP**

Die in der Abbildung gezeigten  $F_{K/C}$ -Werte beziehen sich auf die Verteilung von r $\alpha$ myr-Cy3 und FL-BSA-NLS in Zellen mit und ohne vorherige Injektion von Ran-GTP bzw. Ran(Q69L)-GTP.

Zur Vorinkubation der Vero-Zellen mit Ran-GTP bzw. Ran(Q69L)-GTP (2 mg/ml) wurde beides in einer ersten Injektion in die Vero-Zellen injiziert und anschließend für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. In einer zweiten Injektion wurde sowohl in bei der ersten Injektion injizierten als auch in nicht injizierte Vero-Zellen FL-BSA-NLS (**a**) und r $\alpha$ myr-Cy3 (**b**) injiziert, denen 1 mM DTT und 5 mM cAMP zugesetzt war (s. Legende zu Abb. 15). Unmittelbar nach der Injektion wurden die Zellen in Medium mit 5 mM 8-Br-cAMP für 15 bzw. 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach wurden die Zellen mit PFA fixiert.

Bei der ersten Injektion wurde FITC-IgG als Marker coinjiziert (außer bei FL-BSA-NLS). So war es bei der Auswertung durch die unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierungen möglich, zwischen einmal und zweimal injizierten Zellen zu unterscheiden, d.h. zwischen Zellen, in die nur r $\alpha$ myr-Cy3, und solchen, in die r $\alpha$ myr-Cy3 und Ran-GTP bzw. Ran(Q69L)-GTP injiziert wurde. Ausgewertet wurde die Fluoreszenzverteilung von r $\alpha$ myr-Cy3 und FL-BSA-NLS nach der unter *Ergebnisse* 4.1.1 angegebenen Methode.

Die durch Linien verbundenen Balken zeigen  $F_{K/C}$ -Werte von Zellen eines Ansatzes, die mit Ran-GTP bzw. Ran(Q69L)-GTP behandelt wurden, sowie von unbehandelten Kontrollzellen.

### **Der Einfluß der GTP-Analoga GMP-PNP und GTP- $\gamma$ -S auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr und Kontrollproteinen in Vero-Zellen**

Ähnlich wie durch Verwendung der Ran(Q69L)-Mutante kann die Anhängigkeit von Translokationsvorgängen vom Ran-System durch Gabe von nicht-hydrolysierbaren GTP-Analoga überprüft werden.

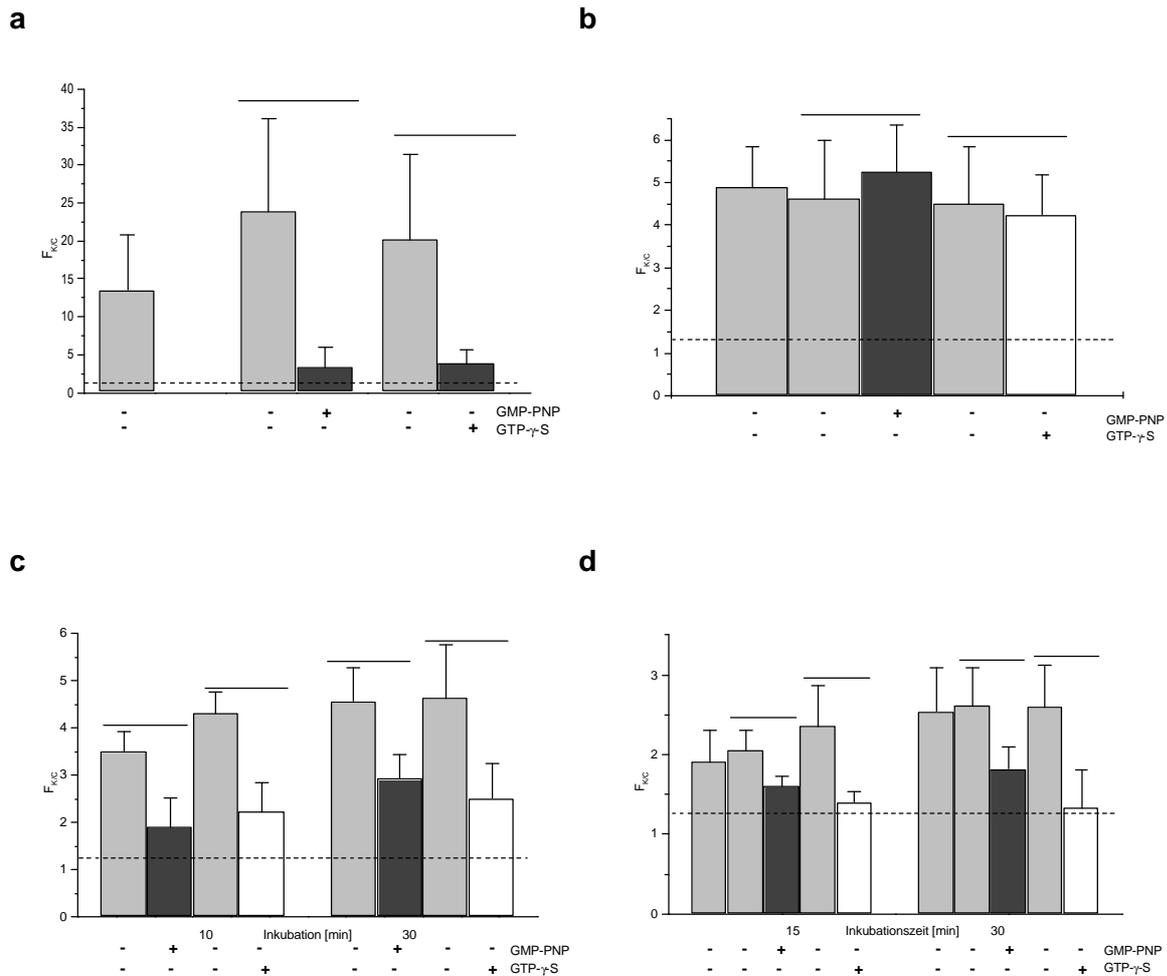
Wie auch schon bei den zuvor beschriebenen Mikroinjektionsexperimenten unter Verwendung der Ran(Q69L)-Mutante bedurfte es auch hier der Vorinkubation der Vero-Zellen mit den Inhibitoren, um einen möglichen Effekt sichtbar zu machen. Dies gelang durch Injektion von 50 mM GMP-PNP [Schmalz *et al.* 1998] bzw. 50 mM GTP- $\gamma$ -S [Sweitzer und Hanover 1996] in einer ersten Injektion mit anschließender Inkubation, gefolgt von der Injektion der eigentlichen Probe in einer zweiten Injektionsphase (s. o.).

Wie die Ergebnisse unter Abbildung 28 zeigen, war bei rC $\alpha$ myr-Cy3, MBP-Cy3 und FL-BSA-NLS ein Effekt durch beide GTP-Analoga zu beobachten, während sich für STI-Cy3 kein Effekt einstellte.

Bei FL-BSA-NLS, der Positivkontrolle für den aktiven Transport, war nach Zugabe der GTP-Analoga eine verminderte Akkumulation im Kern zu beobachten (Abb. 28 a). Die ermittelten Werte für  $F_{KC}$  betrugen unabhängig vom verwendeten GTP-Analogen nur noch 30 - 40 % der  $F_{KC}$ -Werte in unbehandelten Zellen. Eine vollkommene Inhibition des Imports wurde nicht erreicht. Das kann sowohl am unvollkommenen Austausch des GTP im zellulären Ran-GTP gegen die verabreichten Analoga liegen, als auch daran, daß der inhibitorische Effekt erst am Ende des Importzyklus wirksam wird, nachdem bereits ein Teil des fluoreszenzmarkierten Substrates in den Kern importiert wurde.

Das Diffusionsverhalten von STI-Cy3 zeigte sich dagegen unabhängig von der Vorinkubation mit GTP-Analoga. Das Verhältnis  $F_{KC}$  lag hier in jeden Fall im Mittel um einen Wert von 4,5 (Abb. 28 b).

rC $\alpha$ myr-Cy3 verhielt sich auch hier wieder ähnlich der Diffusionskontrolle MBP-Cy3. Durch Vorinkubation mit GTP- $\gamma$ -S bzw. GMP-PNP verringert sich der für  $F_{KC}$  ermittelte Wert für die Verteilungsverhältnisse der nukleären und cytoplasmatischen Fluoreszenzintensitäten bei MBP-Cy3 um 20 bzw. 50 % (Abb. 28 d) und bei rC $\alpha$ myr-Cy3 um 50 bzw. 60 % (Abb. 28 c).



**Abbildung 28: Einfluß der GTP-Analoga GMP-PNP und GTP-g-S auf die intrazelluläre Verteilung von rCa myr-Cy3 und Kontrollproteinen in Vero-Zellen**

Zur Vorinkubation der Vero-Zellen mit GMP-PNP bzw. GTP-g-S wurden die Inhibitoren in einer ersten Injektion zusammen mit FITC-IgG als Marker in die Zellen injiziert und die Zellen anschließend für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. In einer zweiten Injektion wurden den Vero-Zellen die fluoreszenzmarkierten Injektionsproben FL-BSA-NLS (a), STI-Cy3 (b), rCa myr-Cy3 (c) und MBP-Cy3 (d), denen 1 mM DTT und 5 mM cAMP zugesetzt war, injiziert. Unmittelbar nach der Injektion wurden die Zellen in Medium mit 5 mM 8-Br-cAMP für 15 bzw. 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Vorgehensweise bei der Mikroinjektion entspricht der in der Legende von Abbildung 27 beschriebenen Vorgehensweise. Die quantitative Auswertung der Fluoreszenzverteilung der Proben erfolgte nach der unter *Ergebnisse* 4.1.1 angegebenen Methode.

Die durch Linien verbundenen Balken zeigen Werte von Zellen eines Ansatzes. Durch die Coinjektion des fluoreszenzmarkierten IgG war es möglich, zwischen denen mit und denen ohne Ran vorinkubierten Zellen zu unterscheiden.

#### 4.1.5 Blockieren der Kernpore

Der aktive Transport durch die Kernporenkomplexe (NPC) zeichnet sich u.a. dadurch aus, daß Bindungsstellen in den NPCs benötigt werden, an denen sich der Transportrezeptor mit dem gebundenen Transportsubstrat oder das Substrat allein durch den Porenkanal bewegen

kann. Da diese Bindungsstellen nur beim aktiven Transport, nicht aber bei der Diffusion eine Rolle spielen, bieten sie sich als Angriffspunkt für eine gezielte und spezifische Inhibition des aktiven Transports an. Wie Experimente von Finlay *et al.* (1987) und Kutay *et al.* (1997) zeigen, kann das Besetzen dieser Bindungsstellen mit Inhibitoren die Bindungsstellen-abhängigen Transportwege blockieren, ohne dabei die passive Diffusion durch die Kernpore zu beeinträchtigen. Eine solche Blockade der NPCs ist durch Weizenkeimagglutinin [Finlay *et al.* 1987] sowie eine dominant negative Importin  $\beta$ -Deletionsmutante [Kutay *et al.* 1997] möglich. Beide Inhibitoren wurden auch in dieser Arbeit eingesetzt, um den Translokationsmechanismus von rC $\alpha$ myr auf diese Fragestellung hin zu untersuchen. Auf die Mikroinjektionsexperimente wird im folgenden eingegangen.

### **Einfluß von WGA auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr und von Kontrollproteinen in Vero-Zellen**

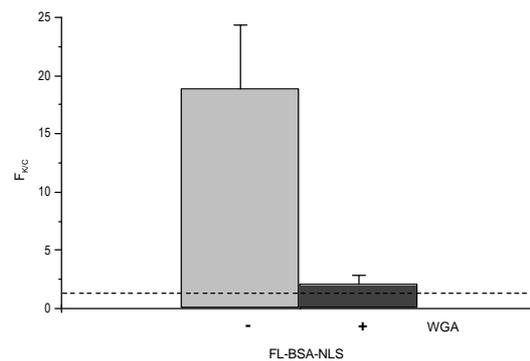
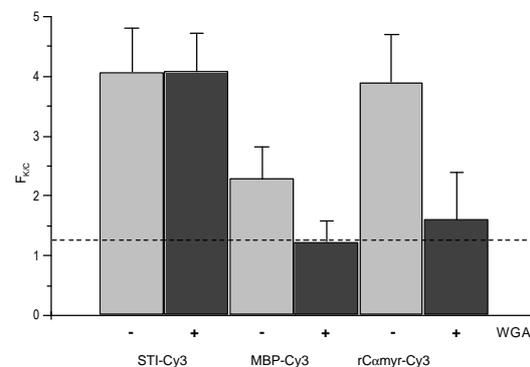
Weizenkeimagglutinin (WGA) gilt durch seine direkte Bindung an die NPCs als Inhibitor des aktiven Kerntransports [Finlay *et al.* 1987]. Es bindet an die Glykoproteine der Nukleopore, wodurch es die Poren für den aktiven Transport blockiert. Da für die Diffusion von Makromolekülen in den Kern bisher keine Beeinträchtigung durch an Kernporen gebundenes WGA beobachtet wurde [Yoneda *et al.* 1987], wurde WGA als ein weiteres Hilfsmittel eingesetzt, um das Translokationsverhalten von rC $\alpha$ myr weiter aufzuklären.

Dazu wurde WGA in einer Konzentration von 2,5 mg/ml [Yoneda *et al.* 1987] zusammen mit rC $\alpha$ myr-Cy3 bzw. den fluoreszenten Kontrollproteinen in Vero-Zellen injiziert. Die Zellen wurden nach der Mikroinjektion für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert und anschließend fixiert.

In Abbildung 29A sind die mittleren  $F_{K/C}$ -Werte von rC $\alpha$ myr-Cy3 und den Kontrollproteinen mit und ohne Zugabe von WGA graphisch dargestellt. In Abbildung 29B sind Vero-Zellen mit beispielhafter Verteilung der fluoreszenten Proben für die jeweiligen Experimente abgebildet.

Es zeigte sich, daß FL-BSA-NLS (Abb. 29A a, 29B b), rC $\alpha$ myr-Cy3 (Abb. 29A b, 29B f) und MBP-Cy3 (Abb. 29A b, 29B h) in Gegenwart von WGA nach 15-minütiger Inkubation fast vollständig aus dem Kern ausgeschlossen blieben. Bei allen drei Proteinen scheint so gut wie kein Protein durch Kernporenkomplexe in den Kern gelangen zu können ( $F_{K/C}$ -Werte etwas über 1,2) (Abb. 29A a+b). Eine nicht vollständige Blockierung kann durch die Dosisabhängigkeit der Inhibition erklärt werden [Yoneda *et al.* 1987]. STI als kleines diffusibles Molekül verhält sich ganz anders (Abb. 29A b, 29B c+d). Das sich nach Coinjektion des WGA einstellende Kern-Cytoplasma-Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten  $F_{K/C}$  unterscheidet sich nicht von dem der Zellen ohne WGA-Behandlung. Die Diffusion des 21 kDa großen STI in den Kern wurde durch WGA nicht beeinträchtigt.

Die beschriebenen Beobachtungen für STI-Cy3 und FL-BSA-NLS entsprechen den von Finlay *et al.* gemachten Beobachtungen (1987) [Finlay *et al.* 1987]. Der überraschende Effekt des WGA auf die Translokation von MBP-Cy3 als Kontrolle für Diffusion entkräftet die Schlußfolgerung, daß rC $\alpha$ myr-Cy3 aufgrund der WGA-Inhibierung einem aktiven Translokationsmechanismus unterliegen muß.

**A****a****b**

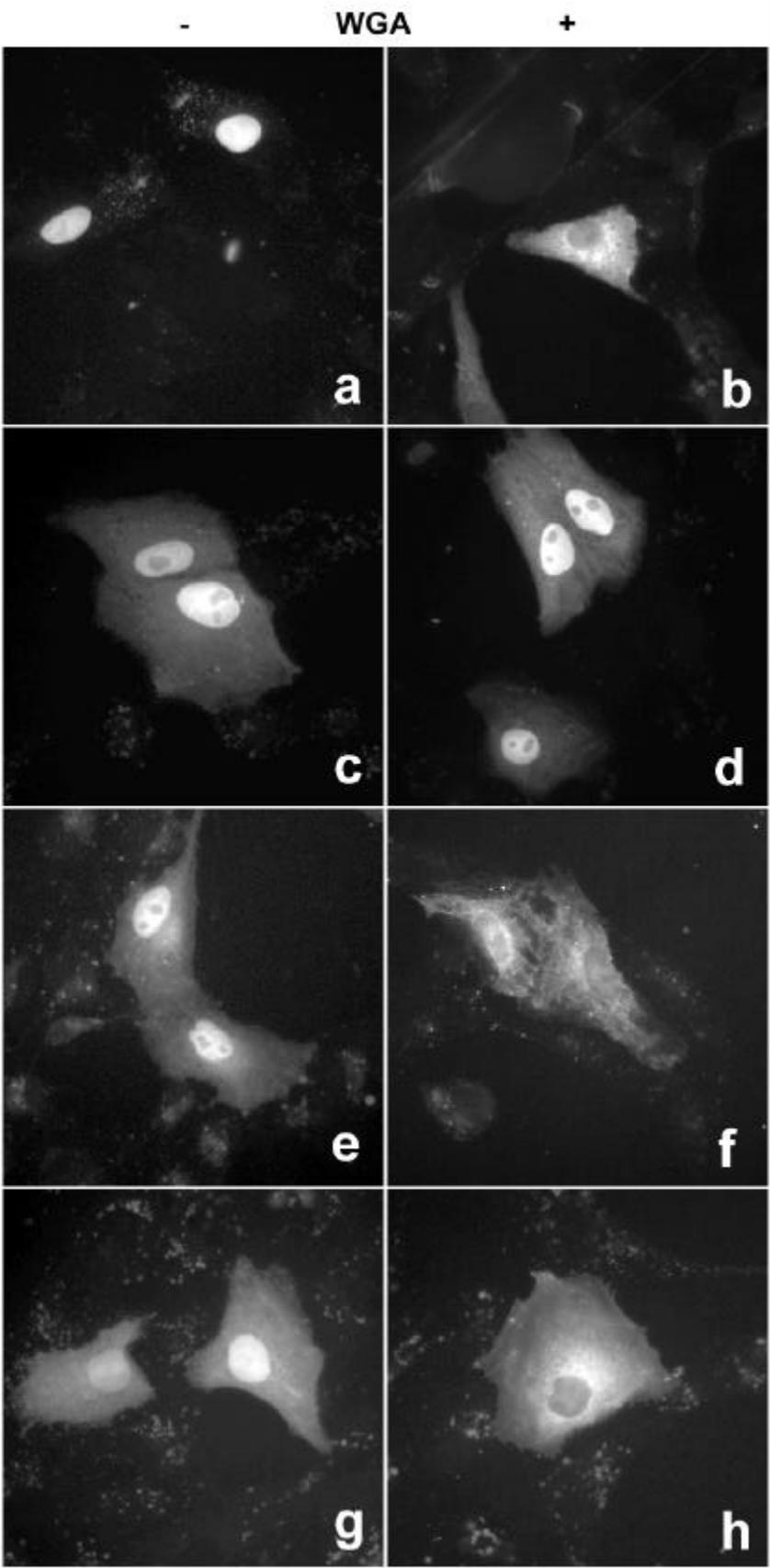
### Abbildung 29: Einfluß von WGA auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 und Kontrollen in Vero-Zellen

Die Mikroinjektion und Auswertung erfolgte wie unter *Ergebnisse* 4.1.1 beschrieben. Zur Blockierung der NPCs wurde WGA (2,5 mg/ml) mit den Injektionsproben in die Vero-Zellen coinjiziert. Die Inkubation der Vero-Zellen erfolgte unmittelbar nach der Injektion für 15 Minuten bei 37 °C.

**A:**  $F_{K/C}$  von FL-BSA-NLS (**a**), STI-Cy3 (**b**), rC $\alpha$ myr-Cy3 (**b**) und MBP-Cy3 (**b**) nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C.

**B:** Lokalisation von FL-BSA-NLS (**a, b**), STI-Cy3 (**c, d**), rC $\alpha$ myr-Cy3 (**e, f**) und MBP-Cy3 (**g, h**) in Vero-Zellen, die nach einer 15-minütigen Inkubation bei 37 °C fixiert wurden, in Abhängigkeit von WGA. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop.

B



### **Einfluß der Importin $\beta$ -Mutante (45-462) auf die intrazelluläre Verteilung rCmyr und Kontrollproteinen in Vero-Zellen**

Unter Verwendung der dominant negativen Importin  $\beta$ -Deletionsmutante (45-462) wurde neben der allgemeinen Abhängigkeit vom Vorhandensein freier Bindungsstellen im Kernporenkomplex darüber hinaus auch noch eine Abhängigkeit des Transportmodus von Importin  $\beta$  untersucht. Da die Importin  $\beta$ -Mutante (45-462), durch die N-terminale Deletion bedingt, Ran-GTP nicht mehr binden kann, kann der Importkomplex aus Substrat, Importin  $\alpha$  und Importin  $\beta$  nicht mehr von dem NPC dissoziieren. Die Bindungsstellen in der Kernpore bleiben irreversibel blockiert. Die Importin  $\beta$ -Mutante (45-462) wurde von der Abteilung D. Görlich (ZMBH, Heidelberg) bzw. Herrn F. R. Bischoff (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Anders als in den Experimenten mit WGA zeigten die Mikroinjektionsexperimente, in denen Importin  $\beta$  (45-462) zusammen mit den Injektionsproben in die Zellen injiziert wurden, nur sehr schwache Effekte. In Anlehnung an die Experimente mit der Ran-Mutante Ran(Q69L) (s. *Ergebnisse* 4.1.4) wurde daraufhin die Importin  $\beta$ -Mutante (45-462) 30 Minuten vor den fluoreszenzmarkierten Proben in die Vero-Zellen injiziert. So konnten die vorhandenen Bindungsstellen für Importin  $\beta$  am NPC bereits vor Beginn des eigentlichen Experiments abgesättigt und das Importsystem des NLS-vermittelten Imports blockiert werden.

Abbildung 30 gibt die Ergebnisse der Mikroinjektionsexperimente mit der Importin  $\beta$  (45-462)-Mutante wieder. Unter A sind  $F_{K/C}$  der Proben gezeigt, unter B sind exemplarisch digitale Aufnahmen von Zellen dargestellt.

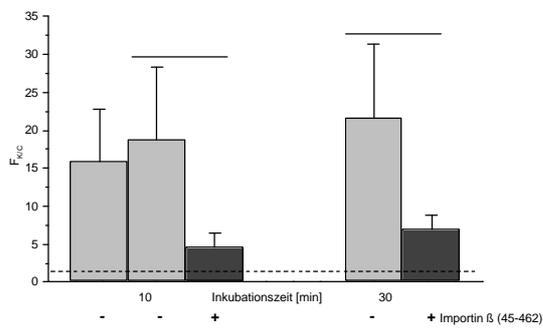
Am deutlichsten zeigte sich eine Inhibierung des Imports bei FL-BSA-NLS, der Positivkontrolle für den aktiven Transport. In Vero-Zellen, die zuvor mit der Mutante inkubiert wurden, akkumulierte das fluoreszente Protein deutlich weniger stark (Abb. 30A a, 30B b). Die  $F_{K/C}$ -Werte waren nach 10 bzw. 30 Minuten um ca. 70 % reduziert (Abb. 30A a). Erwartungsgemäß wurde die Verteilung der Diffusionskontrolle STI-Cy3 dagegen durch die Anwesenheit der Importin  $\beta$ -Mutante (45-462) kaum verändert (Abb. 30A b, 30B c+d). Um lediglich 10 - 15 % reduzierte  $F_{K/C}$ -Werte ergaben sich durch Zugabe der Importin  $\beta$ -Mutante nach 10- und 30-minütiger Inkubationszeit (Abb. 30A b). Die intrazelluläre Verteilung von MBP-Cy3, der größeren Diffusionskontrolle, zeigte sich wider Erwarten durch die Vorinkubation der Zellen mit der Importin  $\beta$ -Mutante (45-462) deutlich verändert (Abb. 30A d, 30B g+h). Das galt auch für rC $\alpha$ myr-Cy3 (Abb. 30A c, 30B e+f). In beiden Fällen nahmen die ermittelten  $F_{K/C}$ -Werte um ungefähr 40 % ab, wenn die Zellen mit Importin  $\beta$ -Mutante (45-462) vorinkubiert worden waren.

Da MBP-Cy3 weder Importin  $\beta$  noch Bindungsstellen benötigt, um in den Kern zu gelangen, ist anzunehmen, daß es sich bei der beobachteten Beeinträchtigung seiner Diffusion durch die Importin  $\beta$ -Mutante um einen indirekten Effekt handelt.

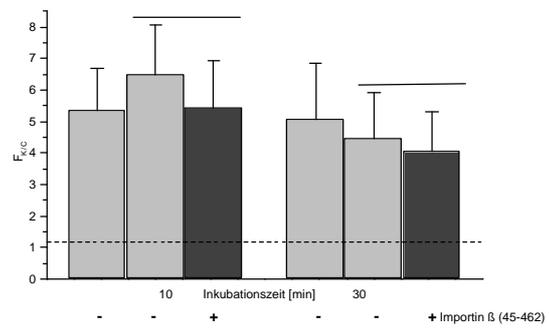
Wie auch schon bei den vorangegangenen Experimenten erlaubt das Ergebnis dieses Experiments aufgrund des ungewöhnlichen Verhaltens der Diffusionskontrolle MBP-Cy3 keine eindeutige Zuordnung des Translokationsmechanismus der Kinase.

**A**

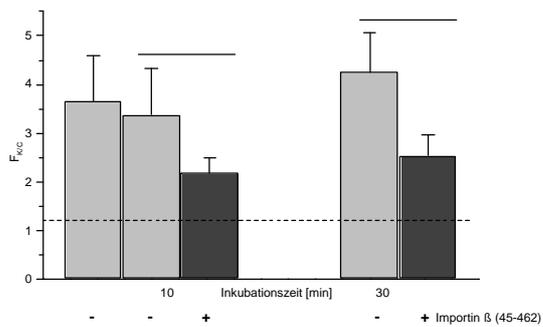
**a**



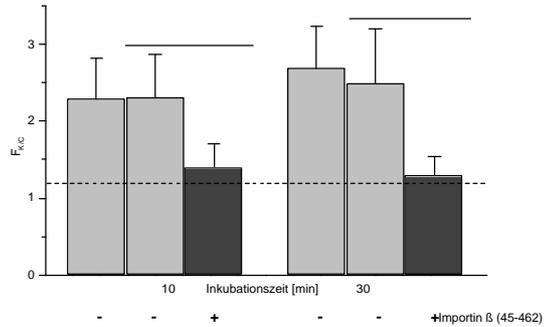
**b**



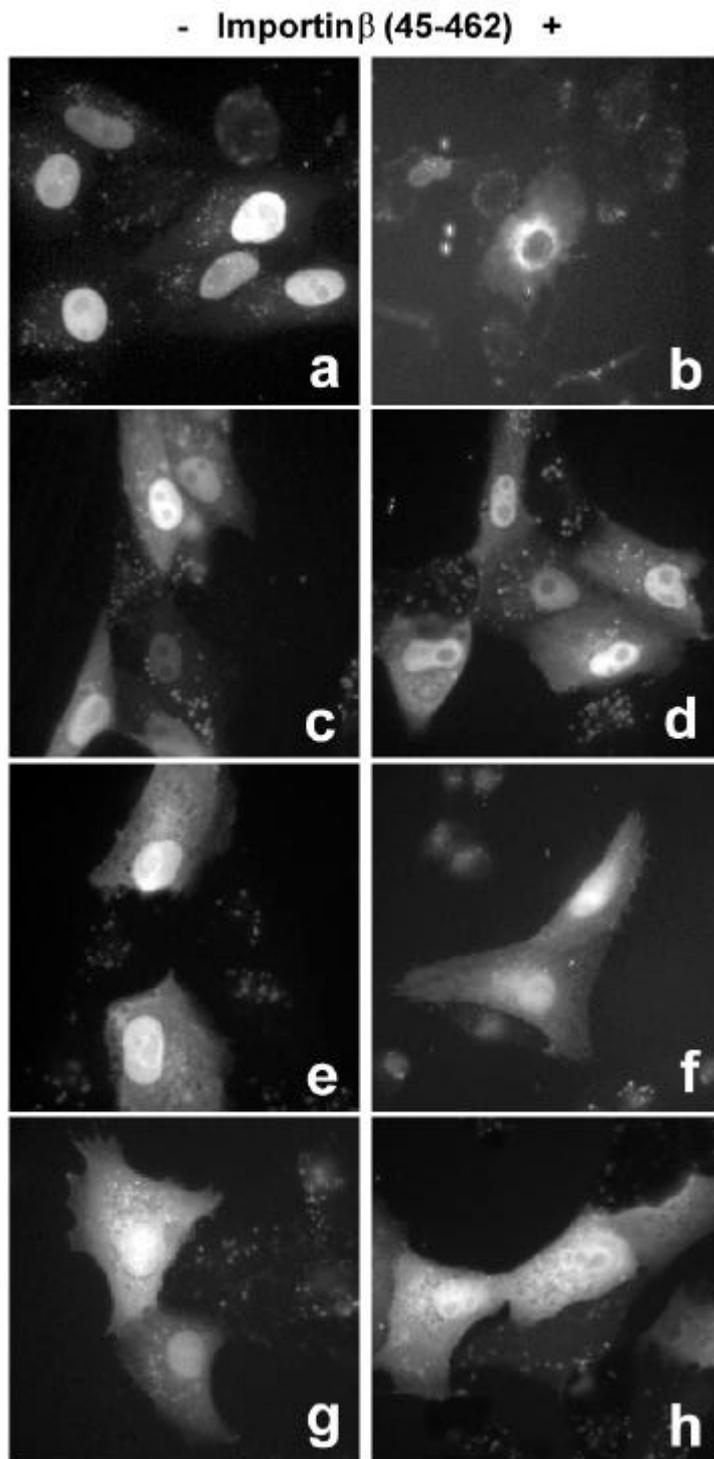
**c**



**d**



B



**Abbildung 30: Einfluß der Importin  $\beta$ -Mutante (45-462) auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 und Kontrollen in Vero-Zellen**

Zur Vorinkubation der Vero-Zellen mit der Importin  $\beta$ -Deletionsmutante wurde die Mutante in einer ersten Injektion den Zellen injiziert und diese anschließend für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Um zwischen injizierten und nicht-injizierten Zellen unterscheiden zu können, wurden FITC-IgG coinjiziert (außer bei Ansätzen von FL-BSA-NLS). In einer zweiten Injektion wurde den Vero-Zellen die fluoreszenzmarkierten Injektionsproben rC $\alpha$ myr-Cy3, STI-Cy3, MBP-Cy3 und FL-BSA-NLS appliziert, denen 1 mM DTT und 5 mM cAMP zugesetzt war. Unmittelbar nach der Injektion wurden die Zellen für 10 bzw. 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und fixiert. Die Details zur Mikroinjektion und zur Auswertung sind unter *Ergebnisse* 4.1.1 angegeben.

**A:** F<sub>K/C</sub> von FL-BSA-NLS (**a**), STI-Cy3 (**b**), rC $\alpha$ myr-Cy3 (**c**) und MBP-Cy3 (**d**) in Abhängigkeit von der Importin  $\beta$ -Mutante (45-462) nach 10- und 30-minütiger Inkubation bei 37 °C. Die durch Linien verbundenen Balken zeigen Werte von Zellen eines Ansatzes. Durch die Coinjektion des fluoreszenzmarkierten IgG war es möglich, zwischen den mit und ohne Mutante vorinkubierten Zellen zu unterscheiden.

**B:** Lokalisation von FL-BSA-NLS (**a**, **b**), STI-Cy3 (**c**, **d**), rC $\alpha$ myr-Cy3 (**e**, **f**) und MBP-Cy3 (**g**, **h**) in Abhängigkeit von der Importin  $\beta$ -Mutante (45-462) in nach 10-minütiger Inkubation bei 37 °C fixierten Vero-Zellen. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte mit einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop.

#### 4.1.6 Einfluß des Kernlokalisierungssignals SV40 NLS auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr in Konkurrenzexperimenten

Verläuft die Translokation zweier Moleküle in den Kern über den gleichen Importweg, so können sie um diesen konkurrieren, wenn von beiden benutzte Ressourcen wie Rezeptoren oder Bindungsstellen in begrenzter Anzahl vorkommen. Im folgenden wurde eine mögliche Konkurrenz zwischen dem Translokationsmechanismus von rC $\alpha$ myr mit dem klassischen NLS-abhängigen Importweg untersucht. Dazu wurde in Mikroinjektionsexperimenten, in denen rC $\alpha$ myr-Cy3 zusammen mit SV40 NLS-haltigem Protein bzw. SV 40 NLS-Peptid in Vero-Zellen injiziert wurde, überprüft, inwieweit die Translokation von rC $\alpha$ myr kompetitiv beeinflusst werden kann.

##### Kompetitionsstudie mit BSA-NLS

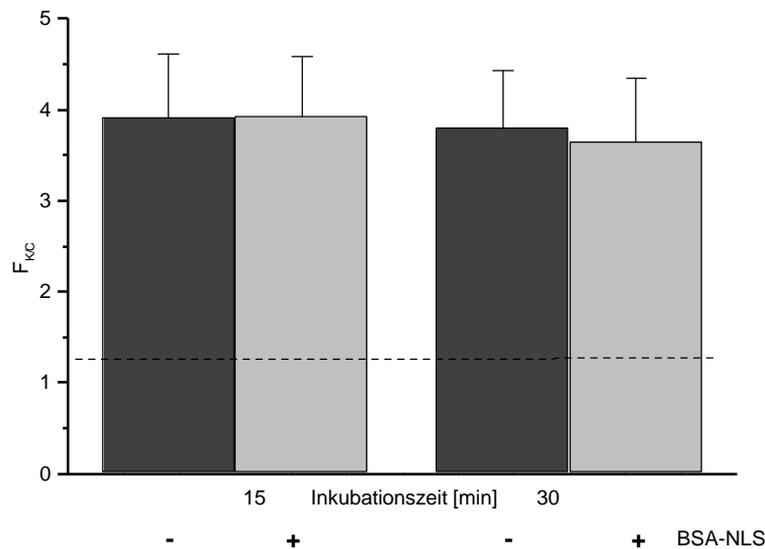
BSA-NLS wird aufgrund seines NLS aktiv in den Kern importiert. Dazu bedarf es Importrezeptoren und -faktoren, die den Transport durch die Kernporen vermitteln. Diese sind sättigbar. Für den Fall, daß rC $\alpha$ myr über den gleichen oder in Teilen gleichen Importmechanismus wie BSA-NLS in den Kern gelangen sollte, kann angenommen werden, daß sie mit BSA-NLS um diese Bindungspartner oder Bindungsstellen in den NPCs konkurriert.

Um das zu überprüfen, wurde in einer ersten Reihe von Konkurrenzexperimenten rC $\alpha$ myr mit unmarkiertem BSA-NLS in Vero-Zellen coinjiziert. Auf eine Fluoreszenzmarkierung wurde beim BSA-NLS verzichtet, um eine bei der Quantifizierung der Cy3-Fluoreszenz mögliche Beeinflussung durch einen zweiten Farbstoff auszuschließen. Im Falle einer Konkurrenz sollte die Verteilung des Enzyms zwischen Cytoplasma und Kern langsamer ablaufen, da anzunehmen ist, daß BSA-NLS mit seinen starken Importsignalen eine höhere Affinität zu Bindungspartner und -stellen hat und diese zunächst besetzt.

Abbildung 31 zeigt das Ergebnis der quantitativen Auswertung der intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 nach 15 und 30 Minuten Inkubationszeit.

Die Auswertung macht deutlich, daß die ermittelten mittleren  $F_{K/C}$ -Werte von rC $\alpha$ myr-Cy3, unabhängig von der erfolgten Coinjektion von BSA-NLS, nach 15- und 30-minütiger Injektionszeit bei einem Wert von 4 liegen. Daraus läßt sich folgern, daß das sich bei der Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 einstellende Gleichgewicht durch die Coinjektion von BSA-NLS nicht beeinträchtigt wird. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse scheint eine Aussage über eine mögliche Konkurrenz nur durch Messungen zu sehr frühen Zeitpunkten - wenn der schnelle Import von BSA-NLS abläuft - sinnvoll zu sein. Eine Antwort zur Aufklärung der Frage, ob sich der Translokationsmechanismus von rC $\alpha$ myr und BSA-NLS in einigen Bereichen überschneidet, kann durch diese Experimente nicht gegeben werden.

Unter Einbeziehung anderer Ergebnisse dieser Arbeit wird allerdings eine Translokation von rC $\alpha$ myr über den klassischen NLS-Importweg für unwahrscheinlich gehalten. Über einen möglichen Effekt der Coinjektion auf den Import von BSA-NLS kann nach diesen Experimenten keine Aussage gemacht werden.



**Abbildung 31: Coinjektion von rC $\alpha$ myr-Cy3 und BSA-NLS, der Kontrolle für den aktiven Transport**

Die Mikroinjektion und Auswertung erfolgte wie unter *Ergebnisse* 4.1.1 angegeben. In diesem Experiment wurde rC $\alpha$ myr-Cy3 allerdings zusammen mit BSA-NLS bzw. einer entsprechenden Menge PBS in die Vero-Zellen coinjiziert. Nach der Coinjektion wurden die Zellen noch für 15 bzw. 30 Minuten bei 37 °C inkubiert und dann fixiert.

### Kompetitionsstudien mit dem SV40 NLS-Peptid

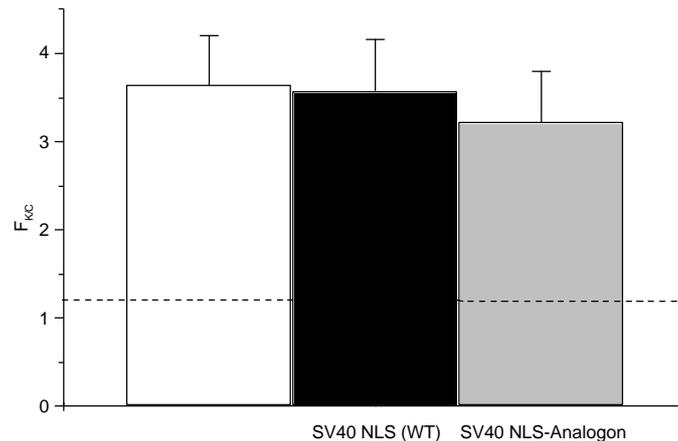
In einer zweiten Reihe von Konkurrenzexperimenten wurde rC $\alpha$ myr-Cy3 anstatt mit einem NLS-tragenden Protein mit SV40 NLS-Peptid allein in Vero-Zellen coinjiziert. In genügend hoher Konzentration angeboten, sollte es die Bindungsstellen des NLS-Rezeptormoleküls Importin  $\alpha$  besetzen und so den Import anderer Importsubstrate unterbinden können. Gegenüber den Experimenten mit BSA-NLS hatte das den Vorteil, daß Importin  $\alpha$  während des gesamten Experiments mit NLS-Peptid blockiert war und nicht nur für die Dauer des BSA-NLS-Imports. Als Kontrolle für Effekte des Peptids als solchem wurde eine inaktive Mutante des NLS-Peptids eingesetzt (Sequenz: s. *Anhang*).

Abbildung 32 zeigt die im Mittel erhaltenen  $F_{KC}$ -Verhältnisse von rC $\alpha$ myr-Cy3 nach Injektion von rC $\alpha$ myr-Cy3 allein und nach Coinjektion der Peptide nach 15-minütiger Inkubation.

Wie Abbildung 32 zeigt, hat die Zugabe des SV40 NLS-Peptids keinen Einfluß auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 in Vero-Zellen. Es scheint zu keiner Konkurrenz zu

kommen. Die geringe Beeinträchtigung der Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 in Gegenwart des Kontrollpeptids könnte in Verunreinigungen des Peptids begründet liegen.

Da die Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 durch SV40 NLS nicht beeinträchtigt zu sein scheint, kann ein Kernimport des Enzyms unter Vermittlung von Importin  $\alpha$  weitestgehend ausgeschlossen werden. Die Annahme, daß rC $\alpha$ myr nicht über den klassischen NLS-vermittelten Importweg in den Kern gelangt, wird weiter gestützt.



#### Abbildungen 32: Coinjektion von rC $\alpha$ myr-Cy3 und SV40 NLS-Peptid (WT) bzw. SV40 NLS-Analogen

rC $\alpha$ myr-Cy3 wurde zusammen mit dem jeweiligen Peptid, NLS-Peptid oder NLS-Peptid-Analogen bzw. einer entsprechenden Menge PBS in Vero-Zellen coinjiziert. Nach einer Inkubation von 15 Minuten bei 37 °C wurden die Zellen fixiert. Die Mikroinjektion und Auswertung erfolgte wie unter *Ergebnisse* 4.1.1 angegeben.

#### 4.1.7 Der Einfluß der Kinaseaktivität auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr in Vero-Zellen

Um zu überprüfen, ob die katalytische Aktivität der C $\alpha$ -Untereinheit für deren Translokation in den Kern notwendig ist, wurde der Einfluß von PKA-Inhibitoren wie H-8, H-89 oder PKI auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr in Vero-Zellen untersucht bzw. eine nahezu inaktive Mutante der C $\alpha$ -Untereinheit eingesetzt.

## Einfluß der PKA-Inhibitoren H-8 und H-89 auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr in Vero-Zellen

H-8 und H-89 (Biomol, Hamburg) sind synthetische Inhibitoren der PKA, die in Konkurrenz zu ATP im katalytischen Zentrum der C-Untereinheit binden [Chijiwa *et al.* 1990]. H-8 gilt als ein spezifischer Inhibitor von zyklischen Nukleotid-abhängigen Proteinkinasen [Hidaka *et al.* 1984]. Sein  $K_i$  für PKA wird mit 1,2  $\mu$ M angegeben [Hagiwara *et al.* 1987]. H-89 ist ein Derivat von H-8 und zeichnet sich mit einem  $K_i$  von 0,048  $\mu$ M durch eine wesentlich größere Spezifität für die C-Untereinheiten aus [Chijiwa *et al.* 1990]. *In vivo* wurden die Inhibitoren als Antagonisten des Forskolin-Effekts, d.h. der Aktivierung der C-Untereinheiten durch Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration, beschrieben [Chijiwa *et al.* 1990; Robin *et al.* 1998].

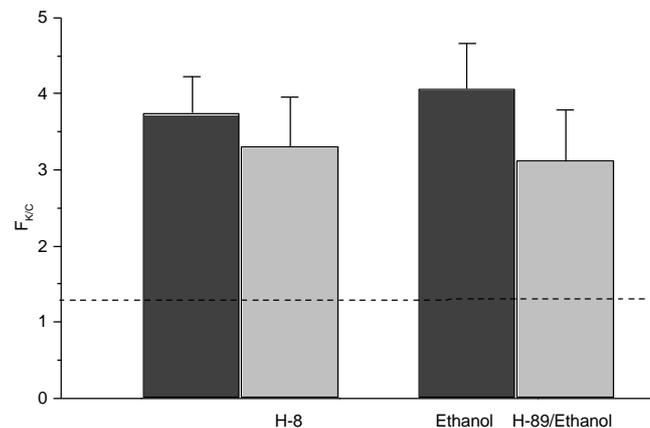
Um eine Inhibition durch H-8 bzw. H-89 zu erreichen, war es nach Robin *et al.* und Chijiwa *et al.* ausreichend, die Vero-Zellen für 30 Minuten in H-8- bzw. H-89-haltigem Medium zu inkubieren [Chijiwa *et al.* 1990; Robin *et al.* 1998]. In den hier beschriebenen Experimenten wurden die Zellen vor und nach der Mikroinjektion von rC $\alpha$ myr-Cy3 in H-8- bzw. H-89-haltigem Medium inkubiert.

Es zeigte sich, wie der Abbildung 33 zu entnehmen ist, daß rC $\alpha$ myr-Cy3 trotz Behandlung mit H-8 oder H-89 im Kern zu detektieren ist. Die Kinaseaktivität ist offenbar keine notwendige Voraussetzung für die Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3. Die sich nach 30 Minuten ergebenden  $F_{K/C}$ -Werte von rC $\alpha$ myr-Cy3 sind jedoch im Mittel nach H-8-Behandlung um 10 % und nach H-89-Behandlung um 20 % geringer als bei unbehandelten Vero-Zellen.

Es ist möglich, daß dieser Unterschied weniger in einer veränderten intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 als in der Abrundung der Zellen, die auf die katalytische Aktivität der PKA in den Zellen zurückzuführen ist, begründet liegt. Die höheren Werte für die Verteilungsverhältnisse  $F_{K/C}$  wären dann durch den größer gewordenen cytoplasmatischen Anteil an der gemessenen Kernfluoreszenz zu erklären. Diese morphologische Veränderung der Zellen, die durch die enzymatische Aktivität der C $\alpha$ -Untereinheit erzeugt und durch Inhibition der katalytischen Aktivität unterdrückt werden kann, wurde auch schon von Robin *et al.* [Robin *et al.* 1998] und Fantozzi *et al.* [Fantozzi *et al.* 1992] qualitativ beschrieben. Für diesen Erklärungsansatz spricht auch, daß der Effekt bei H-89 etwas größer ist als bei H-8, da die inhibitorische Wirkung von H-89 30-mal stärker ist als die von H-8 [Chijiwa *et al.* 1990], und daß der Effekt mit zunehmender Inkubationszeit zunimmt (Ergebnisse nicht gezeigt). Eine andere Interpretationsmöglichkeit wäre, daß die Retention von rC $\alpha$ myr-Cy3 im Kern durch Bindungspartner wie z.B. Substrate, deren Bindung im aktiven Zentrum der C $\alpha$ -Untereinheit durch die Inhibitoren beeinträchtigt ist, beeinflusst sein könnte.

Dem möglichen Einwand, daß der geringe Effekt der Inhibitoren auf die Lokalisation von rC $\alpha$ myr-Cy3 auf eine Unwirksamkeit der Inhibitoren zurückzuführen sein könnte, kann jedoch

begegnet werden. Zum einen konnte durch die beiden Inhibitoren der Kinase-spezifische Effekt auf die Morphologie der Zellen unterdrückt und zum anderen die inhibitorische Wirkung der beiden Inhibitoren auf rC $\alpha$ myr im Kinase-Assay bestätigt werden (Ergebnisse nicht gezeigt).



**Abbildung 33: Die intrazelluläre Verteilung von rCa myr-Cy3 in Abhängigkeit von den PKA-Inhibitoren H-8 und H89**

Zur Inhibierung der C $\alpha$ -Untereinheit wurden die Vero-Zellen vor der Mikroinjektion von rC $\alpha$ myr-Cy3 für 30 Minuten in 750  $\mu$ M H-8-haltigem bzw. 30  $\mu$ M H-89-haltigem Medium vorinkubiert. Nach der Mikroinjektion wurden die Zellen für weitere 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, wobei den zuvor mit Inhibitor inkubierten Zellen wieder Inhibitor ins Medium gegeben wurde. Da H-89 in Ethanol gelöst vorlag, war eine Ethanol-Kontrolle notwendig, um einen möglichen Ethanol-Effekt ausschließen zu können. Als Kontrolle für die H-8-Inhibitor-Lösung wurde dem Medium die entsprechende Menge H<sub>2</sub>O dest. zugegeben. Allen Zellen wurde 5 mM cAMP bzw. 8-Br-cAMP und 1 mM DTT zugesetzt. Die Mikroinjektion und Auswertung erfolgte wie unter *Ergebnisse* 4.1.1 angegeben.

### **Einfluß des Proteinkinase-Inhibitors PKI und von PKI-Peptiden auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr in Vero-Zellen**

Ein weiteres Experiment zur Untersuchung der Bedeutung der katalytischen Aktivität der PKA auf deren intrazelluläre Verteilung wurde in Gegenwart des thermostabilen Proteinkinase-Inhibitors (PKI) und eines davon abgeleiteten PKI-Peptids durchgeführt. PKI ist ein physiologischer Inhibitor der PKA. Außer seiner inhibitorischen Wirkung auf die C-Untereinheit besitzt er auch noch die Fähigkeit, diese über sein Exportsignal aktiv aus dem Kern zu exportieren. Das verwendete PKI-Peptid PKI<sub>myr</sub> (6-24) ist dagegen nur in der Lage, die C-Untereinheit zu inhibieren, entbehrt aber der Exportfunktion. PKI<sub>myr</sub> (6-24) wurde mit D-Arginin und einem C-terminalen Aspartylrest, der mit Cyclohexylmethyl verestert wurde, synthetisiert, um es durch diese Modifikation resistenter gegen Degradation in den Zellen zu machen [Fernandez *et al.* 1991]. Die N-terminale Myristylsäure des Peptids vermittelt die

Aufnahme des Inhibitorpeptids in die Zellen. Als Kontrolle diente ein Peptid mit identischen Modifikationen und identischer Aminosäure-Zusammensetzung, aber willkürlicher Sequenz (PKI<sub>myr</sub> (6-24) (random)).

Die Myristylierung des PKI-Inhibitor- und des Kontrollpeptids erlaubte es, die Vero-Zellen bereits vor der Mikroinjektion mit dem Inhibitor vorzueinkubieren. Das PKI-Protein, welches nicht membrangängig ist, wurde dagegen mit rC $\alpha$ myr-Cy3 in die Zellen coinjiziert.

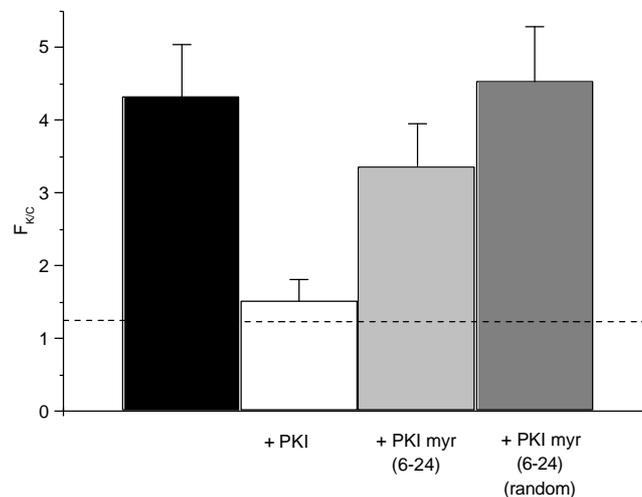
Wie den in Abbildung 34 dargestellten  $F_{K/C}$ -Werten von rC $\alpha$ myr-Cy3 zu entnehmen ist, haben das PKI-Protein und das PKI-Peptid einen unterschiedlich stark ausgeprägten Effekt auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3. So ist nach Coinjektion von PKI als Folge von dessen Exportfunktion kaum mehr rC $\alpha$ myr-Cy3 im Kern zu detektieren. Der für das Verteilungsverhältnis von rC $\alpha$ myr-Cy3 ermittelte  $F_{K/C}$ -Wert von  $1,5 \pm 0,3$  liegt nur wenig über dem von 1,2 bei Kernausschluß (s. *Ergebnisse* 2.4). Das Peptid PKI<sub>myr</sub> (6-24), das der Exportfunktion entbehrt, beeinträchtigt das Verhältnis  $F_{K/C}$  von rC $\alpha$ myr-Cy3 nicht so stark wie das PKI-Protein. Es zeigt lediglich eine Abnahme um 30% auf einen mittleren  $F_{K/C}$ -Wert von  $3,4 \pm 0,6$  im Vergleich zur Kontrolle. Das Kontrollpeptid PKI<sub>myr</sub> (6-24) (random) zeigt keinen Einfluß auf die Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 in der Zelle.

Der Unterschied in der Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 in unbehandelten bzw. in mit dem Kontrollpeptid PKI<sub>myr</sub> (6-24) (random) oder mit PKI<sub>myr</sub> (6-24) behandelten Zellen könnte auch hier dadurch zustande kommen, daß sich die Vero-Zellen aufgrund der durch die Mikroinjektion von rC $\alpha$ myr-Cy3 erhöhten intrazellulären Kinaseaktivität in Abwesenheit von Inhibitoren abzurunden beginnen, wodurch der cytoplasmatische Anteil an der gemessenen Kernfluoreszenz zunimmt. Vero-Zellen, in denen rC $\alpha$ myr inaktiviert wurde, bleiben dagegen flach, die ermittelten  $F_{K/C}$ -Werte geringer (s. o. unter H-8/H-89).

Die hier beschriebenen Mikroinjektionsexperimente mit PKI bzw. PKI<sub>myr</sub> (6-24) bestätigen die Beobachtungen von Fantozzi *et al.* (1992). Damals wurde bereits gezeigt, daß bei Coinjektion von PKI im Gegensatz zur Coinjektion des Peptids PKI(5-24) keine Akkumulation der C-Untereinheit im Kern zu beobachten ist. Der dort geäußerte Verdacht, daß die enzymatische Aktivität der Kinase für deren Akkumulation im Kern nicht notwendig sei, konnte durch die Experimente in dieser Arbeit bestätigt werden.

Zusammenfassend läßt sich also sagen, daß in Gegenwart von Inhibitoren wie H-8, H-89, PKI-Protein bzw. Inhibitorpeptid PKI<sub>myr</sub> (6-24) die Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 an sich nicht, oder nicht wesentlich, beeinträchtigt zu sein scheint. Daß dies nicht an der mangelnden inhibitorischen Wirkung liegt, zeigt sich darin, daß die Induktion morphologischer Veränderungen der Zellen wie das leichte Sich-Abrunden und das Ausbilden von Zellausläufern durch PKA unterdrückt wird, d.h., daß rC $\alpha$ myr und die intrinsische PKA inhibiert werden. Anders als bei den Inhibitorpeptiden kommt es nur nach Coinjektion von PKI-Protein zusätzlich noch zu einer beinahe rein cytoplasmatischen

Lokalisation von rC $\alpha$ myr-Cy3, was nicht durch eine verminderte Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 in den Kern, sondern den PKI-vermittelten aktiven Export des Enzyms aus dem Kern zu erklären ist.



**Abbildung 34: Einfluß von PKI bzw. PKI myr (6-24) auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 in Vero-Zellen**

Zur Inhibition von rC $\alpha$ myr-Cy3 mit myristyliertem PKI-Peptid wurden die logarithmisch wachsenden Vero-Zellen 30 Minuten lang in 50  $\mu$ M PKI myr (6-24) bzw. dem Kontrollpeptid PKI myr (6-24) (20-facher molarer Überschuß) inkubiert. rC $\alpha$ myr-Cy3 (1 mg/ml) wurde in die Zellen mikroinjiziert. Die Zellen wurden nach 10 Minuten Inkubation bei 37 °C in entsprechendem Medium mit PFA fixiert. Die Inhibition durch das PKI-Protein erfolgte durch Coinjektion des PKI (12,5  $\mu$ M) und anschließender Inkubation der Zellen für 10 Minuten. Alle Ansätze wurden mit 5 mM cAMP bzw. 8-Br-cAMP und 1 mM DTT behandelt. Die Mikroinjektion und Auswertung erfolgte wie unter *Ergebnisse* 4.1.1 angegeben.

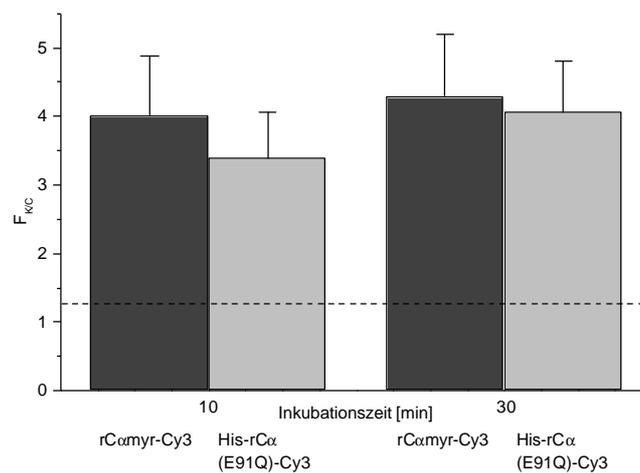
### Intrazelluläre Verteilung der zu 90% inaktiven Ca-Mutante His-rCa (E91Q) in Vero-Zellen

Um die Notwendigkeit der Kinaseaktivität für die Translokation von rC $\alpha$ myr unabhängig von Inhibitoren überprüfen zu können, wurde eine Mutante der C $\alpha$ -Untereinheit eingesetzt, deren spezifische Aktivität nur noch 10 % von der des Wildtyps beträgt (persönliche Mitteilung, T. Schneider, DKFZ, Heidelberg). Bei der Mutante war Glutamat 91 gegen Glutamin ausgetauscht. Das Glutamat 91 ist über eine Salzbrücke mit dem Lysin 72, dem eine Rolle bei der Bindung des ATP im katalytischen Zentrum zukommt, verbunden. Durch den Aminosäureaustausch an der Position 91 sollte die Nukleotidbindung im aktiven Zentrum untersucht werden. Die Mutante wurde von Herrn T. Schneider (DKFZ, Heidelberg) zur Verfügung gestellt. Diese am N-Terminus His-tag-fusionierte, nicht myristylierte C $\alpha$ -Mutante wird im folgenden mit His-rC $\alpha$  (E91Q) bezeichnet.

Abbildung 35 gibt die  $F_{K/C}$ -Verhältnisse an, die die Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 oder His-rC $\alpha$  (E91Q)-Cy3 nach 10- bzw. 30-minütiger Inkubation wiedergeben.

Wie die Ergebnisse zeigen, kann His-rC $\alpha$  (E91Q)-Cy3 trotz seiner geringen katalytischen Aktivität in den Kern gelangen. Für Wildtyp und Mutante ergeben sich sogar sowohl nach 10- als auch nach 30-minütiger Inkubationszeit sehr ähnliche Werte für  $F_{K/C}$ . Der Grund für die um ca. 10 % geringeren  $F_{K/C}$ -Werte der Mutante läßt sich wie zuvor in den bereits beschriebenen morphologischen Veränderungen der Vero-Zellen vermuten (s. o. unter H-8/H-89).

Die Experimente mit der weitestgehend inaktiven Mutante His-rC $\alpha$  (E91Q) konnte die zuvor beschriebenen an den Inhibitoren H-8, H-89 und PKI gemachten Beobachtungen bestätigen: Die katalytische Aktivität der C $\alpha$ -Untereinheit ist weder für deren Translokation in den Kern noch für deren intrazelluläre Verteilung von größerer Bedeutung.



**Abbildung 35: Intrazelluläre Verteilung der nahezu inaktiven C $\alpha$ -Mutante His-C $\alpha$  (E91Q)-Cy3 in Vero-Zellen im Vergleich zu rC $\alpha$ myr-Cy3**

His-rC $\alpha$  (E91Q)-Cy3 oder rC $\alpha$ myr-Cy3 wurden in das Cytoplasma von Vero-Zellen injiziert. Die anschließende Inkubation erfolgte für 10 bzw. 30 Minuten bei 37 °C. Das Experiment wurde in Anwesenheit von 5 mM cAMP bzw. 8-Br-cAMP und 1mM DTT durchgeführt. Die Mikroinjektion und Auswertung erfolgte wie unter *Ergebnisse* 4.1.1 angegeben.

#### 4.1.8 Cytochalasin B – Abhängigkeit der intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr in Vero-Zellen vom Cytoskelett

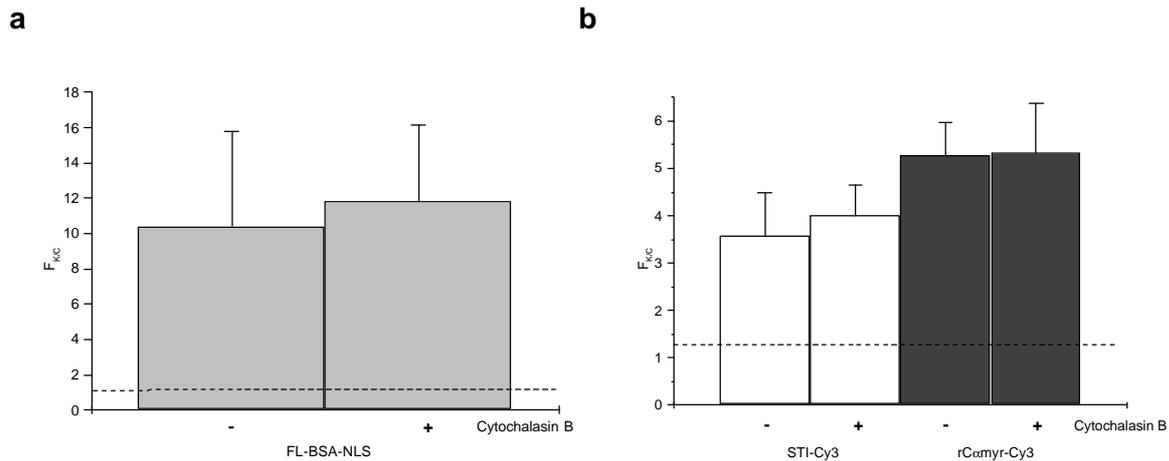
Für eine andere Proteinkinase, die Proteinkinase C (PKC), konnte von Schmalz *et al.* (1996/1998) gezeigt werden, daß ein intaktes Cytoskelett Voraussetzung für die Translokation der Kinase in den Kern ist [Schmalz *et al.* 1998; Schmalz *et al.* 1996]. Dazu waren Gewebekulturzellen mit Cytochalasin B oder Colchicin, beides das Cytoskelett zerstörende, Membran-permeable Toxine, behandelt worden und anschließend nach Stimulation der Kinase, z.B. nach Phorbol-12-myristat-13-acetat-Behandlung, das Translokationsverhalten der PKC verfolgt worden. In den von Schmalz *et al.* durchgeführten Experimenten blieb PKC in Cytochalasin B- bzw. Colchicin-behandelten Zellen vom Kern ausgeschlossen. Da am Cytoskelett Bindungsstellen für PKC nachgewiesen werden konnten, wird angenommen, daß die Proteinkinase entlang dieser Bindungsstellen in den Kern transportiert werden kann. Der NLS-vermittelte aktive Import zeigte diese Abhängigkeit nicht.

Um die Abhängigkeit der Kern-Cytoplasma-Translokation von rC $\alpha$ myr von der Intaktheit des Cytoskeletts zu überprüfen, sollte zunächst das Cytoskelett der Vero-Zellen zerstört werden. Dazu wurden die Vero-Zellen in Gegenwart von 2  $\mu$ M Cytochalasin B für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Mikroinjektion von rC $\alpha$ myr-Cy3 und der Kontrollproteine erfolgte erst danach.

Abbildung 36 zeigt die mittleren  $F_{KC}$ -Werte von rC $\alpha$ myr-Cy3 (b), STI-Cy3 (b) und FL-BSA-NLS (a) in Vero-Zellen nach Cytochalasin B-Behandlung und in unbehandelten Zellen.

In dieser Arbeit konnte bei keiner der injizierten Proben eine Inhibition oder Beeinträchtigung der Translokation in den Kern in Gegenwart von Cytochalasin B beobachtet werden. Die mittleren  $F_{KC}$ -Werte sanken nicht ab, sondern stiegen nach Cytochalasin B-Vorinkubation wie beim STI-Cy3 (Abb. 36 b) und FL-BSA-NLS (Abb. 36 a) leicht an. Die nach Cytochalasin B-Behandlung etwas erhöhten  $F_{KC}$ -Werte rühren daher, daß sich die Zellen durch die Behandlung mit Cytochalasin B, welches das Depolymerisieren der Aktinfilamente zur Folge hat, abrunden, wodurch sich offenbar der Beitrag der Cytoplasma-Fluoreszenz um den Wert für die Kern-Fluoreszenz erhöht.

Der in der Literatur beschriebene Effekt für PKC konnte für PKA nicht bestätigt werden. Es scheint deshalb unwahrscheinlich, daß rC $\alpha$ myr und PKA einen ähnlichen Translokationsmechanismus haben. Eine unmittelbare Bedeutung des Cytoskeletts konnte auch hier weder für den klassischen Importweg über NLS noch für die freie Diffusion nachgewiesen werden.



**Abbildung 36: Einfluß von Cytochalasin B auf die intrazelluläre Verteilung von rCamyr-Cy3 und Kontrollen in Vero-Zellen**

Um das Cytoskelett in Vero-Zellen zu zerstören, wurden die Zellen vor der Mikroinjektion für eine Stunde in serumfreiem Medium mit Cytochalasin B (2  $\mu$ M) inkubiert. Die Kontrollzellen wurden in serumfreiem Medium ohne Cytochalasin B (2  $\mu$ M) gehalten. Die fluoreszenzmarkierten Proben FL-BSA-NLS (**a**), rCamyr-Cy3 und STI-Cy3 (**b**) wurden zusammen mit cAMP (5 mM) und DTT (1 mM) injiziert. Die Inkubation der Vero-Zellen nach der Mikroinjektion erfolgte für 15 Minuten bei 37 °C. Je nach experimentellem Ansatz wurde Cytochalasin B-haltiges oder -freies Medium verwendet. Die Mikroinjektion und Auswertung erfolgte wie unter *Ergebnisse* 4.1.1 angegeben.

#### 4.1.9 Der aktive Export von rCamyr aus dem Kern

Nach Fantozzi *et al.* [Fantozzi *et al.* 1992] kann die freie C-Untereinheit der PKA sowohl durch Diffusion als auch über aktiven Export aus dem Kern wieder ins Cytoplasma gelangen. Da sie selbst kein Kernexportsignal (NES) ausweist, ist für den aktiven Export eine Bindung an ihren physiologischen Inhibitor PKI erforderlich, der dadurch sein NES exponiert. Das NES wird von dem Exportrezeptor Exportin-1 (CRM 1) erkannt, der daraufhin den schnellen aktiven Export des C-Untereinheit-PKI-Komplexes katalysieren kann.

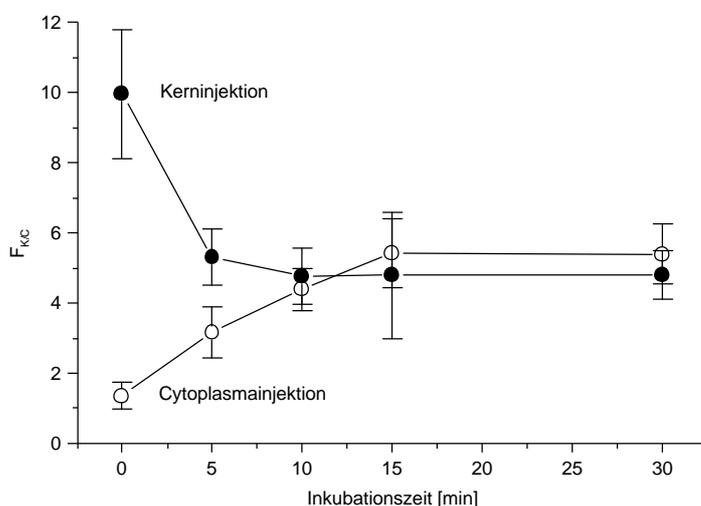
Da bei den Experimenten zur Translokation von rCamyr-Cy3 nur das sich einstellende Verhältnis  $F_{K/C}$  als Folge der Kern-Cytoplasma-Translokation von rCamyr-Cy3 betrachtet werden kann, ist es nicht möglich, zwischen dem Einfluß der Translokation in den Kern und der aus dem Kern zu unterscheiden. Der Beitrag des aktiven Exports ist zudem nicht konstant, da sich die Expression und die Verteilung von PKI in der Zelle Zellzyklus-abhängig verändert [Wen *et al.* 1995]. Es wurde deshalb untersucht, welche Rolle der Export bei der Verteilung von rCamyr hat und inwieweit die in dieser Arbeit ermittelten Verhältnisse  $F_{K/C}$  vom aktiven Export beeinflusst sind.

### Kinetik der intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr nach Kern- oder Cytoplasma-Injektion

Um Unterschiede im Mechanismus der Translokation von rC $\alpha$ myr in den Kern bzw. aus dem Kern heraus aufzudecken, wurde die Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 nach Injektion in den Kern und in das Cytoplasma zu unterschiedlichen Zeitpunkten verglichen. Anhand der so aufgenommenen Kinetiken sollte es möglich sein, zwischen Diffusion bzw. aktivem Export zu unterscheiden.

Die in Abbildung 37 dargestellten Kinetiken zeigen, daß rC $\alpha$ myr-Cy3 nach Mikroinjektion in Vero-Zellen sowohl vom Cytoplasma in den Kern als auch vom Kern ins Cytoplasma gelangen kann. Die sich einstellende Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 erreicht im Gleichgewicht ein Plateau, dessen Höhe unabhängig vom Ort der Injektion ist. Während dieses Plateau nach Injektion in den Kern bereits nach ca. 5 Minuten erreicht ist, braucht es dazu nach Injektion ins Cytoplasma ungefähr 10 - 15 Minuten. Das Gleichgewicht stellt sich folglich nach der Kerninjektion dreimal schneller ein als nach Cytoplasma-Injektion. Diese Beobachtung spricht dafür, daß rC $\alpha$ myr-Cy3 aktiv aus dem Kern exportiert wurde. Daß die Moleküle im Cytoplasma, das ausgebreiteter ist als der Kern, im Mittel längere Wege bis zur Kernmembran zurücklegen müssen, spielt keine Rolle, da die Diffusionsgeschwindigkeit wesentlich höher ist als die Differenz von 10 Minuten. Die sich einstellende Verteilung im Gleichgewichtszustand wird demnach neben der Diffusion durch den aktiven Export kontrolliert. Bei reiner Diffusion in beiden Richtungen wäre kein Unterschied in Import und Export zu erwarten gewesen.

Eine zusätzliche Triebkraft für den raschen Export könnte eine Reihe von höheraffinen Bindungsstellen im Cytoplasma als im Kern sein, die rC $\alpha$ myr-Cy3 aus dem Verteilungsgleichgewicht ziehen und damit das Konzentrationsgefälle des Enzyms länger hochhalten konnten.



**Abbildung 37: Kinetik der Translokation von rC $\alpha$ myr nach Mikroinjektion in das Cytoplasma bzw. in den Kern von Vero-Zellen**  
rC $\alpha$ myr-Cy3 (1 mg/ml) wurde in die Kerne bzw. ins Cytoplasma von exponentiell wachsenden Vero-Zellen injiziert. Die Vero-Zellen wurden daraufhin ohne vorherige Inkubation bzw. nach 5-, 10-, 15- und 30-minütiger Inkubation bei 37 °C fixiert. Die Mikroinjektion und Auswertung erfolgte wie unter *Ergebnisse* 4.1.1 angegeben.

### **Inhibition des aktiven Exports von rC $\alpha$ myr durch Leptomycin B**

Um den aktiven Export von rC $\alpha$ myr durch PKI gezielt zu inhibieren und damit den Einfluß von PKI auf die Kern-Cytoplasma-Verteilung von rC $\alpha$ myr aufzudecken, wurde Leptomycin B (LMB) eingesetzt. LMB ist ein cytotoxischer Metabolit aus Streptomyceten, der den aktiven NES-abhängigen Kernexport von Proteinen über den Exportrezeptor Exportin-1 inhibieren kann [Fukuda *et al.* 1997]. Seine cytotoxische Wirkung liegt in der Blockade des Zellzyklus in Eukaryoten [Hamamoto *et al.* 1983]. Die Inhibition des Exports ist eine Folge der Bindung des LMB an Exportin-1 [Kudo *et al.* 1998] und der daraus resultierenden Blockierung der Bindung des NES-tragenden Exportsubstrates an den Exportrezeptor. Eine Behandlung von Zellen mit LMB ermöglicht es, den aktiven Export zu unterbinden, ohne die Diffusion oder den aktiven Kernimport zu beeinträchtigen.

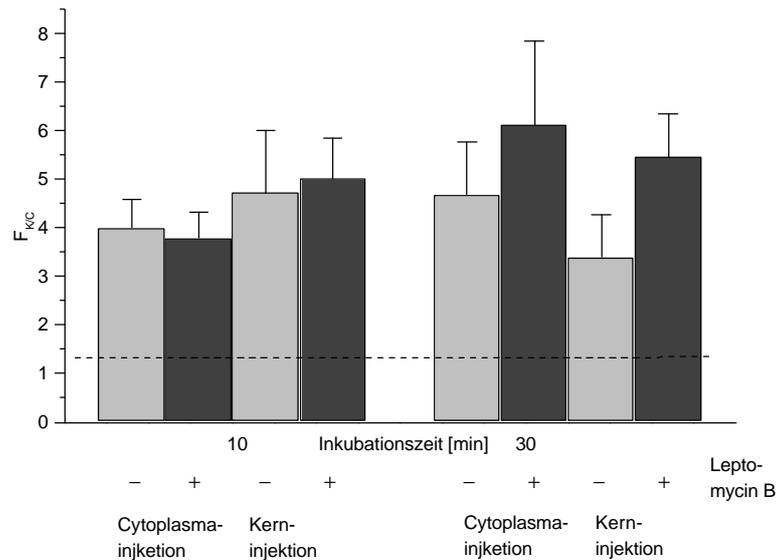
Zur Inhibierung des PKI-vermittelten Exports von rC $\alpha$ myr wurden die Vero-Zellen mit LMB, das als ungesättigte Fettsäure membrangängig ist, in einer Konzentration von 0,2 ng/ml für 30 Minuten zur Absättigung des Exportfaktors Exportin-1 mit LMB vorinkubiert [Fukuda *et al.* 1997]. Die Mikroinjektion von rC $\alpha$ myr-Cy3 erfolgte entweder in das Cytoplasma oder in den Kern der Vero-Zellen. Um die Inhibition des aktiven Exports weiterhin aufrechtzuerhalten, wurden die Zellen auch nach der Injektion in LMB-haltigem Medium gehalten. LMB wurde von Herrn M. Yoshida (Universität Tokio, Japan) zur Verfügung gestellt.

In Abbildung 38 ist das Ergebnis der quantitativen Auswertung der intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 in einem beispielhaften Mikroinjektionsexperiment mit LMB gezeigt. Es sind die mittleren  $F_{K/C}$ -Werte dargestellt.

Wie aus der Abbildung hervorgeht, ist nach 10-minütiger noch kein, nach 30-minütiger jedoch ein deutlicher Effekt von LMB auf die Kern-Cytoplasma-Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 zu beobachten. Die mit LMB behandelten Vero-Zellen zeigen unabhängig vom Injektionsort nach einer Inkubation von 30 Minuten bis zu 40 % höhere  $F_{K/C}$ -Werte als die in Abwesenheit von LMB inkubierten Zellen. Der Anteil an rC $\alpha$ myr-Cy3 im Kern ist durch die LMB-Behandlung wesentlich erhöht. Aus den Daten geht demnach hervor, daß die Lokalisation von rC $\alpha$ myr-Cy3 durch den aktiven Export deutlich beeinflusst zu werden scheint.

Die Beobachtung, daß der nach 30-minütiger Inkubation auftretende Effekt durch LMB auf die Verteilung der C $\alpha$ -Untereinheit nach 10-minütiger Inkubation noch nicht zu erkennen ist, könnte eine Frage der LMB-Verfügbarkeit in den Zellen sein, da die längere Inkubation auch einer längeren Exposition der Zellen gegenüber LMB gleichkommt.

Es ist allerdings auch nicht auszuschließen, daß es sich bei dem nach 30 Minuten auftretenden Effekt um einen Sekundäreffekt handelt. Dieser könnte aus der Inhibierung des Exports anderer Moleküle resultieren, da durch LMB nicht nur der PKI-vermittelte Export der C $\alpha$ -Untereinheit, sondern alle über Exportin-1 katalysierten Exporte inhibiert werden.



**Abbildung 38: Einfluß von LMB durch Inhibition des PKI-vermittelten aktiven Exports auf das Verhältnis  $F_{K/C}$  von rCaMyr-Cy3 in Vero-Zellen**

Die Mikroinjektion und Auswertung erfolgte wie unter *Ergebnisse* 4.1.1 angegeben. In diesem Experiment wurden die Vero-Zellen jedoch 30 Minuten vor und 10 bzw. 30 Minuten nach der Injektion von rCaMyr-Cy3 (1 mg/ml) in Leptomycin B-haltigem (0,2 ng/ml) bzw. -freiem Medium bei 37 °C inkubiert. Die Injektion der Probe erfolgte entweder in das Cytoplasma (Cytoplasmainjektion) oder in den Kern (Kerninjektion) der Vero-Zellen.

## 4.2 Untersuchungen zur Kern-Cytoplasma-Translokation von rCaMyr in Import-Assays

Als eine zur Mikroinjektion alternative Methode wurden sogenannte 'Import-Assays' durchgeführt, in denen mit permeabilisierten Zellen gearbeitet wurde [Adam *et al.* 1990]. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte in Gegenwart einer geringen Konzentration an Digitonin, durch das die cholesterinreiche Plasmamembran selektiv permeabilisiert wurde. Die Permeabilisierung hatte zwei Konsequenzen. Zum einen konnte so die fluoreszenzmarkierte Probe durch die löchrige Plasmamembran in die Zellen gelangen, was am Fluoreszenzmikroskop verfolgt werden konnte. Zum anderen führte die Permeabilisierung zum Verlust der löslichen cytoplasmatischen Fraktion, was ein Screening nach den für den Kernimport essentiellen löslichen Faktoren erlaubte. Es wurden sowohl Endpunktbestimmungen durchgeführt als auch Kinetiken aufgenommen, um das Translokationsverhalten von rCaMyr-Cy3 zu untersuchen.

Die Import-Assays wurden in Zusammenarbeit mit Frau K. Ribbeck (Abteilung D. Görlich, ZMBH, Heidelberg) durchgeführt. Da der experimentelle Aufbau auf HeLa-Zellen abgestimmt war, wurden in allen Import-Assays anders als in den Mikroinjektionsexperimenten HeLa-Zellen verwendet.

#### 4.2.1 Vergleich der Translokation von rCαmyr und Kontrollproteinen in die Kerne permeabilisierter HeLa-Zellen

Zunächst wurde die intrazelluläre Verteilung von rCαmyr-Cy3 und der Kontrollen für Diffusion und aktiven Transport im Import-Assay verglichen. Dazu wurden Digitonin-permeabilisierte HeLa-Zellen für 3 Minuten mit den fluoreszenzmarkierten Proteinen in einem Import-Mix (s. *Abbildungslegende*) bei RT inkubiert.

In Abbildung 39 sind Aufnahmen der permeabilisierten HeLa-Zellen nach 3-minütiger Inkubation mit den entsprechenden fluoreszenzmarkierten Proben gezeigt.

Es zeigte sich, daß die eingesetzten Proben FL-BSA-NLS, STI-Cy3, rCαmyr-Cy3 und MBP-Cy3 sich sehr unterschiedlich verhielten.

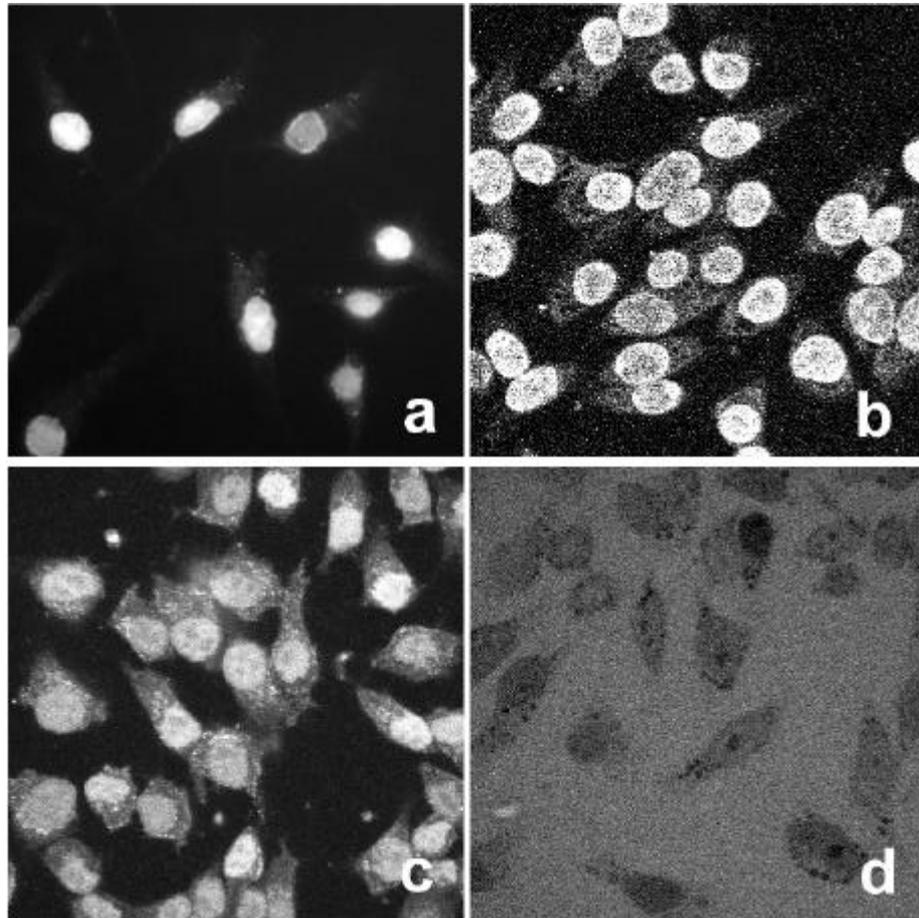
Wie aus Abbildung 39 a hervorgeht, akkumuliert FL-BSA-NLS als Kontrolle für den aktiven Kernimport deutlich im Kern. Im Cytoplasma ist dagegen kaum Fluoreszenz zu beobachten. Der aktive Import des FL-BSA-NLS in die Kerne der HeLa-Zellen scheint schnell und effizient zu sein. Wie Vorversuche gezeigt hatten (Ergebnisse nicht gezeigt), war es jedoch erforderlich, dem Import-Reaktionsmix Retikulozytenextrakt als Cytosol-Substitut sowie ein Energie-regenerierendes System zuzusetzen, um überhaupt einen Import in den Kern beobachten zu können. Außerdem bedurfte es der Zugabe von Importin  $\alpha$ , da die Konzentration an Importin  $\alpha$  im Gegensatz zu der von Importin  $\beta$  im substituierten cytoplasmatischen Extrakt zu gering war: eine Bestätigung für die Notwendigkeit von Importfaktoren wie z.B. Importin  $\alpha$  und Energie beim aktiven NLS-vermittelten Import.

Das Ergebnis der Diffusionskontrolle MBP-Cy3 stellt ein anderes Extrem dar. Hier kam es weder nach längerer Inkubation noch nach Substitution des Cytosols zu einer Anreicherung in den Zellen (Abb. 39 d). Die Fluoreszenz verteilte sich gleichmäßig zwischen Kern, Cytoplasma und dem die Zellen umgebenden Reaktionsmedium. Die Probe schien sich vollständig inert gegenüber jeglichen Bindungen zu Strukturen der Zelle zu verhalten.

STI-Cy3 (Abb. 39 b) als weitere Diffusionskontrolle zeigte sich ganz anders als MBP-Cy3. Schon nach weniger als einer Minute war auch ohne Substitution cytoplasmatischer Faktoren eine deutliche Anreicherung von STI-Cy3 im Kern zu erkennen (Kinetik nicht gezeigt). Da STI-Cy3 wie MBP-Cy3 auch über Diffusion in den Kern gelangt, mußten Bindungsstellen, die STI-Cy3 aus dem Diffusionsgleichgewicht ziehen konnten, der Grund für die Akkumulation von STI-Cy3 in den Kernen der HeLa-Zellen sein.

Für rCαmyr-Cy3 konnte beobachtet werden, daß es sich im Verlauf des Import-Assays in Cytoplasma und Kern anreicherte. Wie aus Abbildung 39 c hervorgeht, war die Verteilung von rCαmyr-Cy3 allerdings weder mit der von STI-Cy3 (Abb. 39 b) noch mit der von FL-BSA-NLS (Abb. 39 a) zu vergleichen. Der Assay ergab, daß eine Substitution des Cytosols für die Translokation des Enzyms in den Kern nicht erforderlich war. Durch den Vergleich zu den

Kontrollen deutete sich für rC $\alpha$ myr-Cy3 die Möglichkeit an, daß Bindungsstellen in den Zellkompartimenten die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 beeinflussen können.



**Abbildung 39: Vergleich der intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 und Kontrollproteinen nach Translokation in die Kerne Digitonin-permeabilisierter HeLa-Zellen**

Die Kerne Digitonin-permeabilisierter HeLa-Zellen wurden mit FL-BSA-NLS (a), STI-Cy3 (b), rC $\alpha$ myr-Cy3 (c) oder MBP-Cy3 (d) in Gegenwart von cAMP (5 mM) und DTT (1 mM) für 3 Minuten inkubiert. Der Reaktionsmix mit FL-BSA-NLS enthielt zudem noch Retikulozytenextrakt, Importin  $\alpha$  (3  $\mu$ M) und Energiemix (2x) (1 mM ATP, 1 mM GTP, 20 mM Kreatininphosphat und 50  $\mu$ g/ml Kreatinkinase). Nur im Ansatz mit FL-BSA-NLS wurde die Inkubation durch Fixieren der Zellen gestoppt und die Fluoreszenz im herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop detektiert. Bei den anderen Proben wurden die Rasteraufnahmen der nicht fixierten Zellen nach 3-minütiger Inkubation durch den Reaktionsmix hindurch im CLSM aufgenommen.

#### 4.2.2 Import-Kinetiken von rC $\alpha$ myr in die Kerne permeabilisierter HeLa-Zellen

Um den Verlauf der Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 in die Kerne permeabilisierter HeLa-Zellen von Anfang an beobachten zu können, wurde rC $\alpha$ myr-Cy3 zu den bereits im CLSM fokussierten Zellen gegeben.

Unter Abbildung 40 sind die aufgenommene Kinetik von rC $\alpha$ myr-Cy3 sowie Rasteraufnahmen der HeLa-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten des Import-Assays gezeigt.

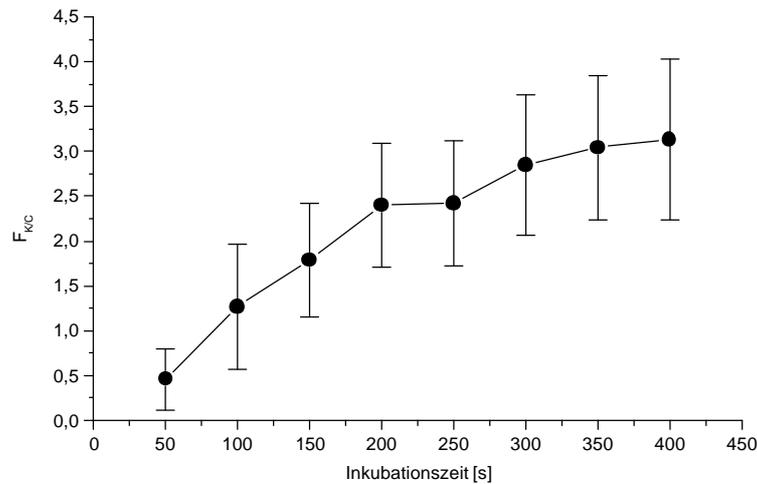
Wie aus den Rasteraufnahmen hervorgeht (Abb. 39B), nahm die detektierte Fluoreszenz in Kern und Cytoplasma der HeLa-Zellen in ihrer Intensität über den beobachteten Zeitraum hin stetig zu. Die frühen Aufnahmen zeigen, daß sich rC $\alpha$ myr-Cy3 zuerst im Cytoplasma anreicherte und erst dann in den Kern zu gelangen schien. Die Fluoreszenzintensität im Kern vergrößerte sich demnach gegenüber der im Cytoplasma mit Verzögerung. Die quantitative Auswertung der Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 in den Zellen ergab (Abb. 40A), daß die  $F_{K/C}$ -Werte im Mittel während der ersten 200 Sekunden linear ansteigen und danach in ein Plateau übergehen ( $F_{K/C}$  von  $3 \pm 0,7$ ).

Es sind deutliche Unterschiede in den Fluoreszenzintensitäten zwischen den Zellen zu erkennen, die u.a. durch eine unterschiedlich ausgeprägte Permeabilisierung der Zellen bedingt sein kann.

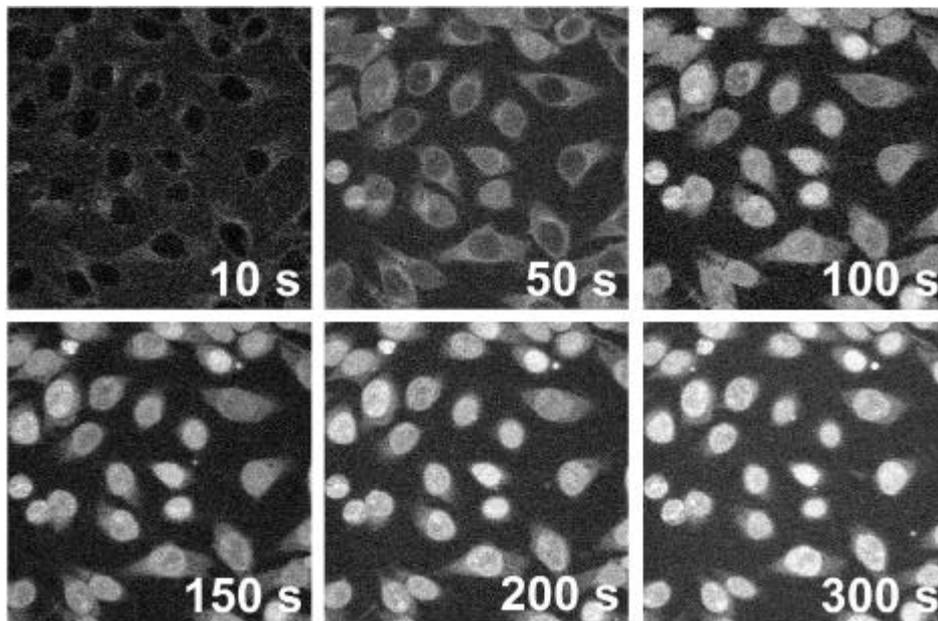
Verglichen mit den Import-Kinetiken aktiv in den Kern importierter Moleküle verlief die von rC $\alpha$ myr-Cy3 wesentlich langsamer (persönliche Mitteilung, Frau K. Ribbeck, ZMBH, Heidelberg).

Ein Vergleich der Kinetik von rC $\alpha$ myr-Cy3 mit der der Diffusionskontrolle MBP-Cy3 war nicht möglich, da diese nicht in den Zellen akkumulierte und die Zellen so nur schwer von dem sie umgebenden Medium zu unterscheiden waren (Abb. 39 d).

A



B



#### Abbildung 40: Verlauf der Translokation von rCαmyr-Cy3 in Digitonin-permeabilisierten HeLa-Zellen

Die Translokation von rCαmyr-Cy3 (1 μM) in die Kerne Digitonin-permeabilisierter HeLa-Zellen wurde bei RT im Beisein von Energiemix (2x) (1 mM ATP, 1 mM GTP, 20 mM Kreatinphosphat und 50 μg/ml Kreatinkinase), Ran-Mix (2x) (3 μM Ran-GDP, 0,3 μM NTF2, 0,3 μM RanBP1 und 0,2 μM Ran 1p), DTT (1 mM) und 8-Br-cAMP (1 mM) am CLSM verfolgt. Die Rasteraufnahmen wurden ohne vorherige Fixierung durch den Reaktionsmix hindurch aufgenommen.

**A:** Verlauf von  $F_{K/C}$  von rCαmyr-Cy3 in permeabilisierter HeLa-Zellen über einen Zeitraum von 400 Sekunden. Die quantitative Auswertung erfolgte nach der in *Material und Methoden* 5.7 und *Ergebnisse* 2 beschriebenen Methode.

**B:** Rasteraufnahmen der permeabilisierten HeLa-Zellen während der fortschreitenden Translokation von rCαmyr-Cy3 in die Kerne der HeLa-Zellen nach 10, 50, 100, 150, 200 und 300 Sekunden

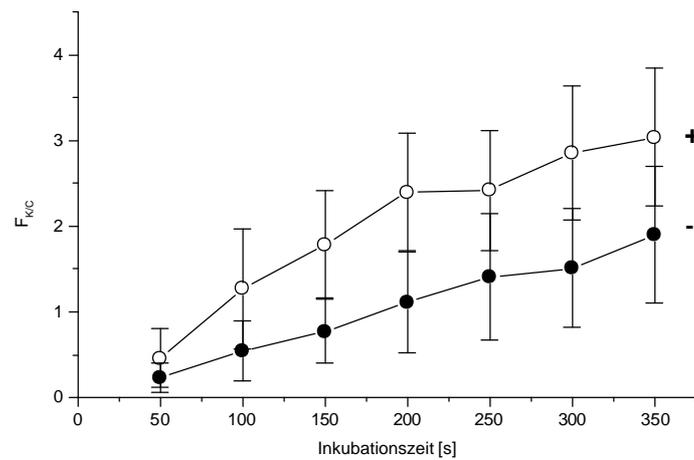
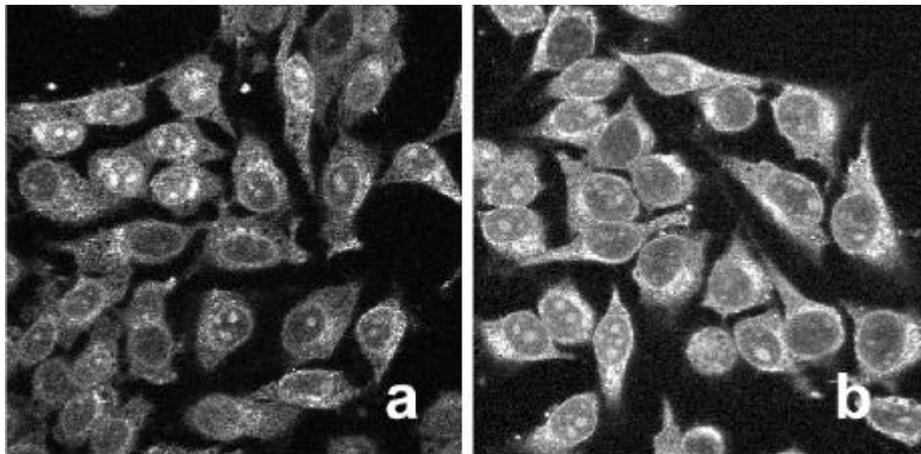
#### 4.2.3 Einfluß von Energie-regenerierendem und Ran-System auf die Translokation von rC $\alpha$ myr in die Kerne permeabilisierter HeLa-Zellen

Mit Hilfe des Import-Assays ließ sich zeigen, daß rC $\alpha$ myr-Cy3 offenbar auch ohne die lösliche cytoplasmatische Fraktion in die Kerne der Digitonin-permeabilisierten Zellen gelangen kann. Für die Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 scheinen somit weder Importfaktoren noch Energie zwingend erforderlich zu sein. Dennoch sollte im folgenden Assay überprüft werden, ob sich die Translokation und damit die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 durch Zugabe eines Energie-regenerierenden Systems und Komponenten des Ran-Systems beeinflussen ließen. Dazu wurde die Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 in Import-Assays mit und ohne Substituten verfolgt. Es zeigte sich, daß durch Zugabe eines Energie-regenerierenden Systems und eines Ran-Mixes, der die wichtigen Komponenten des Ran-GTPase-Systems enthält, zwischen 40 und 60 % höhere  $F_{K/C}$ -Werte erreicht wurden als im Ansatz ohne Substitute (Abb. 41A). Auch wenn Energie und Ran nicht essentiell sein sollten, so scheinen sie die Kern-Cytoplasma-Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 doch zu fördern. Es ist jedoch nicht auszuschließen, daß es sich bei dem beobachteten Effekt um einen Sekundäreffekt handelt.

In Abbildung 41A sind die Kinetiken der Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 in die Kerne permeabilisierter HeLa-Zellen mit und ohne Zugabe von Ran- und Energie-Mix dargestellt. Abbildung 41B zeigt Rasteraufnahmen von Zellen unter den jeweiligen Bedingungen nach 6-minütiger Inkubation.

Um gezielt den Einfluß der GTPase Ran auf das Translokationsverhalten von rC $\alpha$ myr-Cy3 in permeabilisierten HeLa-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen vor Beginn des Assays mit der Hydrolyse-defizienten Ran-Mutante Ran(Q69L) inkubiert. rC $\alpha$ myr-Cy3 konnte auch ohne Zugabe von Komponenten des Ran-Systems im Kern nachgewiesen werden. Deshalb war nicht anzunehmen, daß Ran-GTP für die Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 notwendig ist.

Ein Vergleich der intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 im Import-Assay mit (Abb. 42 a) und ohne Ran(Q69L)-GTP (Abb. 42 b) in fixierten HeLa-Zellen zeigte, daß sich durch Zugabe der Ran(Q69L)-Mutante Unterschiede ergeben. Vero-Zellen ohne Ran(Q69L)-GTP-Behandlung zeigten ein stärkeres Fluoreszenzsignal im Kern als im Cytoplasma. Man erkennt, daß die Nukleoli von der Fluoreszenz ausgeschlossen sind. Durch die Vorinkubation der Zellen mit Ran(Q69L)-GTP ergibt sich ein ganz anderes Bild der Fluoreszenz im Bereich der Zellkerne. Die Fluoreszenz scheint von der Kernmembran auszugehen, das Innere der Kerne scheint nicht fluoreszent zu sein (Nukleoli nicht sichtbar). Von einer quantitativen Auswertung der intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 wurde deshalb abgesehen.

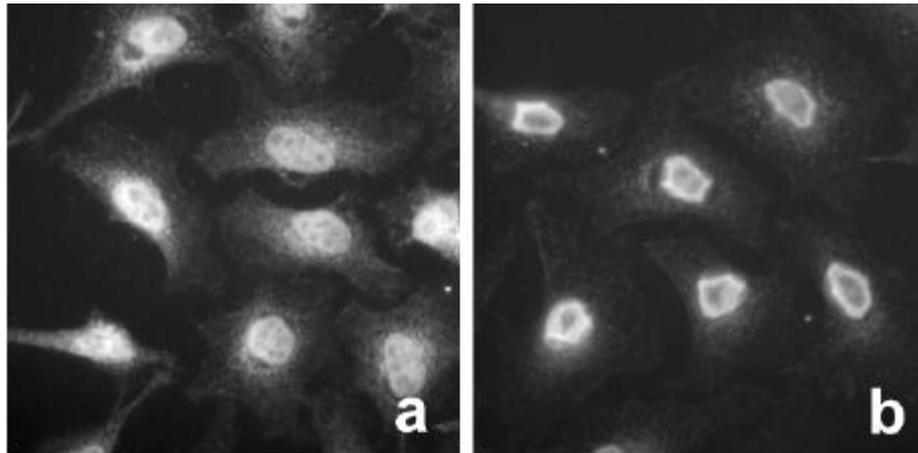
**A****B**

**Abbildung 41: Die Translokation von rCamyr-Cy3 in die Kerne permeabilisierter HeLa-Zellen in Abhängigkeit von Energie und Ran**

Die Translokation von r $\alpha$ myr-Cy3 (1  $\mu$ M) in die Kerne Digitonin-permeabilisierter HeLa-Zellen wurde in Anwesenheit und Abwesenheit eines Energie-regenerierenden Systems (1 mM ATP, 1 mM GTP, 20 mM Kreatininphosphat und 50  $\mu$ g/ml Kreatinkinase) und eines Ran-Mixes (3  $\mu$ M Ran-GDP, 0,3  $\mu$ M NTF2, 0,3  $\mu$ M RanBP1 und 0,2  $\mu$ M Rna 1p) durchgeführt. Die Translokation lief mit 5 mM 8-Br-cAMP und 1 mM DTT über 6 Minuten bei RT ab und wurde am CLSM verfolgt. Die Rasteraufnahmen wurden direkt während des Imports aufgenommen, ohne daß die Zellen vorher fixiert wurden.

**A:**  $F_{K/C}$  während der Translokation von r $\alpha$ myr in die Kerne permeabilisierter HeLa-Zellen mit Ran/Energie (+) bzw. ohne Ran/Energie (-). Die quantitative Auswertung erfolgte nach der in *Material und Methoden* 5.7 und *Ergebnisse* 2 beschriebenen Methode.

**B:** Rasteraufnahmen der permeabilisierten HeLa-Zellen im Import-Assay mit r $\alpha$ myr-Cy3 nach 6 Minuten Inkubation ohne Ran/Energie (**a**) bzw. mit Ran/Energie (**b**)



**Abbildung 42: Einfluß der Hydrolyse-defizienten Ran-Mutante Ran(Q69L)-GTP auf die Translokation von rCa myr-Cy3 in die Kerne permeabilisierter HeLa-Zellen**

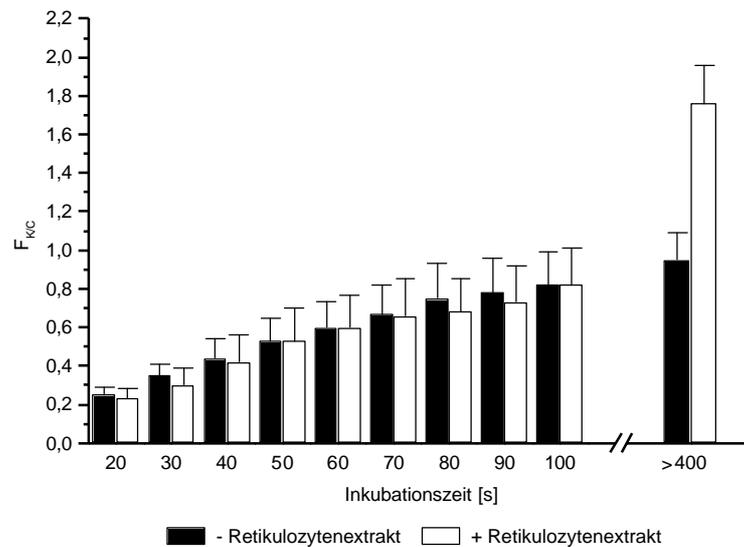
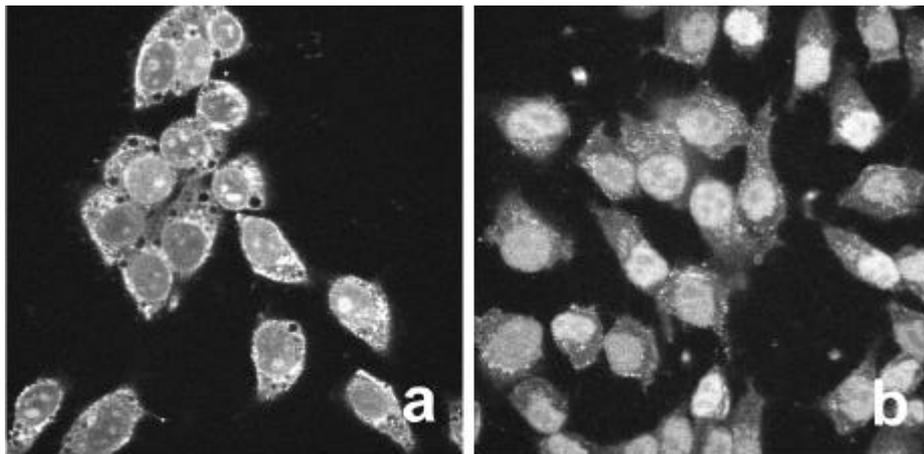
Digitonin-permeabilisierte HeLa-Zellen wurden mit rCa myr-Cy3 (5  $\mu$ M), Retikulozytenextrakt, Energiemix (2x), 8-Br-cAMP (1 mM), DTT (1 mM) und wahlweise mit **(b)** und ohne Ran(Q69L)-GTP (30  $\mu$ M) **(a)** inkubiert. Die Zellen wurden nach 5-minütiger Inkubation bei RT fixiert. Die Fluoreszenzaufnahmen wurden mit Hilfe eines herkömmlichen Fluoreszenzmikroskops gemacht.

#### 4.2.4 Einfluß des Retikulozytenextraktes auf die Translokation von rCa myr in die Kerne permeabilisierter HeLa-Zellen

Den Digitonin-permeabilisierten Zellen fehlt die lösliche cytoplasmatische Fraktion und damit auch alle löslichen Bindungspartner wie z.B. Transportfaktoren. Um den Einfluß der löslichen Komponenten für die Translokation und die intrazelluläre Verteilung von rCa myr-Cy3 zu überprüfen, wurde das Cytoplasma durch Zugabe von cytoplasmatischem Extrakt aus Retikulozyten, kernlosen Zellen, substituiert.

Die Translokation von rCa myr-Cy3 wurde unter Cytoplasma-freien Bedingungen und nach Cytoplasma-Substitution mit Retikulozytenextrakt im CLSM verfolgt. Wie der Vergleich der Kinetiken in Abbildung 43A zeigt, unterschied sich der Verlauf der Kinetiken während der ersten 100 Sekunden kaum. Die quantitative Auswertung der Verteilung der Fluoreszenzintensitäten von rCa myr-Cy3 nach 6 Minuten ergab allerdings, daß nicht nur die Signalstärke, sondern auch die Verteilung zwischen den Kompartimenten verändert war (Abb. 43B). So war das Kern-Cytoplasma-Verhältnis  $F_{K/C}$  von rCa myr-Cy3 nach Substitution des Cytosols deutlich höher (um 50 %) als beim vergleichbaren Ansatz ohne Retikulozytenextrakt (Abb. 43A).

Diese Zunahme der Kernfluoreszenz nach längerer Inkubationszeit in Gegenwart des Retikulozytenextrakts kann mehrere Gründe haben, die nicht unbedingt nur mit einer Beeinträchtigung der Translokation der Kinase im Hinblick auf deren Translokationsmechanismus unter Cytosol-freien Bedingungen zu tun haben müssen.

**A****B**

**Abbildung 43: Translokation von rCa myr-Cy3 in die Kerne permeabilisierter HeLa-Zellen in Abhängigkeit von der Substitution des Cytosols durch Retikulozytenextrakt**

Die Translokation von rCa myr-Cy3 (3  $\mu$ M) in die Kerne Digitonin-permeabilisierter HeLa-Zellen erfolgte in Gegenwart von Energiemix (2x), Ran-Mix (2x), 8-Br-cAMP (1 mM), DTT (1 mM) und mit bzw. ohne Retikulozytenextrakt. Die Zellen wurden nicht fixiert, sondern durch den Reaktionsmix hindurch im CLSM fotografiert.

**A:**  $F_{K/C}$  während des Imports von rCa myr-Cy3 in die Kerne der permeabilisierten HeLa-Zellen mit und ohne Substitution des Cytoplasmas durch Retikulozytenextrakt. Die quantitative Auswertung erfolgte nach der in *Material und Methoden* 5.7 und *Ergebnisse* 2 beschriebenen Methode.

**B:** Rasteraufnahmen von permeabilisierten HeLa-Zellen im Import-Assay nach mehr als 6-minütiger Inkubation bei RT aufgenommen. Die HeLa-Zellen wurden ohne Retikulozytenextrakt (**a**) bzw. mit Retikulozytenextrakt (**b**) inkubiert.

#### 4.2.5 Einfluß der Importin $\beta$ -Mutante (45-462) auf die Translokation von rC $\alpha$ myr in die Kerne permeabilisierter HeLa-Zellen

Wie bereits in Mikroinjektionsexperimenten gezeigt werden konnte (s. *Ergebnisse* 4.1.5), ergibt sich in Gegenwart der Importin  $\beta$ -Mutante (45-462) für rC $\alpha$ myr-Cy3 eine veränderte intrazelluläre Verteilung mit einer deutlich geringeren Fluoreszenzintensität im Kern. Die Importin  $\beta$ -Mutante (45-462), der sowohl die Bindungsstelle für Importin  $\alpha$  als auch die Ran-GTP-bindende Domäne fehlt, soll offenbar irreversibel an die Nukleoporene assoziieren und so die für den katalysierten Transport notwendigen Bindungsstellen in NPCs blockieren.

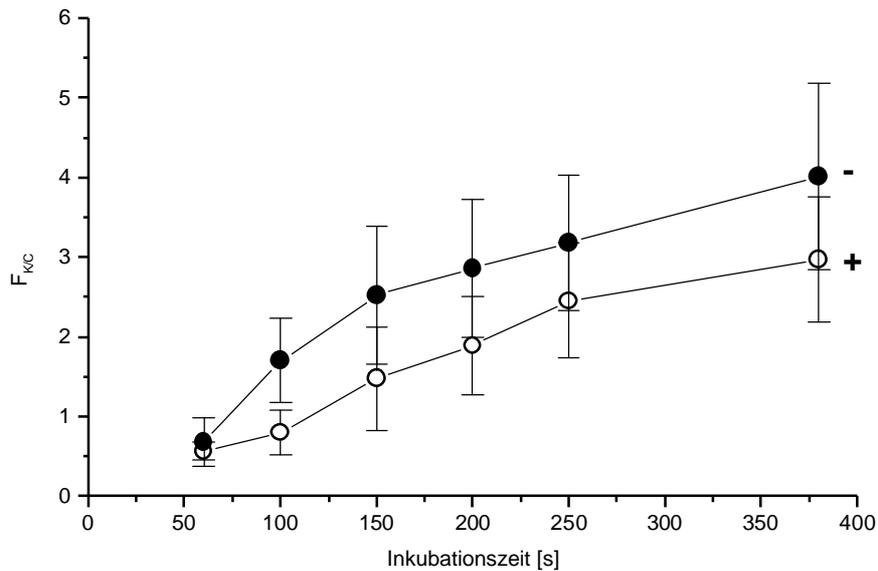
Im Import-Assay war es möglich, den Einfluß der Mutante auf  $F_{K/C}$  von rC $\alpha$ myr-Cy3 von Beginn an zu verfolgen. Dazu wurden die permeabilisierten HeLa-Zellen vor den eigentlichen Import-Assays mit Importin  $\beta$ -Mutante (45-462) inkubiert.

Das Ergebnis der Import-Assays ist in Abbildung 44 dargestellt. Es sind sowohl der Verlauf der Import-Kinetiken (Abb. 44A) als auch Rasterabbildungen der permeabilisierten Zellen 10 Minuten nach Start des Assays gezeigt (Abb. 44B).

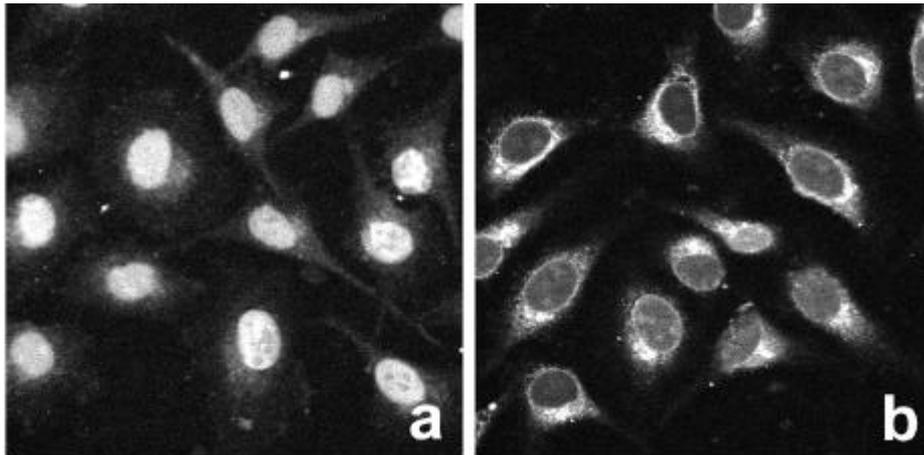
Wie sowohl aus den Rasteraufnahmen der Zellen als auch aus den aufgenommenen Kinetiken ersichtlich ist, wurde auch hier die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 in den HeLa-Zellen durch die Blockierung der NPC deutlich beeinflusst. Nach Vorinkubation der Kerne permeabilisierter HeLa-Zellen mit der Importin  $\beta$ -Mutante (45-462) ergaben sich bis zu 25 % geringere  $F_{K/C}$ -Werte. Es zeigte sich, daß die Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 in Anwesenheit der Importin  $\beta$ -Mutante (45-462) im Vergleich zum Ansatz ohne Mutante von sehr frühen Zeitpunkten an vermindert war. Der Ergebnis der Mikroinjektion ließ sich für rC $\alpha$ myr-Cy3 bestätigen.

Durch den Import-Assay wurde deutlich, daß der Grund für die veränderte intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 eine beeinträchtigte Translokation durch die Mutante ist.

A



B



**Abbildung 44: Einfluß der Importin  $\beta$ -Mutante (45-462) auf die Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 in HeLa-Zellen**

Die Digitonin-permeabilisierten HeLa-Zellen wurden mit 2  $\mu$ M der dominant-negativen Importin  $\beta$ -Deletionsmutante (45-462) für ungefähr 2 Minuten vorinkubiert. Der Import-Assay mit rC $\alpha$ myr-Cy3 (1  $\mu$ M) wurde in Anwesenheit eines Energie-regenerierenden Systems, Ran-Mixes (2x), 5 mM 8-Br-cAMP und 1 mM DTT durchgeführt. Die Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 lief über 10 Minuten bei RT ab und wurde am CLSM verfolgt. Die Rasteraufnahmen wurden direkt durch den Importmix aufgenommen, ohne daß die Zellen vorher fixiert wurden.

**A:** F<sub>K/C</sub> von rC $\alpha$ myr-Cy3 über den Verlauf des Assays mit (+) und ohne (-) vorherige Inkubation der permeabilisierten HeLa-Zellen mit Importin  $\beta$  (45-462).

**B:** Rasteraufnahmen aufgenommen nach 10-minütiger Inkubation Digitonin-permeabilisierter HeLa-Zellen ohne vorherige Inkubation mit Importin  $\beta$  (45-462) (a) bzw. mit vorheriger Inkubation mit Importin  $\beta$  (45-462) (b).

## 5 Untersuchungen zur Retention von rC $\alpha$ myr in Kern und Cytoplasma

Die unter *Ergebnisse* 4.1 beschriebenen Mikroinjektionsexperimente legen Diffusion als Translokationsmodus für rC $\alpha$ myr in den Kern nahe. Dies ergab sich aus dem Vergleich mit der Diffusionskontrolle MBP. Das wirft die Frage nach dem Grund für die unterschiedlichen intrazellulären Verteilungen beider Proteine auf. In den Import-Assays (s. *Ergebnisse* 4.2) wurde deutlich, daß rC $\alpha$ myr im Vergleich zu MBP offenbar viele Bindungspartner in der Zelle hat. Deshalb wurde als Auslöser für die andersartigen intrazellulären Verteilungen von rC $\alpha$ myr und MBP eine unterschiedliche Retention der beiden Proteine in den Zellkompartimenten angenommen. Bekannte Bindungspartner der C-Untereinheiten sind die R-Untereinheiten, PKI und verschiedene Substrate. Im folgenden werden Untersuchungen zur Retention von rC $\alpha$ myr in Kern und Cytoplasma beschrieben. Der Fokus der Untersuchungen lag dabei auf der Bindung zu den R-Untereinheiten.

### 5.1 Einfluß der Bindung von rC $\alpha$ myr zu den R-Untereinheiten in Mikroinjektionsexperimenten und Import-Assays

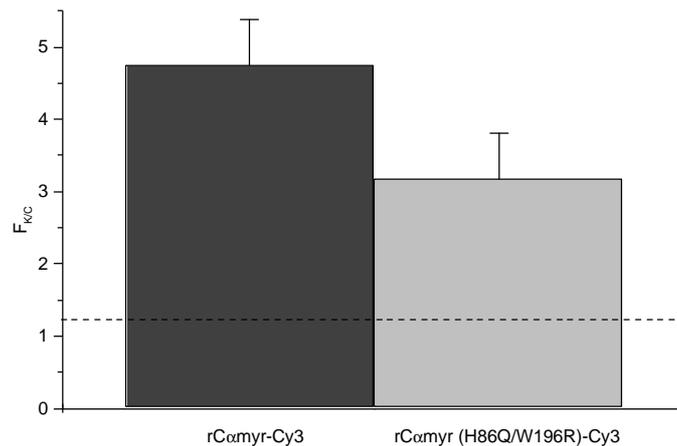
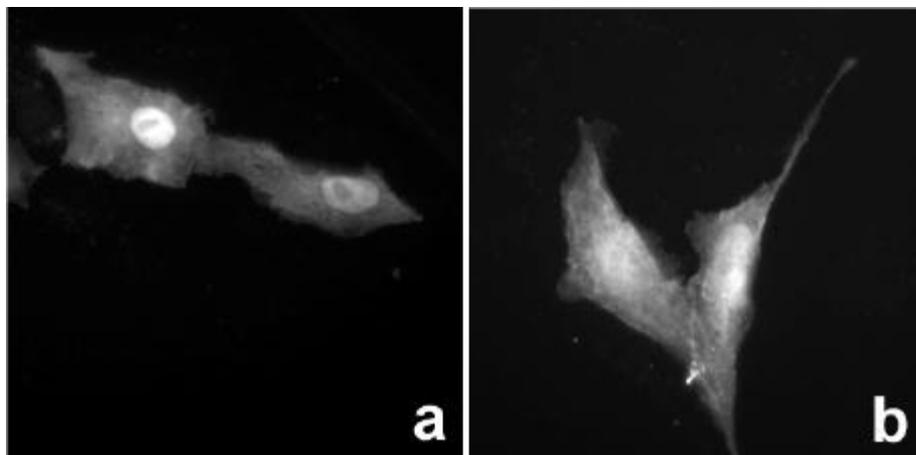
#### 5.1.1 Die R-bindungsdefiziente C $\alpha$ -Doppelmutante rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)

Die R-Untereinheiten gehen über ihre Substrat- bzw. Pseudosubstrat-Region mit dem katalytischen Zentrum der C-Untereinheiten eine Bindung ein. Es konnte allerdings gezeigt werden, daß es noch eine zusätzliche Domäne an der C $\alpha$ -Untereinheit gibt, die bei der Holoenzym-Ausbildung mit der R-Untereinheit von Bedeutung ist [Orellana und McKnight 1992]. Für die hochaffine Bindung von PKI, das ebenfalls an das katalytische Zentrum der C $\alpha$ -Untereinheit bindet, spielt diese Domäne der C $\alpha$ -Untereinheit keine Rolle. Diese Oberflächendomäne der C $\alpha$ -Untereinheit liegt um den Tryptophanrest 196 herum [Orellana *et al.* 1993]. Durch Mutationen in dieser Domäne wird die spezifische Interaktion zwischen R- und C $\alpha$ -Untereinheit gestört. Eine Inhibition der C $\alpha$ -Untereinheit durch Bindung der R-Untereinheit kann nicht mehr erfolgen, wohl aber durch Bindung von PKI.

Um die Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 in Vero-Zellen ohne den inhibitorischen Einfluß der R-Untereinheiten und damit den Beitrag der R-Untereinheiten an den bestimmten Kern-Cytoplasma-Verhältnissen zu untersuchen, wurde die C $\alpha$ -Doppelmutante rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R) [Orellana und McKnight 1992] hergestellt (s. *Ergebnisse* 1.1) und in Mikroinjektionsexperimenten eingesetzt.

In Abbildung 45 wird die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 und rC $\alpha$ myr-Cy3 in Vero-Zellen nach 15-minütiger Inkubation verglichen.

Im Unterschied zum Wildtyp-Enzym ist das Fluoreszenzsignal in den Zellen, in die rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 injiziert wurde, eher diffus über die Zelle verteilt und zeigt nicht wie beim Wildtyp eine Akkumulation im Kern. Dieser Unterschied drückt sich auch im  $F_{K/C}$ -Wert aus, der für die Mutante nach 15-minütiger Inkubation im Mittel um 35 % geringere Werte ergab als für das Wildtyp-Enzym (Abb. 45A).

**A****B**

**Abbildung 45: Vergleich der intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 und rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 in Vero-Zellen**

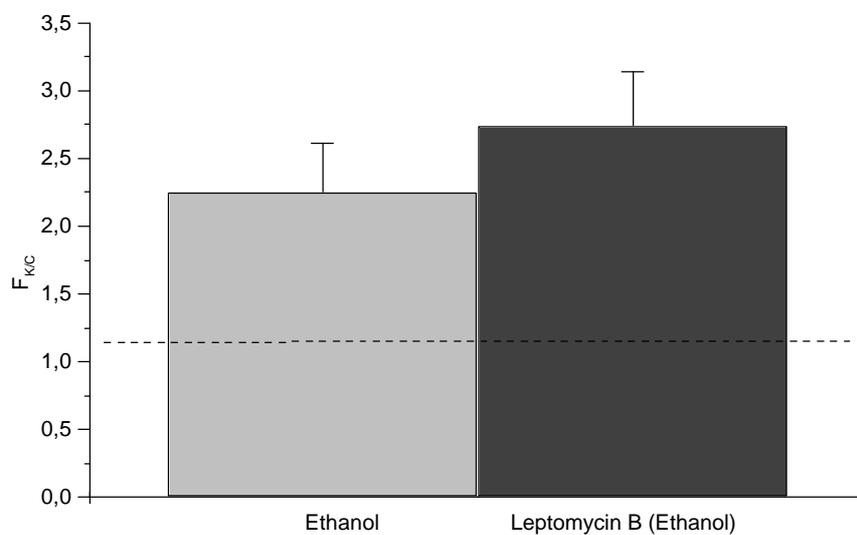
rC $\alpha$ myr-Cy3 (1,3 mg/ml) bzw. rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 (1,2 mg/ml) wurde zusammen mit cAMP (5 mM) und DTT (1 mM) in das Cytoplasma von Vero-Zellen injiziert. Nach 15-minütiger Inkubation bei 37 °C in 1 mM 8-Br-cAMP-haltigem Medium wurden die Zellen fixiert. Die Mikroinjektion und quantitative Auswertung erfolgte wie unter *Ergebnisse* 4.1.1 angegeben.

**A:**  $F_{K/C}$  von rC $\alpha$ myr-Cy3 und rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 nach 15-minütiger Inkubation

**B:** Lokalisation von rC $\alpha$ myr-Cy3 (**a**) und rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 (**b**) nach 15minütiger Inkubation in fixierten Vero-Zellen.

Des Weiteren wurde der Einfluß von Leptomycin B (LMB) auf das Verhältnis  $F_{K/C}$  von rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 untersucht, um festzustellen, inwieweit der aktive Export über PKI für rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 eine Rolle spielt (s. *Ergebnisse* 4.1.9).

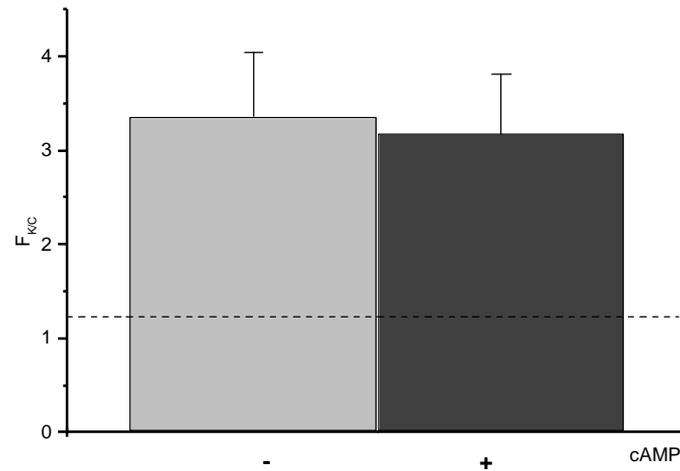
Es ergab sich, daß durch die Behandlung mit LMB die Werte für  $F_{K/C}$  von rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 im Mittel um ca. 20 % anstiegen (Abb. 46). Die Inhibition des aktiven PKI-vermittelten Exports zeigte einen Einfluß auf die intrazelluläre Verteilung der Mutante. Demnach wird die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 durch den aktiven Export über PKI beeinflusst.



**Abbildung 46: Einfluß von Leptomycin B auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 in Vero-Zellen**

Zur Inhibition des aktiven Exports über PKI wurden die Vero-Zellen vor der Mikroinjektion für 30 Minuten in LMB-haltigem Medium (10 ng/ml) inkubiert. Nach der Mikroinjektion von rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 (1,2 mg/ml) wurden die Zellen für 10 Minuten bei 37 °C im Gegenwart von LMB inkubiert und anschließend fixiert. Da LMB in Ethanol gelöst vorlag, wurde der Kontrollansatz entsprechend dem LMB-Ansatz mit Ethanol behandelt. Das Experiment fand in Gegenwart von 5 mM cAMP bzw. 8-Br-cAMP und 1 mM DTT statt. Die Mikroinjektion und quantitative Auswertung erfolgte wie unter *Ergebnisse* 4.1.1 angegeben.

Eine Abhängigkeit der intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 vom intrazellulären cAMP-Spiegel war nicht zu beobachten, was wegen ihrer geringen Affinität zu den R-Untereinheiten auch nicht zu erwarten war (Abb. 47).



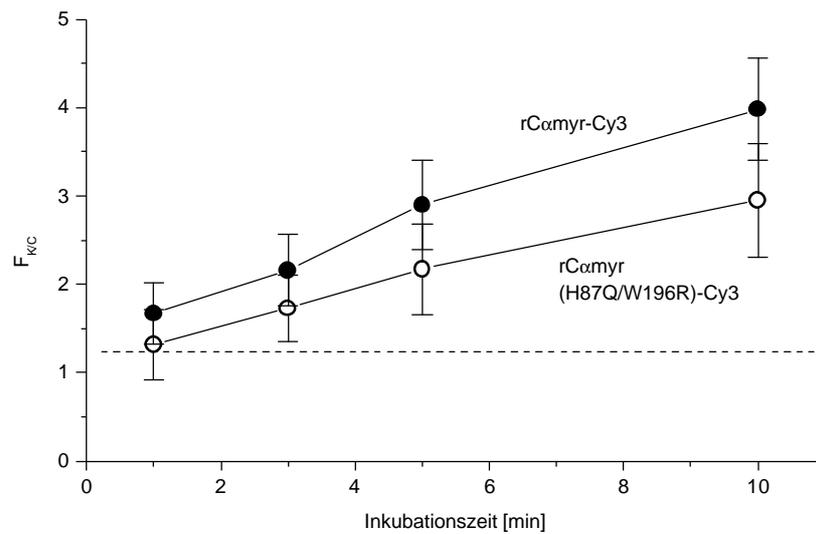
**Abbildung 47: Effekt von cAMP auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 in Vero-Zellen**

Zur Untersuchung des cAMP-Effekts bei der R-bindungsdefizienten C $\alpha$ -Mutante wurde rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 (1 mg/ml) mit DTT (1 mM) und je nach Ansatz mit oder ohne 5 mM cAMP in Vero-Zellen injiziert. Die Zellen wurden für 15 Minuten bei 37 °C in 5 mM 8-Br-cAMP-haltigem und -freiem Medium inkubiert und anschließend fixiert. Die Mikroinjektion und quantitative Auswertung erfolgte wie unter *Ergebnisse* 4.1.1 angegebenen.

### 5.1.2 Vergleich der Import-Kinetiken von rC $\alpha$ myr und rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R) im Mikroinjektionsexperiment und im Import-Assay

Es stellte sich die Frage nach dem Grund für das geringe Fluoreszenzsignal der C $\alpha$ -Doppelmutante im Kern. Ein Vergleich der Kinetiken der Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 und rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 über einen Zeitraum von 10 Minuten zeigte, daß die Kinetiken beider Enzyme ähnlich, aber auf unterschiedlichen Niveaus verlaufen. Die Mutante zeigt bereits nach einer Inkubation von 1 Minute einen mittleren  $F_{K/C}$ -Wert, der um 25 % und nach 10-minütiger Inkubation um 35 % unter dem des Wildtyp-Enzyms liegt.

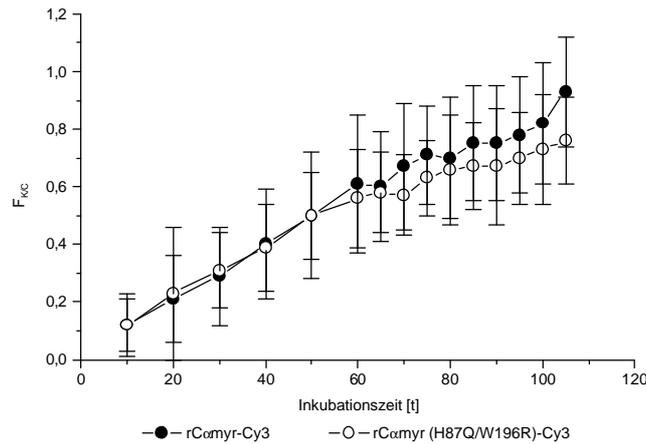
In Abbildung 48 sind die im Mittel erreichten  $F_{K/C}$ -Werte von rC $\alpha$ myr-Cy3 und rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 zu verschiedenen Zeitpunkten gezeigt.



**Abbildung 48: Vergleich der Translokations-Kinetiken von rCαmyr-Cy3 und rCαmyr (H87Q/W196R)-Cy3**  
 rCαmyr-Cy3 (1,3 mg/ml) bzw. rCαmyr (H87Q/W196R)-Cy3 (1,2 mg/ml) wurden zusammen mit cAMP (5 mM) und DTT (1 mM) in das Cytoplasma von Vero-Zellen injiziert. Nach einer Inkubation von 1, 3, 5 bzw. 10 Minuten bei 37 °C in 1 mM 8-Br-cAMP-haltigem Medium wurden die Zellen fixiert. Die Mikroinjektion und quantitative Auswertung erfolgte wie unter *Ergebnisse* 4.1.1 angegeben.

Der Vergleich der Import-Kinetiken von rCαmyr-Cy3 und rCαmyr (H87Q/W196R)-Cy3 im Import-Assay zeigte, daß sich die Translokation beider Proteine während der ersten 50 Sekunden des Import-Assays zunächst identisch verhält (Abb. 49). Im weiteren Verlauf der Import-Reaktion erreicht rCαmyr-Cy3 gegenüber rCαmyr (H87Q/W196R)-Cy3 im Mittel höhere  $F_{K/C}$ -Werte. Diese Beobachtung stimmt mit denen der Mikroinjektionsexperimente überein (Abb. 45).

Die Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, daß der Translokationsmechanismus durch den Aminosäureaustausch und damit das Unvermögen, R-Untereinheiten zu binden, nicht beeinflusst wird, wohl aber die Retention von rCαmyr (H87Q/W196R) in den Vero-Zellen.



**Abbildung 49: Vergleich der Import-Kinetiken von rCαmyr-Cy3 und rCαmyr (H87Q/W196R)-Cy3**

Der Import-Reaktionsansatz enthielt neben rCαmyr-Cy3 bzw. rCαmyr (H87Q/W196R)-Cy3 (1,5 μM) Retikulozytenextrakt, Energie-Mix (2x), DTT (1 mM) und 8-Br-cAMP (1 mM). Die Translokation der Proben in die Kerne der Digitonin-permeabilisierten HeLa-Zellen wurde am CLSM durch den Reaktionsmix hindurch verfolgt. Die quantitative Auswertung erfolgte wie unter *Material und Methoden 5.7* und *Ergebnisse 2* angegeben.

### 5.1.3 Das AKAP Ht-31-Inhibitorpeptid

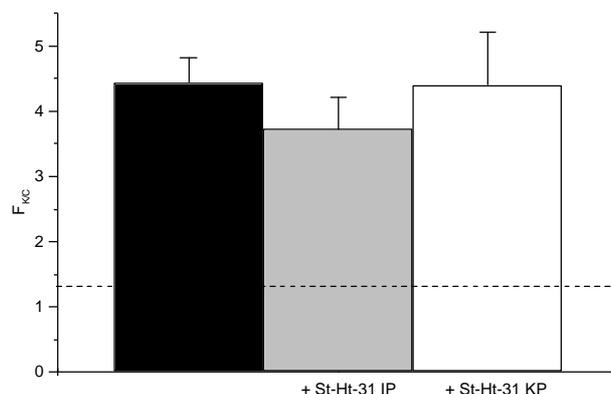
Die PKA-Ankerproteine, die sogenannten AKAPs (A-kinase anchoring proteins), binden das Holoenzym über das R-Dimer an spezifische subzelluläre Strukturen. Um die Bedeutung von AKAPs auf die intrazelluläre Verteilung von freier rCαmyr zu untersuchen, wurde ein synthetisches Peptid, das AKAP St-Ht-31-Inhibitorpeptid (St-Ht-31 IP) (Promega, USA), das der R-Bindungsdomäne von AKAP Ht-31 entspricht, in Mikroinjektionsexperimenten eingesetzt. Das Peptid unterbindet durch kompetitives Binden an die R-Untereinheiten deren Assoziation an AKAPs [Hausken *et al.* 1996; Vijayaraghavan *et al.* 1997]. Für die meisten der inzwischen über 20 bekannten AKAPs wurde eine Bindung zu RII-Untereinheiten beschrieben [Klussmann *et al.* 1999; Vijayaraghavan *et al.* 1997]. Für das AKAP Ht-31 konnte jedoch inzwischen gezeigt werden, daß es neben der hochaffinen Bindung zu der R-Untereinheit RIIα auch eine schwächere Bindung zu der R-Untereinheit RIα ausbilden kann [Miki und Eddy 1999].

Zur Absättigung der AKAP-Bindungsstellen der R-Untereinheiten wurden die Vero-Zellen vor der Mikroinjektion von rCαmyr-Cy3 für 5 Minuten in Gegenwart von St-Ht-31 IP (50 μM) inkubiert [Klussmann *et al.* 1999; Vijayaraghavan *et al.* 1997]. Durch die Stearinsäure ist AKAP St-Ht-31 IP membrangängig. Da die Bindung des Inhibitorpeptids an das R-Dimer reversibel ist, wurden die Zellen auch nach der Mikroinjektion mit AKAP St-Ht-31 IP behandelt. Als Kontrolle wurde ein AKAP St-Ht31-Kontrollpeptid (St-Ht-31 KP) (Promega, USA) verwendet, das sich durch einen Aminosäureaustausch von der Inhibitorsequenz

unterscheidet und dadurch nicht mehr an die R-Untereinheiten binden kann [Vijayaraghavan *et al.* 1997].

Abbildung 50 zeigt das Ergebnis eines typischen Mikroinjektionsexperiments mit rC $\alpha$ myr-Cy3 in Gegenwart von St-Ht31 IP nach 30-minütiger Inkubation in Vero-Zellen.

Wie aus der Abbildung 50 hervorgeht, scheint in Gegenwart von AKAP St-Ht-31 IP das Fluoreszenzsignal im Kern geringfügig abzunehmen. Eine Abnahme des ermittelten Verhältnisses  $F_{K/C}$  um im Mittel 15 % gegenüber dem unbehandelten bzw. gegenüber dem mit Kontrollpeptid behandelten Ansatz ist zu beobachten. Das Kontrollpeptid scheint keinen Einfluß auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 zu nehmen. Da die Mikroinjektionsexperimente in Anwesenheit von cAMP, das eine Bindung der C- an die R-Untereinheiten aufheben sollte, durchgeführt wurden, ist es erstaunlich, daß das Inhibitorpeptid überhaupt einen, wenn auch geringen Effekt auf die Lokalisation von rC $\alpha$ myr-Cy3 zu haben scheint. Es könnte ein Hinweis darauf sein, daß sich die C- und die R-Untereinheit bei erhöhtem cAMP-Spiegel in Abhängigkeit von der AKAP-Bindung nur unvollständig trennen oder daß die Bindung zu anderen Bindungspartnern durch das Inhibitorpeptid ebenfalls beeinträchtigt wird. Das in Gegenwart von AKAP St-Ht-31 IP ermittelte Verhältnis  $F_{K/C}$  erreichte jedoch nicht das geringe Niveau der R-Bindungsdefizienten C $\alpha$ -Doppelmutante rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R) (s. *Ergebnisse* 5.1.1), die ebenfalls in Gegenwart von cAMP eingesetzt wurde.



**Abbildung 50: Einfluß des AKAP St-Ht-31-Inhibitorpeptids auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 in Vero-Zellen**

Um die Bindung von R-Untereinheiten und AKAPs zu inhibieren, wurden die Vero-Zellen vor der Mikroinjektion für 5 Minuten mit dem Inhibitorpeptid St-Ht-31 IP (50  $\mu$ M) bzw. dem Kontrollpeptid St-Ht-31 KP (50  $\mu$ M) inkubiert. rC $\alpha$ myr-Cy3 (1,3 mg/ml) wurde mit cAMP (5 mM) und DTT (1 mM) zusammen in das Cytoplasma der Vero-Zellen injiziert. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37 °C in Gegenwart von Inhibitor- bzw. Kontrollpeptid und 8-Br-cAMP (5 mM) wurden die Zellen fixiert. Die Mikroinjektion und quantitative Auswertung der intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 zwischen Kern und Cytoplasma erfolgte wie unter *Ergebnisse* 4.1.1 angegeben.

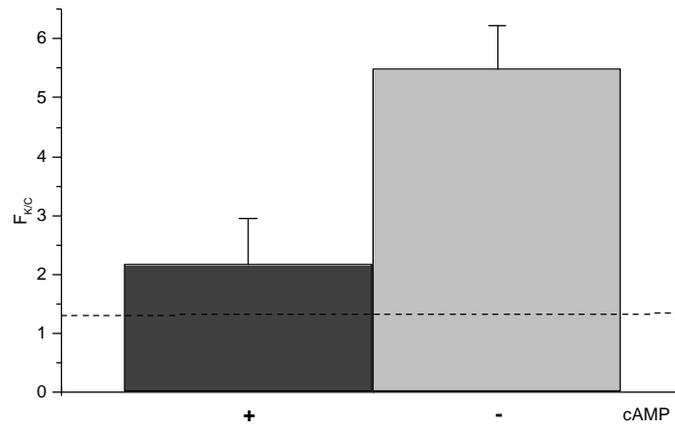
#### 5.1.4 Einfluß von cAMP auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr in Vero-Zellen

Die C-Untereinheiten liegen *in vivo* bei geringem intrazellulären cAMP-Spiegel überwiegend im Cytoplasma als heterotetramere Holoenzyme an die R-Untereinheiten gebunden vor [Cox und Taylor 1994]. Steigt die cAMP-Konzentration in der Zelle an, wird cAMP von den R-Untereinheiten gebunden, wodurch die Affinität der R- und C-Untereinheiten zueinander sinkt und das Holoenzym dissoziiert [Granot *et al.* 1980]. Die freigesetzten C-Untereinheiten können daraufhin in den Kern gelangen, die R-Untereinheiten jedoch nicht. Diese spielen dabei nicht nur als Inhibitor eine Rolle in der Regulation der PKA-Aktivität, sondern bei geringem intrazellulären cAMP-Spiegel auch als Bindungspartner in der Lokalisation der C-Untereinheiten.

Durch Zugabe von 1 - 5 mM des membranpermeablen cAMP-Analogons, 8-Br-cAMP [Meinkoth *et al.* 1990], das nicht durch Phosphodiesterase hydrolysierbar ist, zum Medium bzw. durch Coinjektion von cAMP in die Zellen wurde dieser sogenannte cAMP-Effekt für die in dieser Arbeit verwendeten Vero-Zellen überprüft.

Der cAMP-Effekt konnte auch bei Vero-Zellen nach Injektion von rC $\alpha$ myr-Cy3 beobachtet werden. In dem in Abbildung 51 gezeigten Experiment kam es nach 15-minütiger Inkubation im Mittel durch cAMP-Gabe zu einer 60 %-igen Steigerung des  $F_{K/C}$ -Wertes für rC $\alpha$ myr-Cy3. Es zeigte sich jedoch, daß der Effekt von Experiment zu Experiment unterschiedlich stark ausgeprägt war. Es schien ein Zusammenhang zwischen der Menge an injizierter rC $\alpha$ myr-Cy3 und der Ausprägung des beobachteten Effekts zu bestehen. Bei Injektion geringer Konzentration an rC $\alpha$ myr-Cy3, wie in dem Experiment unter Abbildung 51 (Konzentration an rC $\alpha$ myr-Cy3: 0,4 mg/ml  $\approx$  1  $\mu$ M), war der Effekt größer als bei Experimenten, in denen eine höhere Konzentration an rC $\alpha$ myr-Cy3 (z.B. 1 mg/ml  $\approx$  2,4  $\mu$ M) eingesetzt wurde (Ergebnisse nicht gezeigt). Ein Grund dafür könnte sein, daß durch die Injektion größerer Mengen an freier rC $\alpha$ myr-Cy3 die Bindungsstellen der R-Untereinheit austitriert werden könnten. Das hätte zur Folge, daß die intrazelluläre Verteilung der ungebundenen rC $\alpha$ myr-Cy3 die durch die Retention über die R-Untereinheiten bedingte Verteilung überlagert.

Der cAMP-Effekt macht deutlich, daß die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3, zumindest bei geringen cAMP-Konzentrationen in der Zelle, abhängig ist von Bindungspartnern, den R-Untereinheiten.



**Abbildung 51: Effekt von cAMP auf die intrazelluläre Verteilung von rCαmyr-Cy3 in Vero-Zellen**

Zur Untersuchung des cAMP-Effekts wurde rCαmyr-Cy3 (0,4 mg/ml) mit DTT (1 mM) und je nach Ansatz mit oder ohne 5 mM cAMP in Vero-Zellen injiziert. Die Zellen wurden für 15 Minuten bei 37 °C in 5 mM 8-Br-cAMP-haltigem und -freiem Medium inkubiert und anschließend fixiert. Die Mikroinjektion und quantitative Auswertung erfolgte wie unter *Ergebnisse* 4.1.1 angegebenen.

Aus Gründen der Gleichbehandlung wurden die Experimentationsansätze der Kontrollproteine grundsätzlich auch immer dann mit cAMP behandelt, wenn das Experiment mit rCαmyr-Cy3 in Gegenwart von cAMP durchgeführt wurde. Die Coinjektion von cAMP und die Inkubation der Zellen mit 8-Br-cAMP zeigte bei den Kontrollen FL-BSA-NLS, STI-Cy3 oder MBP-Cy3 keinen dem cAMP-Effekt der PKA ähnlichen Einfluß auf die intrazelluläre Verteilung.

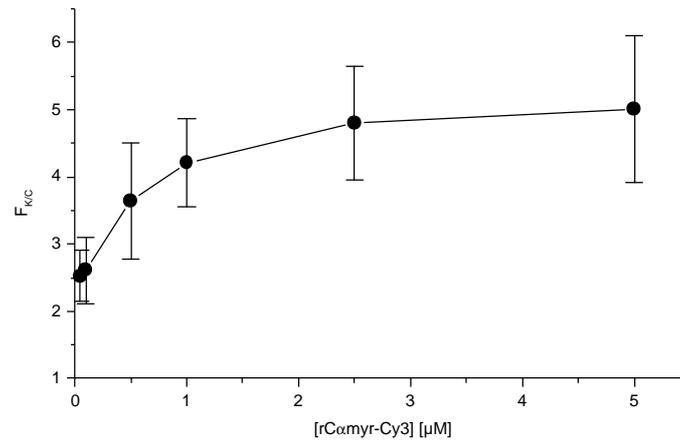
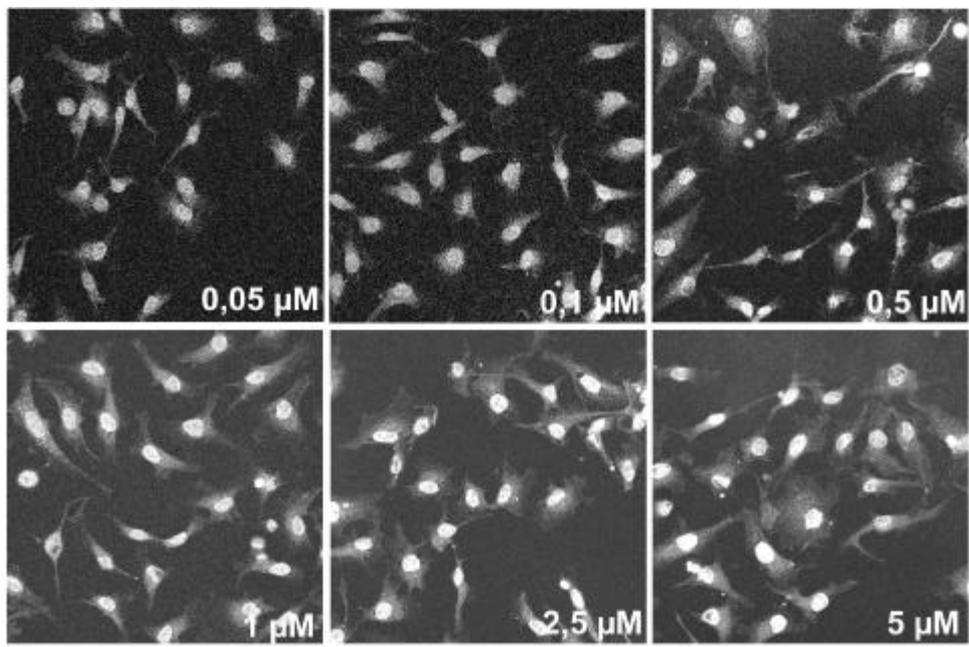
Bei der Cα-Mutante rCαmyr (H87Q/W196R) (s.o.), die nicht mehr an die R-Untereinheiten binden kann, stellte sich, wie zu erwarten war, kein cAMP-Effekt ein. Wie aus Abbildung 47 zu ersehen ist, blieb  $F_{K/C}$  von rCαmyr (H87Q/W196R)-Cy3 auch nach cAMP-Behandlung im Mittel unverändert bei einem Wert von  $3,2 \pm 0,6$  bzw.  $3,3 \pm 0,6$ . Der cAMP-Effekt scheint folglich nur dann zu beobachten zu sein, wenn die C-Untereinheiten an die R-Untereinheiten gebunden vorliegen.

### 5.1.5 Sättigungskinetik

Die bisherigen Ergebnisse weisen darauf hin, daß die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr maßgeblich über Bindungsstellen in Kern und Cytoplasma bestimmt wird. Unter der Voraussetzung, daß es sich um eine begrenzte Anzahl von Bindungsstellen handelt, sollten diese Bindungsstellen durch einen Überschuß an rC $\alpha$ myr sättigbar sein. Es wurde eine Sättigungskinetik mittels Import-Assays aufgenommen, da hier anders als im Mikroinjektionsexperiment die Konzentration der Probe in der Zelle sehr genau reguliert werden kann. Dazu wurden Digitonin-permeabilisierte HeLa-Zellen für 3 Minuten in Importlösung mit rC $\alpha$ myr-Cy3 in Konzentrationen von 0,05 bis 5  $\mu$ M inkubiert. Die Detektion erfolgte nach der PFA-Fixierung und Einbettung der Zellen durch CLSM. Die quantitative Auswertung zur Bestimmung des Verhältnisses  $F_{K/C}$  erfolgte wie für die Mikroinjektionsexperimente beschrieben (s. *Material und Methoden 5.7* und *Ergebnisse 2*).

In Abbildung 52A sind die Verhältnisse  $F_{K/C}$  von rC $\alpha$ myr-Cy3 in permeabilisierten HeLa-Zellen in Abhängigkeit von der eingesetzten Konzentration an rC $\alpha$ myr-Cy3 nach 3-minütiger Inkubation gezeigt. In Abbildung 52B sind die dazugehörigen Rasteraufnahmen abgebildet.

Wie aus der Abbildung 52A zu entnehmen ist, steigt der Wert für  $F_{K/C}$  von rC $\alpha$ myr-Cy3 bis zu einer Konzentration von 1  $\mu$ M linear an. Bei höheren Konzentrationen an rC $\alpha$ myr-Cy3 scheint die Kern-Cytoplasma-Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 weitestgehend konzentrationsunabhängig zu sein. Eine Sättigung tritt ein, wie auch die Rasteraufnahmen (Abb. 52B) der mit unterschiedlichen Konzentrationen an rC $\alpha$ myr-Cy3 behandelten Zellen zeigen. Die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 scheint offenbar tatsächlich von Bindungspartnern abhängig zu sein.

**A****B****Abbildung 52: Sättigungskinetik**

Digitonin-permeabilisierte HeLa-Zellen wurden mit Cy3-markierter C $\alpha$ -Untereinheit rC $\alpha$ myr (0,05 - 5  $\mu$ M) in Anwesenheit von cytosolischem Extrakt aus Retikulozyten, einem Energie-regenerierenden System (1x), DTT (1 mM) und 8-Br-cAMP (1 mM) für 3 Minuten inkubiert und anschließend fixiert. Die Zellen wurden im CLSM fotografiert.

**A:** F<sub>K/C</sub> von rC $\alpha$ myr-Cy3 in Abhängigkeit von der im Import-Assay eingesetzten Konzentration. Die quantitative Auswertung der intrazellulären Verteilung des Enzyms erfolgte nach der in *Material und Methoden* 5.7 und *Ergebnisse* 2 beschriebenen Methode.

**B:** Rasteraufnahmen der Digitonin-permeabilisierten und nach 3-minütigem Import von rC $\alpha$ myr-Cy3 (0,05– 5  $\mu$ M) fixierten HeLa-Zellen.

## 5.2 Depletion von Retikulozytenextrakt mit rC $\alpha$ myr

Als Möglichkeit, zelluläre Bindungspartner von rC $\alpha$ myr zu finden, wurden Bindungsassays durchgeführt (s. *Material und Methoden* 8). In diesen Assays wurde biotinylierte rC $\alpha$ myr an Streptavidin-Sepharose-Beads immobilisiert und anschließend zusammen mit HeLa-Lysat oder cytosolischem Extrakt aus Retikulozyten inkubiert. Die an rC $\alpha$ myr gebundenen Proteine aus dem Zellextrakt wurden nach mehrmaligem Waschen mit Hochsalz eluiert. Zur Kontrolle wurde das Cytosol mit Streptavidin-Agarose ohne Ligand inkubiert (Pseudodepletion).

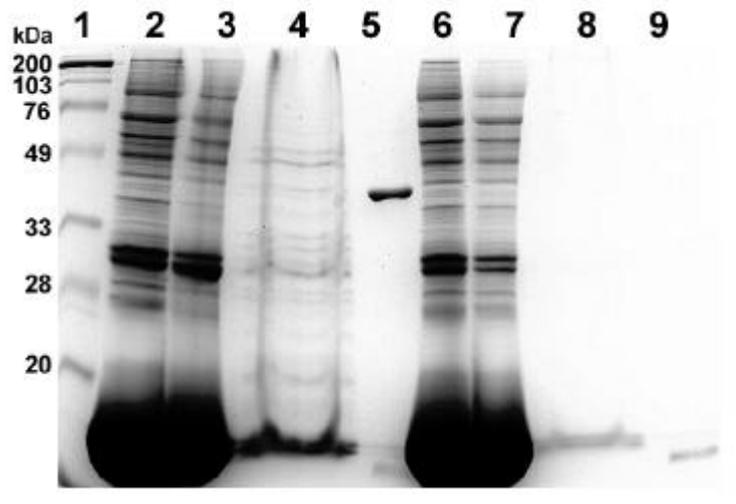
Unbehandelter Retikulozytenextrakt, der Retikulozytenextrakt nach Depletion bzw. Pseudodepletion, das Eluat nach Depletion bzw. Pseudodepletion und die Sepharose-Beads nach erfolgter Elution wurden im SDS-Gel aufgetrennt. Die Abbildung 53 zeigt ein solches Coomassie-gefärbtes SDS-Gel eines Bindungsassays, der mit Retikulozytenextrakt durchgeführt wurde.

Wie sich im SDS-Gel in Abbildung 53 aus Spur 4 ergibt, wurde beim Depletionsansatz eine ganze Reihe von Proteinen unterschiedlichen Molekulargewichts eluiert. Da beim Pseudodepletionsansatz bei identischen Mengen eingesetzten Cytosols kaum Proteine eluiert wurden (Spur 8), ist anzunehmen, daß es sich bei den an rC $\alpha$ myr gebundenen Proteinen um spezifische Bindungspartner der Kinase handelt. Trotz Zugabe von 1 mM 8-Br-cAMP zum Reaktionsansatz, was eine Bindung der R-Untereinheiten verhindern sollte, sind Banden in dem für die R-Untereinheiten typischen Molekulargewichtsbereich zwischen 49 und 55 kDa zu erkennen. Aufgrund der Vielzahl von eluierten Proteinen (Spur 4) war eine Bestimmung der Bindungspartner im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Um die Bedeutung der depletierten Proteine für die Kern-Cytoplasma-Translokation von rC $\alpha$ myr zu untersuchen, wurden Kerne Digitonin-permeabilisierter HeLa-Zellen mit rC $\alpha$ myr-Cy3 und dem depletiertem Cytosol im Import-Assay inkubiert. Als Kontrolle diente auch hier der pseudodepletierte Extrakt.

In Abbildung 54 sind Rasteraufnahmen von permeabilisierten HeLa-Zellen nach 6-minütiger Inkubation mit rC $\alpha$ myr-depletiertem bzw. pseudodepletiertem Retikulozytenextrakt und rC $\alpha$ myr-Cy3 gezeigt.

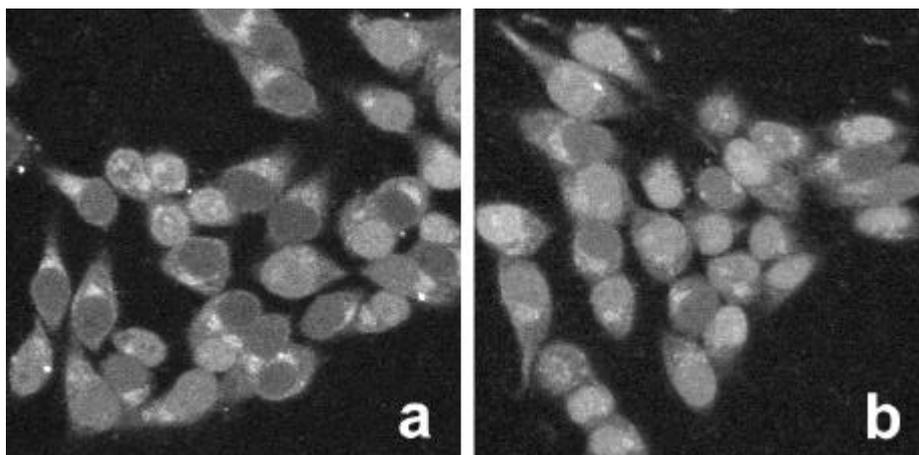
Bei Inkubation der Digitonin-permeabilisierten HeLa-Zellen mit depletiertem bzw. pseudodepletiertem Cytosol aus Retikulozyten sind in jedem Ansatz zwei Populationen von Zellen zu beobachten (Abb. 54 a+b). Bei der einen Gruppe von Zellen ist fast kein rC $\alpha$ myr-Cy3 im Kern zu erkennen, wohingegen bei der anderen Gruppe von Zellen das Enzym deutlich im Kern akkumuliert. Aufgrund dieser Uneinheitlichkeit in der intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 in den permeabilisierten HeLa-Zellen war die Auswertung des



**Abbildung 53: Depletion mit rCa $\mu$ myr bzw. Pseudodepletion von Retikulozytenextrakt im Bindungsassay**

1: Molekulargewichtsstandard; 2: unbehandelter Retikulozytenextrakt; 3: depletierter Retikulozytenextrakt; 4: Eluat nach Depletion; 5: Sepharose-Material mit rCa $\mu$ myr als Liganden nach Depletion; 6: unbehandelter Retikulozytenextrakt; 7: pseudodepletierter Retikulozytenextrakt; 8: Eluat nach Pseudodepletion; 9: Sepharose-Material nach Pseudodepletion

Der cytosolische Extrakt aus Retikulozyten wurde mit 8-Br-cAMP (1 mM), DTT (1 mM) und Energiemix (1x) versetzt. 240  $\mu$ l Extrakt wurden mit jeweils 200  $\mu$ l Streptavin-Agarose sowohl mit biotinyliertem rCa $\mu$ myr-Liganden (Depletion) als auch ohne (Pseudodepletion) für 30 Minuten inkubiert. Nach Waschen, Elution und Fällung erfolgte die Trennung der eluierten Proteine in einem 4-20 % Gradientengel (BioRad, München) (s. *Material und Methoden* 8).



**Abbildung 54: Lokalisation von rCa $\mu$ myr-Cy3 in permeabilisierten HeLa-Zellen in Gegenwart von rCa $\mu$ myr-depletiertem bzw. pseudodepletiertem Retikulozytenextrakt im Import-Assay**

Die Translokation von rCa $\mu$ myr-Cy3 in die Kerne Digitonin-permeabilisierter HeLa-Zellen erfolgte in Gegenwart von depletiertem (a) bzw. pseudodepletiertem Retikulozytenextrakt (b), 8-Br-cAMP (1 mM) und Energiemix (2x). Die Zellen wurden nicht fixiert, sondern durch den Reaktionsmix hindurch im CLSM fotografiert. Die Rasteraufnahmen wurden nach 6-minütiger Inkubation bei RT aufgenommen.

Experiments schwierig. Es konnte jedoch festgestellt werden, daß in Gegenwart von pseudodepletiertem Retikulozytenextrakt (Abb. 54 b) 70 % der untersuchten Zellen eine Akkumulation von rC $\alpha$ myr-Cy3 im Kern zeigten, während bei Verwendung des depletierten Cytosols (Abb. 54 a) nur bei 20 % der Zellen diese Beobachtung gemacht werden konnte. Das könnte als Hinweis genommen werden auf mögliche durch rC $\alpha$ myr depletierbare Faktoren, die die Lokalisation von rC $\alpha$ myr beeinflussen.

Da in Gegenwart von Retikulozytenextrakt nach mehrminütiger Inkubation eine deutlich stärkere Akkumulation von rC $\alpha$ myr-Cy3 im Kern zu beobachten war als in Abwesenheit von Retikulozytenextrakt (s. *Ergebnisse* 4.2.4), könnte der Extrakt aber auch einen Faktor enthalten, der nicht oder nur schlecht durch rC $\alpha$ myr depletiert werden kann, der aber dennoch die Akkumulation im Kern steigert.

Worin der Grund für das Auftreten der beiden Populationen innerhalb eines Ansatzes liegt, konnte nicht geklärt werden. Möglich wäre z.B. eine unterschiedlich ausgeprägte Permeabilisierung der HeLa-Zellen mit Digitonin sowie auch eine Abhängigkeit vom Zellzyklus.

### **5.3 Indirekte Immunfluoreszenzuntersuchungen zur zellulären Lokalisation der R-Untereinheiten und PKI**

Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation der endogenen R-Untereinheiten und von endogenem PKI untersucht, um so das Vorkommen und die Verteilung von R-Untereinheiten und von PKI als möglichen Bindungspartnern von rC $\alpha$ myr in Vero-Zellen, NIH Swiss 3T3 und HeLa-Zellen aufzudecken. Dazu wurden die unbehandelten, logarithmisch wachsenden Zellen, nach Fixierung mit 3 % PFA und Permeabilisierung mit 0,1 % Triton X-100, mit Antikörpern gegen die Isoformen der R-Untereinheiten sowie gegen PKI inkubiert (s. *Material und Methoden* 1.3 / 6). Detektiert wurden die gesuchten Proteine nach Inkubation mit einem gegen den Primärantikörper gerichteten fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper über herkömmliche Fluoreszenzmikroskopie. Zur Kontrolle der Spezifität der Färbung wurden die Primärantikörper vor der Immunfärbung mit ihrem Antigen blockiert (2x Gewichtsüberschuß).

#### **5.3.1 Vorkommen und Lokalisation der R-Untereinheiten**

In Abbildung 55 ist eine solche indirekte Immunfluoreszenz mit gegen die R-Untereinheiten RI $\alpha$ , RI $\beta$ , RII $\alpha$  und RII $\beta$  gerichteten Antikörpern in NIH Swiss3T3-Zellen abgebildet.

Das bei der Immunfluoreszenzfärbung mit anti-RI $\alpha$  erhaltene Signal war zu schwach, um eine Aussage über die Lokalisation dieser R-Untereinheit machen zu können (Abb. 55 a).

Auch bei geringsten Antikörperverdünnungen ließ sich die R-Untereinheit RI $\alpha$  in keiner der untersuchten Zelllinien nachweisen.

Die Detektion der R-Untereinheit RI $\beta$  fiel bei allen Zelltypen anders aus (Abb. 55 c). In HeLa-Zellen konnte es im Cytoplasma nachgewiesen werden. Eine deutliche Färbung einer kernnahen Struktur, wahrscheinlich dem Golgi-Apparat, war zu beobachten. Bei Vero- und NIH Swiss 3T3-Zellen war die gesamte Zelle bis auf die Nukleoli gefärbt. Bei den Vero-Zellen war zudem eine auffällig gefärbte Struktur in Kernnähe zu erkennen, die auch bei den HeLa-Zellen zu finden war. Insgesamt war die durch den Antikörper anti-RI $\beta$  erreichte Färbung schwach.

Die RII-Untereinheiten konnten in allen Zelltypen im Cytoplasma nachgewiesen werden. Ein deutliches Signal war vermutlich im Bereich des Golgi-Apparats, das sich durch das Zugeben des Antigens blockieren ließ, zu beobachten. Eine Ausnahme bildete die R-Untereinheiten Isoform RII $\beta$ , die in HeLa-Zellen nicht detektiert werden konnte.

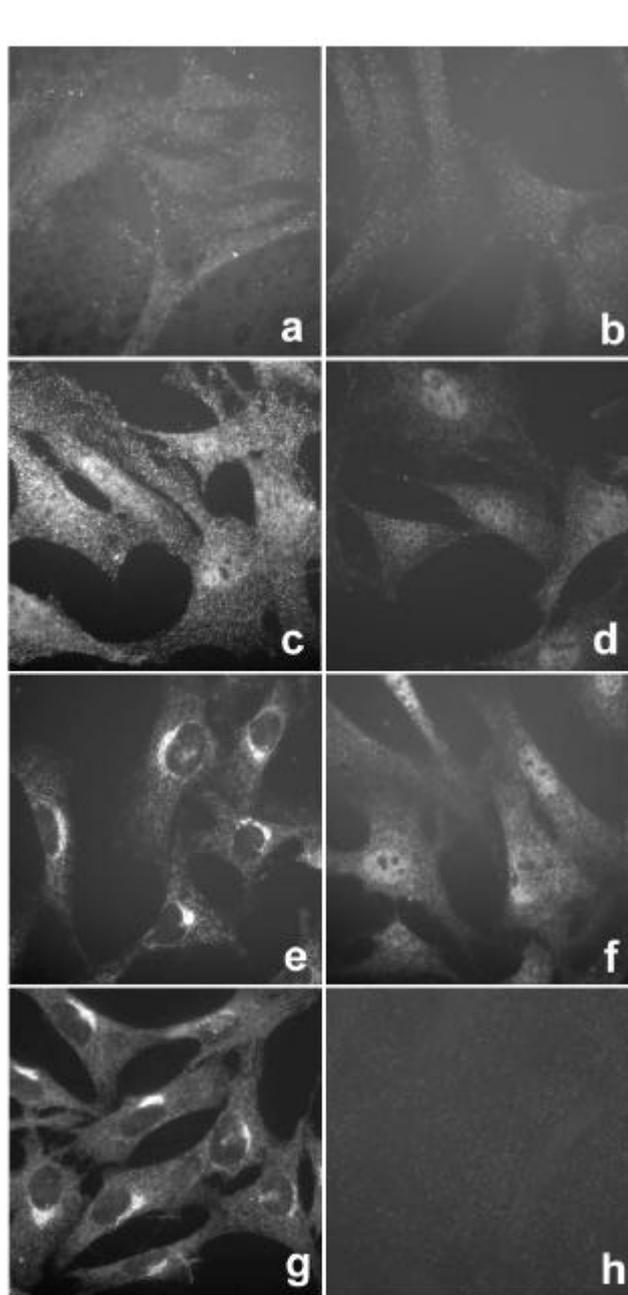
Zusammenfassend läßt sich folglich sagen, daß die R-Untereinheit RI $\alpha$  nicht zu detektieren war, die R-Untereinheit RI $\beta$  in unterschiedlicher Weise im Cytoplasma und - unter Vorbehalt - auch im Kern und die RII-Untereinheiten im Cytoplasma vornehmlich im Bereich des Golgi-Komplexes nachgewiesen werden konnten.

### 5.3.2 Vorkommen und Lokalisation von PKI

Zur Beantwortung der Frage nach dem Vorkommen und der Lokalisation von PKI wurde an logarithmisch wachsenden Vero-Zellen, wie sie auch in Mikroexperimenten eingesetzt wurden, eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt.

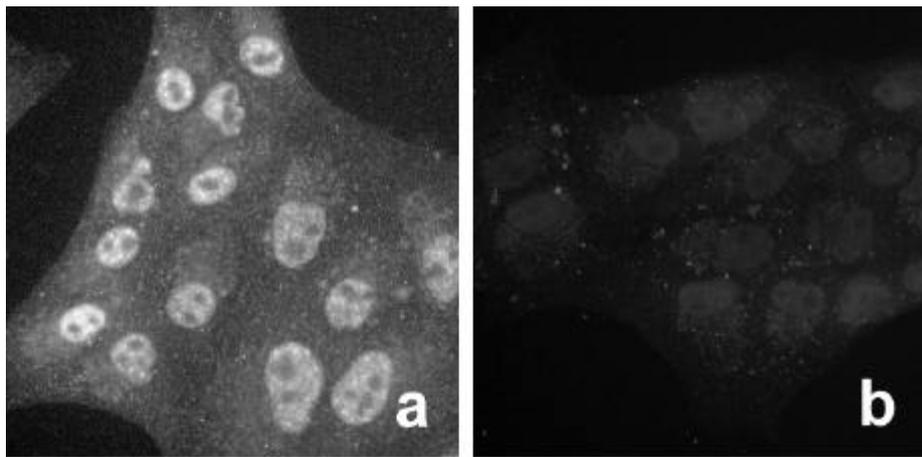
Es konnte in der Immunfluoreszenz gesehen werden, daß PKI sowohl im Cytoplasma als auch im Kern der exponentiell wachsenden Vero-Zellen vorkommt, wobei im Kern ein stärkeres Fluoreszenzsignal festzustellen war (Abb. 56 a). Die Fluoreszenzverteilung war diffus, d.h., PKI schien nicht an Strukturen zu binden. Die Nukleoli blieben ausgespart. Wie die Abbildung 56 b zeigt, war das Signal spezifisch, da es durch Inkubation des verwendeten Antikörpers mit dem antigenen PKI-Protein vollständig zu unterdrücken war.

Demnach kommt endogenes PKI in logarithmisch wachsenden Vero-Zellen in detektierbaren Konzentrationen vor. Bei den durchgeführten Experimenten muß folglich berücksichtigt werden, daß die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 auch durch PKI als Exportfaktor beeinflusst wird.



**Abbildung 55: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von NIH Swiss3T3-Zellen mit Antikörpern gegen die R-Untereinheiten**

Die logarithmisch wachsenden NIH Swiss3T3-Zellen wurden mit 3 % PFA fixiert, mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert und mit den Primärantikörpern anti-R1 $\alpha$  (Verdünnung: 1:50) **(a)**, anti-R1 $\beta$  (Verdünnung: 1:250) **(c)**, anti-R11 $\alpha$  (Verdünnung: 1:250) **(e)** bzw. anti-R11 $\beta$  (Verdünnung: 1:250) **(g)** und den Cy3-markierten Sekundärantikörpern Ziege-anti-Maus IgG (Verdünnung: 1:1000) bzw. Ziege-anti-Kaninchen IgG (Verdünnung: 1:2000) eine indirekte Immunfluoreszenz durchgeführt. Bei den Kontrollen wurden die Antikörper durch Vorinkubation mit den jeweiligen antigenen R-Untereinheiten R1 $\alpha$  **(b)**, R1 $\beta$  **(d)**, R11 $\alpha$  **(f)** bzw. R11 $\beta$  **(h)** (zur Verfügung gestellt von Herrn F. W. Herberg, Universität Bochum) blockiert. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte in einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop.



**Abbildung 56: Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Vero-Zellen mit einem Antikörper gegen den Proteinkinase-Inhibitor PKI**

Die logarithmisch wachsenden Vero-Zellen wurden mit 3% PFA fixiert und mit 0,1 % Triton X-100 permeabilisiert. Anschließend wurde eine indirekte Immunfluoreszenz mit dem Primärantikörper anti-PKI (C-20) (Verdünnung: 1:200) und einem FITC-markierten Sekundärantikörper (Verdünnung: 1:160) durchgeführt **(a)**. Als Kontrolle diente der Primärantikörper, der zuvor mit antigenem PKI blockiert wurde **(b)**. Die Detektion der Fluoreszenz erfolgte in einem herkömmlichen Fluoreszenzmikroskop.

## Diskussion

Der cAMP-abhängigen Proteinkinase (PKA) kommt eine Schlüsselrolle in der Regulation zellulärer Prozesse wie Hormonantwort, Zellwachstum, Differenzierung und Genexpression zu. Sie reguliert die Funktion einer Reihe von Proteinen in Cytoplasma und Kern. Während die katalytischen Untereinheiten (C-Untereinheiten) bei niedrigen intrazellulären cAMP-Konzentrationen an die regulatorischen Untereinheiten (R-Untereinheiten) gebunden als Holoenzym inaktiv im Cytoplasma vorliegen, können die C-Untereinheiten nach Erhöhung des cAMP-Spiegels in der Zelle vom Holoenzym dissoziieren und als aktiviertes Enzym ihre Substrate im Cytoplasma und im Kern phosphorylieren. Ausgehend von der Arbeit von Harootunian *et al.* [Harootunian *et al.* 1993] wird für die C-Untereinheiten passive Diffusion als Translokationsmechanismus zwischen Cytoplasma und Kern angenommen. Untersuchungen von Pepperkok *et al.* (2000) haben jedoch gezeigt, daß die intrazelluläre Verteilung der aktivierten C-Untereinheiten zwischen Kern und Cytoplasma durch eine posttranslationale Modifikation am zweiten N-terminalen Aminosäurerest der C-Untereinheit beeinflusst werden kann [Pepperkok *et al.* 2000]. Diese Beobachtung wurde zum Anlaß genommen, die Diffusion als Translokationsmechanismus der C-Untereinheiten zu hinterfragen und den Mechanismus aufzudecken, der der intrazellulären Verteilung der C-Untereinheiten zugrunde liegt.

In dieser Arbeit wurde der Einfluß verschiedener transportrelevanter Parameter auf die intrazelluläre Verteilung der C $\alpha$ -Untereinheit untersucht. Aus den Ergebnissen wurde eine mögliche Erklärung für den Mechanismus der Translokation und der Lokalisation der C $\alpha$ -Untereinheit entwickelt. Die Frage nach dem Translokationsmechanismus und der daraus resultierenden intrazellulären Verteilung der C $\alpha$ -Untereinheiten wurde zunächst über Mikroinjektionsexperimente und im weiteren Verlauf auch über Import-Assays mit permeabilisierten Zellen untersucht. Dazu wurden die Fluoreszenzintensität der fluoreszenzmarkierten C $\alpha$ -Untereinheit in Kern und Cytoplasma quantifiziert und das Verhältnis beider Intensitäten zueinander als  $F_{K/C}$ -Wert angegeben (s. *Ergebnisse* 2). Die  $F_{K/C}$ -Werte der fluoreszenzmarkierten C $\alpha$ -Untereinheit wurden in den Experimenten als Grundlage für Veränderungen in der intrazellulären Verteilung der Probe herangezogen.

## 1 Der Mechanismus der Kern-Cytoplasma-Translokation der C $\alpha$ -Untereinheit: Diffusion oder aktiver Transport?

**Der Vergleich der intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr mit der anderer Moleküle gibt keinen eindeutigen Hinweis auf den Translokationsmechanismus**

Mit einem Molekulargewicht von 41 kDa befindet sich die C $\alpha$ -Untereinheit noch im Größenbereich von Makromolekülen, der unter der Ausschlußgrenze ( $\geq 40 - 60$  kDa) für Diffusion durch die NPCs liegt. Da aber auch viele kleinere Moleküle aktiv und somit regulierbar in den Kern gelangen, ist das Molekulargewicht eines Moleküls allein noch kein Hinweis auf dessen Translokationsmodus.

Es wurde ein Vergleich der intrazellulären Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 mit der anderer Moleküle bekannter Translokationsmodi in Mikroinjektionsexperimenten durchgeführt. Als Kontrolle für den aktiven Transport wurde FLUOS-markiertes BSA verwendet, an das NLS-Peptide des SV40 T-Antigens gekoppelt waren (FL-BSA-NLS). Als Diffusionskontrollen dienten Cy3-markierter Trypsininhibitor aus Sojabohnen, STI-Cy3 (21 kDa), sowie Cy3-markiertes Maltose-bindendes Protein aus *E. coli*, MBP-Cy3 (43 kDa). STI-Cy3 wurde eingesetzt, da es auch in anderen, vergleichbaren Arbeiten als Diffusionskontrolle benutzt wurde. MBP-Cy3 wurde hingegen in dieser Arbeit erstmalig als Kontrolle für die Diffusion verwendet. Es bot sich als Kontrolle an, da es zu rC $\alpha$ myr-Cy3 eine ähnliche Größe, nach der Kristallstruktur zu urteilen, auch ähnliche Gestalt [Spurlino *et al.* 1991] sowie ein dadurch bedingtes vergleichbares Diffusionsverhalten hat, wie über Gelfiltration gezeigt werden konnte.

Die Höhe der in dieser Arbeit erreichten Kern-Cytoplasma-Verhältnisse der Fluoreszenz  $F_{K/C}$  ( $F_{K/C}$ -Werte zwischen 4 - 6) unterschied sich von den von Harootunian *et al.* [Harootunian *et al.* 1993] publizierten Werten für die rekombinante, nicht myristylierte C $\alpha$ -Untereinheit. Sie befand sich aber im Bereich von den von Pepperkok *et al.* [Pepperkok *et al.* 2000] für natives Enzym bestimmten Werten. Die Unterschiede im Niveau der erhaltenen  $F_{K/C}$ -Werte um einen Faktor von 2 bis 3 können möglicherweise mit unterschiedlicher experimenteller Durchführung und Auswertungsart erklärt werden. So werden z.B. nach Detektion der Fluoreszenz mit konfokaler Fluoreszenzmikroskopie (s. Harootunian *et al.*) geringere  $F_{K/C}$ -Werte erreicht als mit herkömmlicher Fluoreszenzmikroskopie (s. Pepperkok *et al.*, diese Arbeit), da bei der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie der Beitrag der Fluoreszenz im Cytoplasma an der Kernfluoreszenz wegfällt (s. *Ergebnisse* 2.4). Bei Harootunian *et al.* wurden zudem kernnahe helle Bereiche zur Auswertung ausgewählt, wodurch sich höhere cytoplasmatische Werte ergeben (*Ergebnisse* 2) als bei Pepperkok *et al.* (s. *Ergebnisse* 2.4), die verschiedene Zonen des Cytoplasmas zur Auswertung herangezogen haben, was zu

geringeren Werten für die cytoplasmatische Fluoreszenzintensität und damit höheren  $F_{K/C}$ -Werten führt. Ein gegenüber dem  $F_{K/C}$ -Wert von MBP-Cy3 höherer  $F_{K/C}$ -Wert von rC $\alpha$ myr-Cy3 könnte als Hinweis für aktiven Import gesehen werden. Der  $F_{K/C}$ -Wert der kleineren Diffusionskontrolle STI-Cy3 ist jedoch verglichen mit rC $\alpha$ myr-Cy3 noch etwas höher, was auch von Harootunian *et al.* [Harootunian *et al.* 1993] beobachtet wurde, wenn auch auf viel geringerem Niveau. Die Höhe der Verteilungsverhältnisse allein kann deshalb nicht als Hinweis auf den Transportmodus herangezogen werden.

Die im Vergleich sehr viel höheren Werte für die intrazellulären Verteilungsverhältnisse  $F_{K/C}$  von FL-BSA-NLS lassen sich damit erklären, daß dieses zwar aktiv in den Kern gelangen, aber aufgrund seiner molekularen Größe nicht wieder aus dem Kern diffundieren kann. Da ihm ein entsprechendes Exportsignal fehlt, ist auch aktiver Export nicht möglich.  $F_{K/C}$  von FL-BSA-NLS hängt direkt von der eingesetzten Konzentration an fluoreszenzmarkierter Probe ab [Schulz und Peters 1987]. Da die C $\alpha$ -Untereinheit sich sowohl in den Kern hinein als auch aus den Kern heraus bewegen kann, wie von Harootunian *et al.* [Harootunian *et al.* 1993] gezeigt wurde, kann sich hier ein Gleichgewicht zwischen verschiedenen Translokationsmodi und -wegen (Diffusion und aktivem Transport) einstellen.

### **Die Kinetik der Translokation von rC $\alpha$ myr ist langsam verglichen mit der aktiv importierter Moleküle und der kleinerer diffusibler Moleküle**

Die Geschwindigkeit der Diffusion in den Kern zeigt sich von dem Stoke'schen Radius der diffusiblen Moleküle abhängig. Aktiver Transport ist dagegen offenbar unabhängig von dem Molekulargewicht und der Form der Transportsubstrate und läuft immer schnell ab. Deshalb bekommt man über den Verlauf der Translokationskinetik einen Hinweis auf die Art der Translokation.

Es zeigte sich, daß rC $\alpha$ myr-Cy3 nach Mikroinjektion ins Cytoplasma viel langsamer im Kern akkumuliert als die kleine Diffusionskontrolle STI-Cy3 oder FL-BSA-NLS. Bei rC $\alpha$ myr-Cy3 stellt sich erst nach 10 - 15 Minuten ein Gleichgewicht in der intrazellulären Verteilung ein. STI-Cy3 erreicht dagegen als nur halb so große Diffusionskontrolle schon nach weniger als 5 Minuten ein Verteilungsgleichgewicht. Die im Vergleich zu rC $\alpha$ myr-Cy3 nur wenig größere Diffusionskontrolle MBP-Cy3 braucht dagegen ungefähr 20 Minuten, um ein *steady state* zu erreichen.

Da beim aktiven Transport anders als bei der Diffusion das Erreichen des Plateaus konzentrationsabhängig ist, wurden die Anfangskinetiken der Translokation in den Kern verglichen. Im Import-Assay war es möglich, die Translokation in den Kern am konfokalem Laserscanning-Mikroskop (CLSM) schon während der ersten Minute zu verfolgen. Auch hier zeigte sich, daß rC $\alpha$ myr-Cy3 eine langsamere Translokationskinetik zu haben scheint, als für

aktiv importierte Transportsubstrate beobachtet werden kann (persönliche Mitteilung, K. Ribbeck, ZMBH, Heidelberg).

Die Kinetiken geben somit einen Hinweis darauf, daß rC $\alpha$ myr-Cy3 eher passiv als aktiv in den Kern gelangt. Die intrazelluläre Verteilung der Diffusionskontrollen und von rC $\alpha$ myr-Cy3 scheint der Regel zu folgen, daß größere Moleküle weniger effektiv durch NPC diffundieren, wodurch sich das Equilibrium zwischen Kern und Cytoplasma langsamer einstellt. Die Geschwindigkeit, mit der STI-Cy3 sein Verteilungsplateau erlangt, könnte zusätzlich noch durch das Vorhandensein von Bindungsstellen im Kern vergrößert sein, die es aus dem Verteilungsgleichgewicht ziehen. Da sich bei rC $\alpha$ myr-Cy3 trotz seines geringen Größenunterschieds zu MBP-Cy3 das Verteilungsgleichgewicht wesentlich schneller einzustellen scheint, ist auch hier das Vorhandensein von Bindungsstellen im Kern denkbar.

### **Fehlen eines funktionellen NLS in der Sequenz der C $\alpha$ -Untereinheit**

Um die Existenz eines funktionellen NLS, das den aktiven Import vermittelt, in der Sequenz der C $\alpha$ -Untereinheit zu überprüfen, wurden Fusionsproteine der C $\alpha$ -Untereinheit verwendet. Schulz und Peters haben [Schulz und Peters 1986] gezeigt, daß auch sehr große Proteine wie Phycoerythrin (240 kDa) nach Fusion an ein Protein mit einem funktionellen NLS in den Kern transportiert werden können. Die Fusion der 113 kDa großen  $\beta$ -Galaktosidase an die C $\alpha$ -Untereinheit führte dazu, daß das Fusionsprotein mit einer Größe von mehr als 150 kDa nach Mikroinjektion in das Cytoplasma und im Import-Assay mit permeabilisierten Zellen vom Kern ausgeschlossen blieb. Das stimmt mit einer Kernausschlußgrenze für Diffusion von 40 - 60 kDa überein. Das Unvermögen der C $\alpha$ -Untereinheit,  $\beta$ -Galaktosidase in den Kern zu verhelfen, kann damit als Fehlen eines funktionellen NLS gewertet werden. Das Vorhandensein eines funktionellen NLS scheint ausgeschlossen werden zu können, da sich die Translokation der C $\alpha$ -Untereinheit in den Kern größenabhängig zeigte, der aktive Signalvermittelte Transport aber unabhängig von der Molekülgröße (bis zu Molekülgrößen von mehreren MDa) abläuft. Diese Beobachtung stimmt mit der von Harootunian *et al.* überein [Harootunian *et al.* 1993]. Deren Fusionsprodukt aus C $\alpha$ -Untereinheit und GST blieb ebenfalls vom Kern ausgeschlossen. Anders als bei Harootunian *et al.* wurde in dieser Arbeit  $\beta$ -Galaktosidase jedoch C-terminal an die C $\alpha$ -Untereinheit fusioniert, um den N-Terminus möglichst wenig zu beeinflussen. Dies geschah unter Berücksichtigung der Beobachtungen von Pepperkok *et al.* [Pepperkok *et al.* 2000], daß dem N-Terminus bei der Translokation der C $\alpha$ -Untereinheit eine besondere Rolle zukommt. Die Art der Fusion scheint aber keinen Einfluß auf die Translokation der C $\alpha$ -Fusionsproteine zu haben.

In diesem Zusammenhang ist auch die Fusion der ersten 40 Aminosäurereste des N-Terminus der C $\alpha$ -Untereinheit, die z.T. eine  $\alpha$ -Helix (A-Helix) ausbilden, an GST zu sehen. Der N-Terminus weist eine Reihe basischer Aminosäurereste auf, die auch für das klassische NLS typisch sind. Die mit diesem Fusionsprotein aus N-Terminus der C $\alpha$ -Untereinheit und GST nach Mikroinjektion ins Cytoplasma erreichten  $F_{K/C}$  waren ähnlich gering wie die von GST-Cy3 allein und lagen damit weit unter denen von rC $\alpha$ myr-Cy3. Der N-Terminus scheint demnach trotz seiner hohen Dichte an basischen Aminosäuren kein Signal zu beinhalten, das in der Lage ist, die Translokation von GST zu beeinflussen. Da das klassische NLS nur über seine Primärsequenz bestimmt wird, dürfte das Herausnehmen des N-Terminus aus seiner natürlichen Umgebung keinen Einfluß auf die Funktionalität des NLS haben. So übt das klassische NLS des SV40 T-Antigens auch dann noch seine Funktion aus, wenn es als Peptid an andere Proteine gekoppelt wird, wie bei dem in dieser Arbeit verwendeten FL-BSA-NLS.

Fantozzi *et al.* [Fantozzi *et al.* 1992] hatten bereits zuvor in der Sequenz der C $\alpha$ -Untereinheit nach Peptiden mit NLS-Ähnlichkeit gesucht. Doch ortsspezifische Mutagenese-Studien haben gezeigt, daß es sich bei der auf der Moleküloberfläche gefundenen Peptidsequenz KRVK (189-192) nicht um ein funktionelles Signal für den Kernimport handeln kann. Die Mutationen dieser Sequenz führten nicht zu Veränderungen der intrazellulären Verteilung der C $\alpha$ -Untereinheiten.

Die von Pepperkok *et al.* [Pepperkok *et al.* 2000] gemachte Beobachtung, daß dem zweiten N-terminalen Rest eine die intrazelluläre Verteilung der C-Untereinheit regulierende Funktion zukommt, scheint also weniger auf ein Sequenzsignal hinzuweisen, sondern eher entweder auf Konformationsänderungen der C-Untereinheiten, die das Diffusionsverhalten beeinflussen, oder auf ein verändertes Bindungsverhalten des Enzyms.

Jüngste Beobachtungen haben gezeigt, daß die Kernlokalisierung auch über eine amphipatische  $\alpha$ -Helix vermittelt werden kann, wobei diese als Ganzes und in der richtigen Orientierung vorliegen muß. Die entsprechende  $\alpha$ -Helix kann dabei sowohl mitten im Protein lokalisiert sein, wie z. B. bei der  $\beta$ -Isoform der Typ II Phosphatidylinositolphosphat-Kinase [Ciruela *et al.* 2000], als auch am N-Terminus, wie es bei dem viralen Protein Vpr des HIV der Fall ist [Popov *et al.* 1998; Popov *et al.* 1998]. Da die A-Helix der C $\alpha$ -Untereinheit im C $\alpha$ (1-40)-GST-Fusionsprotein möglicherweise nicht die physiologische Orientierung wie in der intakten C $\alpha$ -Untereinheit hat, ist die Translokation über einen solchen Mechanismus durch diese Experimente allerdings nicht restlos auszuschließen.

### **Keine Konkurrenz der Translokation von rC $\alpha$ myr durch NLS**

Um zu untersuchen, ob rC $\alpha$ myr-Cy3 über den Importweg des klassischen NLS in den Kern gelangt, wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt.

Eine Sättigung der Importin  $\alpha$ -Bindungsstellen mit NLS durch Zugabe von NLS-Peptid des SV40 T-Antigens führte nicht zu einer Beeinträchtigung der Akkumulation von rC $\alpha$ myr-Cy3 im Kern. rC $\alpha$ myr-Cy3 scheint demnach unter den experimentellen Bedingungen nicht mit dem Peptid um eine NLS-Bindung am NLS-Rezeptor Importin  $\alpha$  zu konkurrieren. Durch Coinjektion von rC $\alpha$ myr-Cy3 mit BSA-NLS konnte ebenfalls kein Effekt auf die intrazelluläre Verteilung der Kinase gemessen werden. Eine Konkurrenz um den Importweg des klassischen NLS bzw. um von diesem genutzte Bindungsstellen in NPCs kann vor allem im Kontext der anderen Daten dieser Arbeit offenbar ausgeschlossen werden.

### **Energie- und Temperaturabhängigkeit der Translokation von rC $\alpha$ myr**

Entgegen der Tatsache, daß in der Literatur der aktive Transport in der Vergangenheit oft als ATP-abhängige und damit temperaturabhängige Reaktion beschrieben wurde, konnte bislang weder beim Import noch beim Export ein ATP-abhängiger Schritt identifiziert werden [Talcott und Moore 1999]. Dennoch wird nach Schulz und Peters [Schulz und Peters 1987] der aktive Import von fluoreszenzmarkiertem Nukleoplasmin in den Kern in Mikroinjektionsexperimenten durch ATP-Depletion oder Temperaturerniedrigung verhindert. Da für diffusible Moleküle eine solche Beeinträchtigung nicht zu beobachten war, wurde die Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 und von Kontrollproteinen daraufhin untersucht.

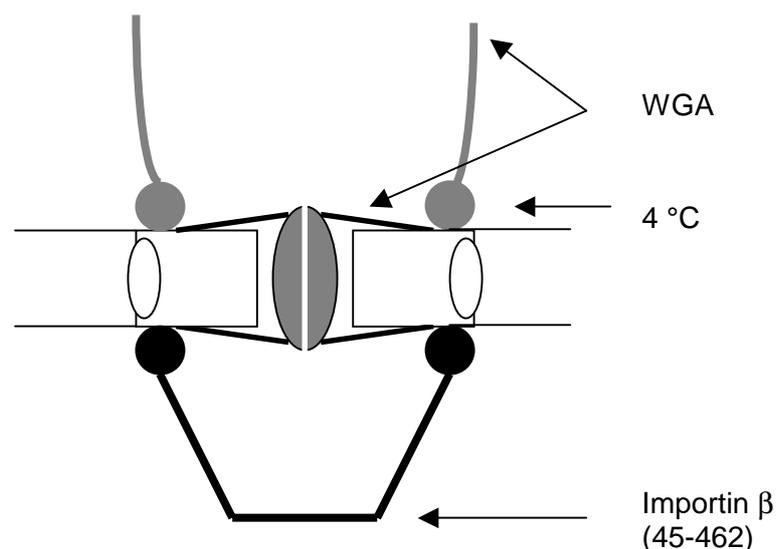
Es zeigte sich, daß der Import von FL-BSA-NLS durch Temperaturerniedrigung bzw. ATP-Depletion deutlich inhibiert wurde, während sich bei STI-Cy3 kein Effekt einstellte. Die Diffusion von MBP-Cy3 wurde dagegen beeinträchtigt. MBP-Cy3 verblieb fast vollständig im Cytoplasma. rC $\alpha$ myr-Cy3 verhielt sich ähnlich wie MBP-Cy3. Die Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 zeigte sich bei Absenken der Temperatur auf 4 °C bzw. ATP-Depletion deutlich cytoplasmatischer.

Während sich bei FL-BSA-NLS und STI-Cy3 die erwarteten Ergebnisse einstellen, entsprach das Ergebnis von MBP-Cy3 nicht den Erwartungen. Das Verhalten von MBP-Cy3 als Diffusionskontrolle - ohne Interaktionen mit den Nukleoporinen - läßt vermuten, daß es sich bei der Beeinträchtigung der Diffusion in den Kern um einen Sekundäreffekt handelt. So könnten als Folge der Inhibition des aktiven Transports Transportsubstrate, die in ihrer Translokation durch die NPCs inhibiert wurden, die Kernporen verengen. Größere diffusible Proteine wie MBP-Cy3 könnten so an der Diffusion durch die NPC gehindert werden, während kleine Moleküle noch durch die Pore hindurchtreten könnten. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung von Newmeyer und Forbes [Newmeyer und Forbes 1988] bzw.

Richardson *et al* [Richardson *et al.* 1988] gestützt, die nach ATP-Depletion Transportintermediate an den NPCs arretiert vorfanden (Abb. 57). Ihr Erklärungsansatz, daß sich einem energieunabhängigen Andocken des Transportkomplexes an die Kernpore eine energiebedürftige Translokation des Transportsubstrates durch die Pore anschließt, hat sich allerdings nicht bestätigt. Möglich wäre allerdings, daß große Transportmoleküle, wie z.B. mRNP-Komplexe, einen zusätzlichen Energiebedarf bei der Translokation durch die NPCs haben, der durch ihre Linearisierung oder aber eine dazu notwendige Konformationsänderung der NPC bedingt sein könnte [Talcott und Moore 1999].

Weiterhin wird die Hypothese durch die Vermutung von Talcott und Moore [Talcott und Moore 1999] gestützt, daß die scheinbar energieunabhängige Bewegung des Importin  $\beta$ -Transportkomplexes durch die NPCs nach Herunterkühlen der Zellen auf 4 °C durch die temperaturbedingte Inhibition der sequentiellen Assoziation-Dissoziation-Reaktionen bei Durchtritt des Importkomplexes durch die Pore beeinträchtigt wird.

Für rC $\alpha$ myr-Cy3 als ähnlich großes Protein wie MBP-Cy3 wäre die für MBP-Cy3 aufgestellte Hypothese ebenfalls denkbar. Der mögliche Einwand, daß PKA in der enzymatischen Aktivität und der Bindung von Inhibitoren ATP-abhängig sei und dies die intrazelluläre Verteilung beeinflussen könnte, wird sowohl durch den Vergleich mit der sich ähnlich verhaltenden Diffusionskontrolle als auch durch die Beobachtungen der Experimente mit den Kinase-Inhibitoren abgeschwächt.



**Abbildung 57: Mögliche Blockaden in einem Kernporenkomplex durch Temperaturerniedrigung, WGA-Behandlung oder Zugabe dominant-negativer Importin  $\beta$ -Deletionsmutanten**

Darstellung des NPC nach Allen *et al.* [Allen *et al.* 2000]. Die Blockierungsstellen wurden nach Äußerungen von Ueli Aebi eingetragen (persönliche Mitteilung, 2000).

### Einfluß des Ran-Systems auf die Translokation von rC $\alpha$ myr

Die GTP-Hydrolyse scheint die hauptsächliche, wenn nicht sogar die einzige Energiequelle für den aktiven Transport, wie z.B. dem Importin  $\beta$ -vermittelten Import, zu sein [Bischoff und Gorlich 1997; Moore und Blobel 1993; Weis *et al.* 1996]. Die Notwendigkeit der GTP-Hydrolyse für die Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 kann durch Verwendung der dominant-negativen Ran-Mutante Ran(Q69L) und von nicht hydrolysierbaren GTP-Analoga untersucht werden. Diese Ran-Mutante ist zwar in der Lage, GTP zu binden, kann dieses aber nicht mehr hydrolysieren und verbleibt so in GTP-gebundener Form. Es konnte gezeigt werden, daß die Zugabe von Ran(Q69L)-GTP den Import von NLS-haltigen Transportsubstraten blockiert [Palacios *et al.* 1997]. Nicht hydrolysierbare GTP-Analoga können GTP in seiner Funktion substituieren, was deutlich macht, daß die durch GTP-Hydrolyse freiwerdende Energie nicht das ist, was Substrate durch die Poren treibt [Talcott und Moore 1999]. Der Komplex aus Ran und GTP-Analoga kann genau wie Ran(Q69L)-GTP oder Wildtyp-Ran auch den Transportkomplex dissoziieren und das Transportsubstrat in den Kern entlassen. Der Transportrezeptor kann dann zwar auch ins Cytoplasma zurückkehren, dort jedoch kein Imports substrat mehr binden. Dazu müßte erst das GTP aus dem Ran-GTP-Komplex entfernt werden, ein Prozeß, der die Hydrolyse von GTP erfordert. Der mehrzyklische Import bedarf demnach der GTP-Hydrolyse und tritt somit nicht in Gegenwart von GTP-Analoga auf. Bei Verwendung von GTP-Analoga bzw. der Ran-Mutante akkumulieren die Transportkomplexe aus Transportrezeptor, Ran und GTP-Analoga im Cytoplasma, wodurch nur eine Importrunde möglich ist [Ribbeck *et al.* 1999]. Eine Abhängigkeit der Translokation von Ran-GTP könnte damit auf aktiven Transport hindeuten. Es sind jedoch nicht alle aktiven Kerntransportwege Ran-abhängig. So benötigt z.B. der Transportin-abhängige Import von M9-haltigen Imports substraten weder Ran-GTPase noch NTP-Hydrolyse [Englmeier. *et al.* 1999; Ribbeck *et al.* 1999].

In dieser Arbeit zeigte sich, daß offenbar sowohl die Verwendung der GTP-hydrolysedefizienten Ran(Q69L)-Mutante als auch der nicht hydrolysierbaren GTP-Analoga GTP- $\gamma$ -S und GMP-PNP in Mikroinjektionsexperimenten zu einer geringeren Akkumulation von rC $\alpha$ myr-Cy3 im Kern führte. Nach Vorinkubation der Zellen mit Ran(Q69L)-GTP wurden um 30 - 40 % verringerte  $F_{K/C}$ -Werte bestimmt und nach GTP- $\gamma$ -S- bzw. GMP-PNP-Gabe eine 50 %-ige Erniedrigung beobachtet. Das zeigt, daß die Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 in den Kern durch die Eingriffe in das Ran-System deutlich beeinflußt wird. Das Ergebnis für sich betrachtet befürwortet die Annahme des aktiven Imports für die rC $\alpha$ myr-Cy3. Unter Berücksichtigung der Beobachtung, daß die Diffusion der Diffusionskontrolle MBP-Cy3 im gleichen Maße wie die Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 beeinträchtigt wird, kann Diffusion als möglicher Weg für die rC $\alpha$ myr-Cy3 in den Kern auch mit diesen Daten jedoch nicht ausgeschlossen werden. Es stellt sich vielmehr die Frage, ob die Beeinträchtigung der

intrazellulären Verteilung beider um die 40 kDa großen Proteine nicht vielmehr auch hier indirekter Natur sein könnte. So könnte die beobachtete Beeinträchtigung eine Folge der Inhibition anderer vom Ran-GTP-System abhängiger Prozesse und weniger eine Folge des direkten Bedarfs der GTP-Hydrolyse bei der Translokation beider Proteine in den Kern sein. Daß nicht die experimentelle Durchführung der Grund für diese Ergebnisse ist, zeigen die Experimente mit den Kontrollen FL-BSA-NLS und STI-Cy3, die sich erwartungsgemäß verhalten. Während sich in der intrazellulären Verteilung des STI-Cy3 als Diffusionskontrolle durch Blockierung der GTP-Hydrolyse keine Veränderung ergibt, wird die Akkumulation des FL-BSA-NLS im Kern inhibiert. Um 70 – 80 % niedrigere  $F_{KC}$ -Werte machen die Abhängigkeit des Imports von FL-BSA-NLS vom Ran-System deutlich. Eine 100%-ige Inhibition war nicht zu erwarten, da ein erster Importzyklus auch ohne Hydrolyse von Ran möglich ist. Lediglich das Recycling von Importin  $\beta$  für weitere Importrunden wird verhindert.

### **Einfluß des Cytosols auf die Translokation von rC $\alpha$ myr**

Da der aktive Import oft von cytosolischen Faktoren wie z.B. den Importinen oder dem Ran-System abhängig ist, läuft er nur in Gegenwart von Cytoplasma ab. Im Import-Assay war es möglich, das Translokationsverhalten von rC $\alpha$ myr-Cy3 in die Kerne Digitonin-permeabilisierter HeLa-Zellen in einem Cytoplasma-freien System zu untersuchen.

Es zeigte sich, daß rC $\alpha$ myr-Cy3 offenbar auch ohne Zusatz von cytosolischen Faktoren in die Kerne der permeabilisierten Zellen gelangen kann, ein deutlicher Hinweis auf Diffusion. Transportfaktoren scheinen somit für die Kern-Cytoplasma-Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 nicht zwingend notwendig zu sein. Experimente mit FL-BSA-NLS erforderten dagegen die Substitution von Cytosol, Energie-regenerierendem System und Importin  $\alpha$ , da dessen Konzentration in dem als Cytosol-Substitut verwendeten Retikulozytenextrakt zu gering ist (persönliche Mitteilung, Katharina Ribbeck, ZMBH, Heidelberg). Die Abhängigkeit des NLS-vermittelten Imports von der Substitution von Cytosol bzw. cytosolischen Fraktionen konnte bereits zuvor gezeigt werden [Adam *et al.* 1990; Moore und Blobel 1993].

Der Einsatz von rC $\alpha$ myr-depletiertem Retikulozytenextrakt als Cytosol-Substitut im Import-Assay ergab, daß in der Mehrzahl der Digitonin-permeabilisierten HeLa-Zellen keine deutliche Akkumulation von rC $\alpha$ myr-Cy3 zu erkennen war. Dagegen wiesen die meisten Zellen nach Zugabe des pseudodepletierten Extrakts eine deutliche Akkumulation auf.

Obwohl rC $\alpha$ myr-Cy3 auch unter Cytoplasma-freien Bedingungen in den Kern gelangen kann, konnten durch Zugabe eines Energie-regenerierenden Systems sowie Komponenten des Ran-Systems dennoch bis zu 60 % höhere  $F_{KC}$ -Werte erreicht werden, ein Ergebnis, daß zu den Beobachtungen der Mikroinjektionsexperimente, in denen die Energieabhängigkeit untersucht wurde, paßt. Allerdings werden auch hier Sekundäreffekte als Ursache

angenommen. Noch im System verbliebene, aktiv translozierende Transportsubstrate könnten durch fehlende Komponenten wie Ran in ihrer Bewegung durch die NPC gestoppt werden und so die Poren verengen. Ein Durchtreten von rC $\alpha$ myr-Cy3 in den Kern könnte deshalb sterisch gehindert werden. Das gleiche gilt für die Import-Assays, in denen Retikulozytenextrakt und Energie zugegeben wurden und bei denen ebenfalls höhere  $F_{K/C}$ -Werte beobachtet werden konnten. Anders als beim Vergleich der Translokation mit und ohne Zusatz eines Energie-regenerierenden Systems und von Komponenten des Ran-Systems stellten sich die Unterschiede in Abhängigkeit vom substituierten Cytosol erst nach mehreren Minuten ein, was sehr für eine indirekte Abhängigkeit spricht. Es ist denkbar, daß die Unterschiede hier weniger durch Blockieren der NPC durch andere Transportsubstrate als durch eine im Verlauf des Assays veränderte Verfügbarkeit von nukleären Bindungspartnern, die auch erst in den Kern importiert werden müßten, hervorgerufen werden. Des weiteren wäre auch eine Beeinträchtigung der Translokation aufgrund einer Beeinflussung der NPCs durch Retikulozytenextrakt-spezifische Eigenschaften, wie z.B. seine hohe Kinase-Aktivität, möglich.

### **Blockierung der NPCs beeinträchtigt die Translokation von rC $\alpha$ myr**

Der aktive Transport läßt sich weiterhin über Interaktionen des Transportsubstrats mit den Kernporenkomplexen (NPC) charakterisieren. In Gegenwart von Weizenkeimagglutinin (WGA) oder der Importin  $\beta$ -Mutante (45-642) werden NPCs blockiert. Der aktive Transport ist inhibiert, während diffusible Moleküle noch in den Kern gelangen können.

Nach Finlay *et al.* [Finlay *et al.* 1987] bindet das Lektin WGA an N-Acetyl-D-Glukosamin-Reste, durch die viele Nukleoporine modifiziert sind, und blockiert so den NLS-vermittelten Import, ohne dabei die passive Diffusion kleiner Makromoleküle zu beeinträchtigen. In Experimenten mit WGA-markierten Goldpartikeln konnten Rutherford *et al.* [Rutherford *et al.* 1997] zeigen, daß WGA in der zentralen Region des NPC und besonders mit der Oberfläche der inneren cytoplasmatischen Filamente, die den zentralen Ring mit dem Transporter verbinden, interagiert (Abb. 57). Dadurch scheint sich eine Barriere auszubilden, da nach WGA-Zugabe keine Goldpartikel mehr im Transporter zu sehen waren, an die Nukleoplasmin als NLS-haltiges aktives Importsubstrat gekoppelt worden war. Das Binden von WGA an die inneren Filamente, die möglicherweise in einem Öffnungs- und Schließmechanismus des zentralen Kanals im Transporter involviert sind, könnte den Eintritt des Transportsubstrates in den Transporter verhindern [Allen *et al.* 2000; Rutherford *et al.* 1997] (Abb. 57).

In Mikroinjektionsexperimenten und Import-Assays wurden deshalb die NPCs durch Weizenkeimagglutinin (WGA) oder Importin  $\beta$  (45-642) blockiert und der Effekt auf die Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 und von Kontrollproteinen beobachtet.

Nach Mikroinjektion von FL-BSA-NLS ins Cytoplasma war in Gegenwart von WGA im Kern kaum Fluoreszenz zu messen, was den Vorgaben aus den Literatur entspricht. Auch die unveränderte intrazelluläre Verteilung der kleinen Diffusionskontrolle STI-Cy3 nach WGA-Behandlung wich nicht von den bereits veröffentlichten Beobachtungen ab. Erstaunlicherweise verhielt sich MBP-Cy3 anders, als für eine diffusible Probe erwartet wurde. Hier konnte eine deutliche Inhibition der Translokation in den Kern bis hin zum Kernausschluß beobachtet werden. Dieser Befund widerspricht den publizierten Beobachtungen. Die Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 in den Kern zeigte sich in Gegenwart von WGA ebenfalls beeinträchtigt. Obwohl die beobachtete Inhibition eigentlich als Hinweis für aktiven Transport gewertet werden könnte, kristallisiert sich für rC $\alpha$ myr-Cy3 durch den Vergleich mit MBP-Cy3 Diffusion als Translokationsmechanismus weiter heraus. Für MBP-Cy3 kann aktiver Transport ausgeschlossen werden, da es, wie besonders im Import-Assay deutlich wird, keine Akkumulation im Kern zeigt und es aufgrund seiner bakteriellen Herkunft kein NLS haben sollte.

Die dominant negative Importin  $\beta$ -Mutante (45 – 462), die zwar noch eine hohe Affinität zum NPC hat, aber weder mit Ran noch mit Importin  $\alpha$  interagiert, bindet anders als WGA irreversibel an die Nukleoporine und ist somit ein potenter Inhibitor des aktiven Transports [Görlich *et al.* 1996]. Das 45-462 Fragment konnte auf der nukleären Seite der NPC sichtbar gemacht werden, an der normalerweise die Termination der Translokation auftritt und an der Interaktionen mit Ran-GTP notwendig sind, um Importin  $\beta$  von den NPCs zu dissoziieren [Kutay *et al.* 1997]. Sie verhindert nicht nur den Import des klassischen NLS, sondern blockiert auch andere Transportwege mit gleicher Effizienz wie z.B. den M9-Import, den NES-vermittelten Kernexport sowie den Export von mRNA, U snRNA und etwas weniger effizient den von tRNA [Izaurralde *et al.* 1997; Kutay *et al.* 1997]. Es wurde deshalb vermutet, daß sich die Transportkomplexe verschiedener Transportwege entweder die Bindungsstellen der NPCs teilen oder aber, daß es Mechanismen gibt, die die Translokationen über die verschiedenen Wege durch die NPCs koordinieren [Kutay *et al.* 1997] (Abb. 57).

Die nach Coinjektion der Importin  $\beta$ -Mutante erzielten Ergebnisse entsprachen denen nach WGA-Behandlung. Sie zeigten sich jedoch etwas weniger ausgeprägt, was u.a. durch die Dosisabhängigkeit beider Inhibitionen erklärt werden könnte. Dennoch waren die intrazellulären Verteilungen von FL-BSA-NLS, MBP-Cy3 und rC $\alpha$ myr-Cy3 auch hier stark beeinträchtigt. Die  $F_{KC}$ -Werte von STI-Cy3 verhielten sich dagegen weitestgehend unverändert (Abnahme um ca. 10 % nach Importin  $\beta$  (45-462)-Behandlung). In Import-Assays mit FL-BSA-NLS und rC $\alpha$ myr-Cy3 wurde die Beeinträchtigung der Akkumulation beider Proben im Kern durch die Importin  $\beta$ -Mutante bestätigt. Die Tatsache, daß sowohl die Coinjektion von WGA als auch die Behandlung mit dem Importin  $\beta$ -Fragment (45-462) die Akkumulation von STI-Cy3 im Kern nicht verhindern konnte, die Kern-Cytoplasma-

Translokation von MBP-Cy3 und rC $\alpha$ myr-Cy3 dagegen doch, könnte ein Hinweis drauf sein, daß die Diffusion von STI-Cy3 durch NPCs sich von der von MBP-Cy3 und von rC $\alpha$ myr-Cy3 unterscheidet.

### **Keine Abhängigkeit der Translokation von rC $\alpha$ myr vom Cytoskelett**

Für die 80 kDa-große Proteinkinase C (PKC $\alpha$ ), eine ebenfalls in Kern und Cytoplasma aktive Kinase, wird anders als für Transportsubstrate mit klassischem NLS, ein nur von der Integrität des Cytoskeletts abhängiger Importmechanismus beschrieben [Schmalz *et al.* 1998; Schmalz *et al.* 1996]. Auf der Suche nach Parametern, die die Translokation der C $\alpha$ -Untereinheit beeinflussen, wurde in dieser Arbeit diese Abhängigkeit auch für PKA überprüft. Es wurde Cytochalasin B, ein Zellmembran-gängiges Pilztoxin, das die Formation kontraktiler Mikrofilamente blockiert, verwendet, um das Cytoskelett zu depolymerisieren. Für rC $\alpha$ myr-Cy3 der PKA konnte in Mikroinjektionsexperimenten keine Abhängigkeit der Akkumulation im Kern von der Integrität des Cytoskeletts nachgewiesen werden. Die sich nach Vorinkubation der Zellen mit Cytochalasin B einstellenden Werte für  $F_{K/C}$  von rC $\alpha$ myr-Cy3 waren in ihrer Höhe nicht beeinträchtigt, sondern durch die Cytochalasin B-bedingten morphologischen Veränderungen sogar noch leicht erhöht. Der für den Import von PKC $\alpha$  vorgeschlagene Cytoskelett-abhängige Weg scheint damit für PKA nicht in Frage zu kommen.

### **Kein Einfluß der Kinase-Aktivität von rC $\alpha$ myr auf die Translokation**

Durch Zugaben von Inhibitoren der Kinase-Aktivität wurde überprüft, ob die Kainaseaktivität bzw. das katalytische Zentrum einen Einfluß auf die Kern-Cytoplasma-Translokation und die intrazelluläre Verteilung der C $\alpha$ -Untereinheit haben. Dazu verwendet wurde der synthetische Inhibitor H-8 ( $K_i$ : 1,2  $\mu$ M) und dessen Derivat H-89 ( $K_i$ : 48 nM) [Chijiwa *et al.* 1990; Hidaka *et al.* 1984], die die Kinase durch Konkurrenz zu ATP im katalytischen Zentrum inhibieren, bzw. modifiziertes PKI $\alpha$ -Peptid (6-24) ( $K_i$ : 2 nM, PKI (5-24)) [Fernandez *et al.* 1991; Herberg und Taylor 1993], das mit Substrat um die Bindung im katalytischen Zentrum kompetitiert. Die Inhibitoren der enzymatischen PKA-Aktivität zeigten sich nicht in der Lage, die Kernakkumulation von rC $\alpha$ myr-Cy3 zu blockieren. Sowohl die Kern-Cytoplasma-Translokation als auch die Kernlokalisierung von rC $\alpha$ myr-Cy3 scheinen somit unabhängig von der katalytischen Aktivität zu sein.

Nicht bestätigt werden konnte die Annahme, daß aufgrund der höheren Affinität endogener Komponenten zu rC $\alpha$ myr-Cy3 die Wirkung der synthetischen Inhibitoren außer Kraft gesetzt

werden könnte. Die durch PKA induzierten morphologischen Veränderungen der Zellen, das Sich-Abrunden bzw. das Ausbilden von Zellausläufern, waren in Gegenwart der Inhibitoren nicht zu beobachten. Die Zellen blieben flach, ein Hinweis darauf, daß die Inhibitoren auch *in vivo* ihre inhibitorische Wirkung zeigten.

Auch die Mikroinjektionsexperimente mit der zu 90 % inaktiven C $\alpha$ -Mutante His-rC $\alpha$  (E91Q) (persönliche Mitteilung, T. Schneider, DKFZ, Heidelberg) zeigten keine zum Wildtyp veränderte intrazelluläre Verteilung und bestätigen so den für die Inhibitoren beschriebenen Befund. Sowohl die Translokation als auch die Lokalisation von rC $\alpha$ myr-Cy3 scheinen somit unabhängig von der katalytischen Aktivität zu sein.

Anders verhielt es sich bei der Coinjektion von intaktem PKI. Wie Fantozzi *et al.* [Fantozzi *et al.* 1992] bereits beschrieben haben, wird die Akkumulation der in ihrem Fall verwendeten nicht myristylierten C $\alpha$ -Untereinheit in Gegenwart von PKI vermindert. Die geringe Konzentration an C $\alpha$ -Untereinheit im Kern war somit nicht der inhibitorischen Wirkung des PKI zuzuschreiben, sondern dessen Exportsignal, das nach Bindung der C-Untereinheit exponiert wird und den aktiven Export der C-Untereinheit vermittelt [Wen, W. *et al.* 1994; Wiley *et al.* 1999].

### **Einfluß des Exports auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr**

Neben der Diffusion der C-Untereinheit aus dem Kern wurde von Fantozzi *et al.* für die C-Untereinheiten auch ein aktiver Exportweg beschrieben [Fantozzi *et al.* 1992]. Der aktive Export der C-Untereinheiten wird über PKI vermittelt. Dieser exponiert nach Bindung an die C-Untereinheiten ein NES, das daraufhin von dem Exportrezeptor Exportin-1 (CRM 1) erkannt wird, über den der aktive Export des Komplexes aus C-Untereinheit und PKI durch NPCs abläuft.

Die Konzentration von endogenem PKI in den Zellen wird in Abhängigkeit vom Zellzyklus reguliert und ist bei mitotischen Zellen am höchsten [Wen *et al.* 1995]. Da der Anteil an mitotischen Zellen bei den verwendeten Vero-Zellansätzen nur bei 5 % lag (Ergebnisse nicht gezeigt), sollte die Konzentration an PKI bei der Mehrzahl der verwendeten Zelle gering sein. Um eine Vorstellung von dem Einfluß des aktiven Exports auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 und damit auf die in dieser Arbeit ermittelten Verhältnisse  $F_{K/C}$  zu bekommen, wurde Leptomycin B (LMB) in Mikroinjektionsexperimenten eingesetzt bzw. die Kinetiken der Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 nach Kern- und Cytoplasma-Injektion verglichen. LMB ist ein spezifischer Inhibitor des aktiven Exports. Es bindet an Exportin-1, wodurch sich der Exportkomplex, bestehend aus C $\alpha$ -Untereinheit, PKI und Exportin-1, nicht mehr ausbilden kann [Kudo *et al.* 1998].

Die Konzentration des endogenen PKI in den Zellen wird in Abhängigkeit vom Zellzyklus reguliert und ist bei mitotischen Zellen am höchsten [Wen *et al.* 1995]. Da der Anteil an mitotischen Zellen bei den verwendeten Vero-Zellansätzen im Mittel nur bei 5 % lag (Ergebnisse nicht gezeigt), wurde erwartet, daß die Konzentration an PKI bei der Mehrzahl der verwendeten Zelle gering ist.

Die Untersuchungen zum Einfluß des aktiven Exports durch das endogene PKI bei den in dieser Arbeit durchgeführten Mikroinjektionsexperimenten ergaben, daß der aktive Export die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 durchaus beeinflusst. So wurden in Gegenwart von Leptomycin B (LMB), einem Inhibitor des aktiven Exports, um bis zu 40 % höhere  $F_{K/C}$ -Werte von rC $\alpha$ myr-Cy3 erreicht.

Einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung des aktiven Exports an der Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 ergab die Beobachtung, daß sich das Verteilungsgleichgewicht nach Injektion von rC $\alpha$ myr-Cy3 in den Kern von Vero-Zellen zwei- bis dreimal schneller einstellte, als nach Cytoplasma-Injektion. Insgesamt kann aber der Einfluß des Exports über PKI, der temperatursensitiv, Ran-abhängig und durch ATP-Depletion [Wen *et al.* 1994], WGA- bzw. Importin  $\beta$  (45-462)-Zugabe [Kutay *et al.* 1997] inhibierbar ist, auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 nicht groß gewesen sein, sonst hätten die beobachteten Effekte bezüglich rC $\alpha$ myr-Cy3 unter den oben genannten Bedingungen nicht so ausgeprägt sein können. Außerdem wäre dann ein vollständiger Ausschluß von rC $\alpha$ myr-Cy3 aus dem Kern zu erwarten gewesen wie nach Coinjektion von rekombinantem PKI. Bei dieser Coinjektion von rC $\alpha$ myr-Cy3 und rekombinantem PKI dominierte der Export über die Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 über Diffusion in den Kern. rC $\alpha$ myr-Cy3 war nur noch im Cytoplasma zu detektieren. Der aktive Export von rC $\alpha$ myr-Cy3 aus dem Kern scheint demnach ausschließlich von der Konzentration an intrazellulärem PKI abhängig zu sein. Die gewählten Methoden waren geeignet, um die Translokation in den Kern zu untersuchen.

## Schlußfolgerung

		Proben			
		FL-BSA-NLS	rC $\alpha$ myr-Cy3	MBP-Cy3	STI-Cy3
Untersuchte Parameter	Temperatur	+	+	+	-
	ATP-Depletion	+	+	+	-
	Ran(Q69L)-GTP	+	+	+	-
	GTP-Analoga	+	+	+	-
	WGA	+	+	+	-
	Kinetik	++++	++	+	+++
	H8 / H89	/	-	/	/
	PKI-Peptid	/	-	/	/
	Cytochalasin B	-	-	/	-

**Tabelle 2: Übersicht über die in den Mikroinjektionsexperimenten erhaltenen Ergebnisse**

Die Zeichen stehen für: +: Effekt; -: kein Effekt bzw. ++++: relativ schnelle Kinetik; ++: relativ langsame Kinetik; /: nicht bestimmt

In Tabelle 2 wurden die Ergebnisse der Mikroinjektionsexperimente zur Untersuchung der Kern-Cytoplasma-Translokation tabellarisch zusammengefaßt.

Die beobachteten Abhängigkeiten der intrazellulären Verteilung der C $\alpha$ -Untereinheit von ATP, der Temperatur und Ran-GTP sowie die Beeinträchtigung durch Blockierung der NPCs sind typisch für den aktiven Transport, wie FL-BSA-NLS zeigt. Da MBP-Cy3 als Diffusionskontrolle ebenfalls diese Abhängigkeiten zeigt, kann Diffusion als Translokationsmechanismus der C $\alpha$ -Untereinheit nicht ausgeschlossen werden. Die Tatsache, daß die Effekte bei FL-BSA-NLS oft, vor allem zu frühen Zeitpunkten, deutlich ausgeprägter waren, macht die Diffusion als Translokationsmodus der C $\alpha$ -Untereinheit wahrscheinlicher.

Auch andere Beobachtungen, wie die der langsamen Kinetik der Kern-Translokation, die der Translokation in Abwesenheit von Cytosol, die der Translokation in Gegenwart der NLS-Peptide, sowie die des Kernausschluß nach Vergrößerung des Molekulargewichts der C $\alpha$ -Untereinheit über die Kernausschlußgrenze, ein Hinweis auf das Fehlen eines funktionellen NLS, sprechen für eine Kern-Translokation über Diffusion.

Das trifft insbesondere zu, da sich rC $\alpha$ myr-Cy3 bei der Charakterisierung des Transports fast genauso verhielt wie die Diffusionskontrolle MBP und weniger wie die Kontrolle für den aktiven Import, FL-BSA-NLS.

Favorisiert man jedoch Diffusion als Transportmodus für rC $\alpha$ myr-Cy3, so stellt sich die Frage, warum sich STI-Cy3 anders verhält als rC $\alpha$ myr-Cy3 und MBP-Cy3. In der Literatur wurde nach Erklärungsansätzen dafür gesucht. So könnte nach dem Modell von Hinshaw *et al.* [Hinshaw *et al.* 1992] angenommen werden, daß STI-Cy3 durch die als Diffusionskanäle bezeichneten peripheren Kanäle der NPCs diffundiert, während MBP-Cy3 und rC $\alpha$ myr-Cy3 aufgrund ihrer Größe nur durch den mittleren Porenkanal hindurchkommen. Der getrennte Diffusionsweg könnte erklären, warum nur rC $\alpha$ myr-Cy3 und MBP-Cy3, nicht aber STI-Cy3 durch Blockaden des Transporters in ihrer Diffusion beeinträchtigt werden.

Nach Feldherr *et al.* [Feldherr und Akin 1997] geht hingegen jeglicher Transport, also auch die Diffusion kleiner Moleküle, durch den zentralen Transporter. In diesem Modell wäre vorstellbar, daß trotz gemeinsamen Transportweges nur die beiden für den Diffusionsweg bereits sehr großen Proteine sterisch am Durchgang durch die teilweise blockierten Porenkanäle gehindert werden. STI-Cy3 könnte dagegen aufgrund seines kleineren Stoke'schen Radius ungehindert durch die NPCs diffundieren.

Alle Beeinträchtigungen der Diffusion größerer Moleküle durch Faktoren, die auch den aktiven Transport (z.B. von FL-BSA-NLS) betreffen, wären dann über eine, durch die Inhibition des aktiven Transports bedingte, Blockade der NPCs zu erklären. So könnten die Daten zusätzlich einen Hinweis darauf geben, daß rC $\alpha$ myr-Cy3 und MBP-Cy3 durch den zentralen Kanal diffundieren, durch den auch der aktive Transport abläuft.

## 2 Die intrazelluläre Verteilung der C $\alpha$ -Untereinheit: Einfluß durch Retention?

Geht man von Diffusion als Kern-Translokationsmechanismus für STI-Cy3, MBP-Cy3 und rC $\alpha$ myr-Cy3 aus, so stellt sich die Frage, warum die für die drei Proteine bestimmten  $F_{K/C}$ -Werte so unterschiedlich hoch sind. Im Falle von Diffusion wird eine Gleichverteilung der Probe zwischen den Kompartimenten angenommen, da eine Akkumulation im Kern gegen einen Konzentrationsgradienten nur mit aktivem Import zu erreichen ist. Unter Diffusion ist nur dann eine Akkumulation im Kern denkbar, wenn die Probe aus dem Verteilungsgleichgewicht gezogen wird, was z.B. durch Bindungsstellen erreicht werden kann. So kann es zu einer Akkumulation im Kern kommen, obwohl die Konzentration freier Moleküle ausgeglichen ist. Hierin könnte also der Grund für die unterschiedlich hohen  $F_{K/C}$ -Werte der Diffusionskontrollen STI-Cy3 und MBP-Cy3 bzw. für rC $\alpha$ myr-Cy3 liegen. Eine Bindung an Strukturelemente oder andere Moleküle könnte aufgrund des Größenzuwachses die freie Diffusion der C $\alpha$ -Untereinheit in den Kern bzw. zurück ins Cytoplasma verhindern. Bereits bekannte mögliche Bindungspartner der C $\alpha$ -Untereinheit sind die R-Untereinheiten im Cytoplasma, PKI besonders im Kern und Substrate in beiden Kompartimenten.

Bei der in dieser Arbeit verwendeten Detektionsmethode war es nicht möglich, zwischen freier und gebundener Probe zu differenzieren. Deshalb konnte zwischen einer Akkumulation durch aktiven Transport im Kern und einer Akkumulation aufgrund von Bindungsstellen im Kern bei Proben, die über Diffusion in den Kern gelangen, nicht unterschieden werden. Harootunian *et al.* (1993) ziehen das Vorhandensein von Bindungsstellen als Grund für die Akkumulation von rC $\alpha$ myr-Cy3 im Kern nicht in Betracht. Sie begründen die über einem Wert von 2 liegenden  $F_{K/C}$  von ST-Cy3I und rC $\alpha$ myr-Cy3 nicht mit einer Akkumulation der Proben im Kern, sondern mit dem Effekt höherer Quantenausbeute der Fluoreszenz im Kern. Diese Erklärung scheint jedoch unter Berücksichtigung des Befunds von Pepperkok *et al.* [Pepperkok *et al.* 2000], daß ein höherer Wert für  $F_{K/C}$  - mit bis zu Werten über 6 - mit einer größeren Aktivität im Kern direkt korreliert, unzutreffend zu sein.

Daß die Höhe der  $F_{K/C}$ -Werte nicht mit dem Translokationsmechanismus, der molekularen Größe bzw. Effekten der Quantenausbeute zusammenhängt, haben die im Vergleich zum Wildtyp weit geringeren  $F_{K/C}$ -Werte der C $\alpha$ -Mutante rC $\alpha$ myr (H87Q/W186R)-Cy3 gezeigt, denen ein verändertes Retentionsverhalten zu Grunde gelegt wird (s.u.).

In dieser Arbeit wurde Experimente durchgeführt, um einer Retention von rC $\alpha$ myr-Cy3 in der Zelle nachzugehen.

### **Import-Assay zeigt das Vorhandensein von Bindungsstellen für aktivierte rC $\alpha$ myr**

Im Import-Assay mit Digitonin-permeabilisierten Zellen stellt sich, anders als in Mikroinjektionsexperimenten, ein Gleichgewicht zwischen dem die Zellen umgebenden Inkubationsmedium, Cytoplasma und Kern ein. Eine Bindung von diffusiblen Molekülen an zelluläre Strukturen kann zur Anreicherung in Kern bzw. Cytoplasma führen.

In den durchgeführten Import-Assays wurde beim MBP-Cy3 eine Gleichverteilung zwischen Inkubationsmedium, Cytoplasma und Kern der permeabilisierten Zellen beobachtet. STI-Cy3 und rC $\alpha$ myr-Cy3 reicherten sich dagegen in den Digitonin-permeabilisierten Zellen an. Dabei wurde deutlich, daß STI-Cy3 hauptsächlich Bindungsstellen im Kern zu haben scheint, da es dort schnell akkumuliert. Für rC $\alpha$ myr-Cy3 konnte dagegen beobachtet werden, daß das Fluoreszenzsignal von rC $\alpha$ myr-Cy3 zunächst im Cytoplasma und danach erst im Kern zunimmt, was für das Vorhandensein von Bindungsstellen in beiden Kompartimenten spricht. Da insgesamt das Kernsignal stärker war als das cytoplasmatische Signal, scheint die C $\alpha$ -Untereinheit mehr oder höheraffine Bindungsstellen im Kern zu haben als im Cytoplasma. Die Beobachtungen während der Import-Assays unterstützen die Annahme, daß in diesen Bindungsstellen, die die gebundenen Moleküle aus dem Verteilungsgleichgewicht ziehen, die Ursache liegt für die Akkumulation von STI-Cy3 und rC $\alpha$ myr-Cy3 im Kern sowie für den Unterschied zwischen ihnen und MBP-Cy3.

### **Die R-bindungsdefiziente C $\alpha$ -Doppelmutante zeigt eine andere intrazelluläre Verteilung als rC $\alpha$ myr**

Um die Bedeutung der Interaktionen zwischen den R-Untereinheiten und den C $\alpha$ -Untereinheiten für die durchgeführten Experimente zu untersuchen, wurde eine C $\alpha$ -Doppelmutante mit Mutationen an den Positionen 87 und 196 eingesetzt (rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)). Der Aminosäureaustausch Histidin 87 gegen Glutamin und Tryptophan 196 gegen Arginin beeinflusst die Interaktionen mit den R-Untereinheiten an einer Stelle, die unabhängig ist von der Substraterkennung oder der katalytischen Aktivität [Orellana *et al.* 1993; Orellana und McKnight 1992]. Die C $\alpha$ -Doppelmutation blockiert so die Inaktivierung durch die R-Untereinheiten ohne Beeinträchtigung der katalytischen Aktivität oder der Bindung von PKI. Wie die Kristallstruktur der C $\alpha$ -Doppelmutante gezeigt hat, sind die Aminosäurereste 87 und 196 Teil einer Oberflächendomäne, die zumindest zu einem Teil für die hochaffine Bindung an das R-Dimer verantwortlich ist [Orellana und McKnight 1992]. So bindet rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R) sowohl RI- als auch RII-Untereinheiten nur noch mit so geringer Affinität, daß bereits basale cAMP-Spiegel ausreichen, um die mutierte PKA in dissoziierter Form zu halten. Sie ist somit in Abwesenheit von PKI konstitutiv aktiv [Orellana

und McKnight 1992]. Histidin 87 ist in die Stabilisierung der Phosphatgruppe des autophosphorylierten Threonin 197 involviert. Für das in der räumlichen Nachbarschaft des Histidin 87 liegende Tryptophan 196 wird vermutet, daß es einen spezifischen Kontakt mit hydrophoben Resten der Substrat/Pseudosubstrat-Region der R-Untereinheiten ausbildet. Da durch den Austausch des Tryptophans gegen Arginin eine positive Ladung eingeführt wird, werden diese hydrophoben Interaktionen möglicherweise gestört. Für die Region um die Reste 196 und 87 wird angenommen, daß sie an der durch cAMP über Konformationsänderungen vermittelten Dissoziation der R-Untereinheiten und der C-Untereinheiten beteiligt ist [Orellana und McKnight 1992]. Grund für diese zusätzliche Interaktionsdomäne könnte eine erleichterte Assoziation des katalytischen Zentrums der C $\alpha$ -Untereinheit und der Substrat/Pseudosubstrat-Domäne der R-Untereinheit sein, da die R- und C-Untereinheiten über diese Domäne aneinandergeheftet sein könnten. Bei anderen Proteinkinasen, wie der Proteinkinase C oder der cGMP-abhängigen Proteinkinase, gibt es das Phänomen des Zusammenbringens von katalytischer und regulatorischer Untereinheit nicht, da beide Untereinheiten zu einer einzigen Polypeptidkette gehören. Der Vorteil, zwei voneinander getrennte C- und R-Untereinheiten zu haben, liegt in einer größeren funktionellen Diversität, da verschiedene R-Untereinheiten an unterschiedliche Isoformen der C-Untereinheiten binden und so unterschiedliche biologische Spezifität verleihen können [Orellana *et al.* 1993].

Mikroinjektionsexperimente mit rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 führten, verglichen mit denen mit Wildtyp rC $\alpha$ myr-Cy3, zu 30 - 40 % geringeren  $F_{KC}$ -Werten. Das Ergebnis entsprach nicht den Erwartungen, da rC $\alpha$ myr-Cy3 in Gegenwart von cAMP ebenfalls von den R-Untereinheiten dissoziiert vorliegen sollte. Es dürfte somit eigentlich in der intrazellulären Verteilung zwischen Kern und Cytoplasma von rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 nicht zu unterscheiden sein. So war bei rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3, anders als beim Wildtyp, der in Gegenwart von 5 mM cAMP bis zu 60 % höhere  $F_{KC}$ -Werte zeigte als bei basalen cAMP-Konzentrationen, erwartungsgemäß keine Abhängigkeit vom intrazellulären cAMP-Level zu beobachten.

Um möglichen Unterschieden in der Translokation der beiden Proteine auf die Spur zu kommen, wurden Import-Kinetiken aufgenommen. Die Import-Kinetik von rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 verlief in der ersten Minute der Translokation in den Kern identisch mit der von rC $\alpha$ myr-Cy3, was für einen gleichen Transportmechanismus durch die NPC spricht. Im weiteren Verlauf der Kinetik erreichte die C $\alpha$ -Doppelmutante verglichen mit dem Wildtyp niedrigere  $F_{KC}$ -Werte. Da die  $F_{KC}$ -Werte der C $\alpha$ -Doppelmutante sich auf einem niedrigeren Niveau einpendelten, können die Unterschiede nicht durch eine langsamere Translokation an sich erklärt werden. Der Grund für die Unterschiede in der intrazellulären Verteilung von C $\alpha$ -Doppelmutante und Wildtyp scheint demnach weniger in einem anderen

Translokationsmodus als in einer veränderten Retention zu suchen zu sein. Durch die Experimente mit rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 wird die Bedeutung der vorhandenen Bindestellen der C-Untereinheit und deren Lokalisation für die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 deutlich. Da die Kristallstruktur zeigt, daß die Aminosäurereste Histidin 87 und Tryptophan 196 nicht direkt mit PKI-Peptid in Kontakt treten, kann angenommen werden, daß die Inhibierung der C $\alpha$ -Untereinheit durch PKI und damit der aktive Export weder beeinträchtigt noch verbessert ist. So stellte sich im Mikroinjektionsexperiment in Gegenwart von Leptomycin B, das den PKI-vermittelten aktiven Export von rC $\alpha$ myr-Cy3 inhibiert, auch ein um 20 % höherer  $F_{KC}$ -Wert für rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 ein. Ein Grund für die im Vergleich zum Wildtyp geringere Steigerung der Kernfluoreszenz von rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 in Gegenwart von PKI könnte sein, daß PKI die R-bindungsdefiziente C $\alpha$ -Doppelmutante nach dem Export aus dem Kern im Cytoplasma nicht an die R-Untereinheiten 'abgeben' kann. PKI kann im Komplex mit der C $\alpha$ -Mutante nicht wieder zu einem neuen Exportzyklus in den Kern gelangen. Der Export von rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 wird beeinträchtigt.

Die Inhibierung der katalytischen Aktivität durch synthetische Inhibitoren oder durch die Mutation des Aminosäurerestes 91 führt nicht zu veränderten  $F_{KC}$ -Werten. Das könnte darauf hindeuten, daß rC $\alpha$ myr-Cy3 weder über die ATP- noch über die Substratbindestelle mit Bindungspartnern interagiert, die die Lokalisation von rC $\alpha$ myr-Cy3 bestimmen können. Eine mögliche Bindungsdomäne von rC $\alpha$ myr-Cy3 könnte die hydrophobe Region um die Aminosäurereste 87 und 196 sein. Eine Veränderung dieser Domäne, z.B. durch Einführung einer geladenen Gruppe wie die des Argininrestes, würde diese hydrophoben Bindungen beeinträchtigen.

Die von Pepperkok *et al.* [Pepperkok *et al.* 2000] beobachteten geringeren Kern-Cytoplasma-Verteilungsverhältnisse der deamidierten C-Untereinheit könnten somit eventuell auch durch die Einführung einer zusätzlichen Ladung verursacht worden sein. Die Frage, ob die Einführung von Ladungen auf der Oberfläche der C-Untereinheiten ortsgebunden oder eher generell Veränderungen in der intrazellulären Verteilung der C-Untereinheit hervorruft, kann anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente nicht beantwortet werden.

### **Inhibitorpeptid St-Ht-31 (IP) beeinflusst die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr nur marginal**

Mit der C $\alpha$ -Doppelmutante rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 war es möglich, die Interaktion zwischen den C- und R-Untereinheiten zu untersuchen, wohingegen durch Gabe des Inhibitorpeptids St-Ht-31 (IP) der Einfluß der Bindung der R-Dimere an AKAPs auf die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 untersucht werden konnte. St-Ht-31 (IP) bindet

reversibel an das regulatorische Dimer (R-Dimer) und besetzt so die Bindungsstelle für AKAPs (PKA-Ankerproteine). AKAPs binden das Holoenzym an subzelluläre Strukturen und können durch gleichzeitige Interaktion mit anderen Kinasen, Phosphatasen oder Substraten PKA-Holoenzyme mit ihren Substraten bzw. mit anderen Regulatoren zellulärer Prozesse zusammenbringen. Die Interaktion zwischen R-Dimer und AKAP wird über Helix-Helix-Kontakte von amphipatischen  $\alpha$ -Helices beider Proteine vermittelt. Das Inhibitorpeptid St-Ht-31 (IP) entspricht der Bindungsdomäne von AKAP Ht-31 für die R-Untereinheiten und kompetitiert mit AKAPs um die AKAP-Bindungsstellen der R-Untereinheiten.

In Folge der Vorinkubation der Vero-Zellen mit St-Ht-31 (IP) stellten sich nach Mikroinjektion von rC $\alpha$ myr-Cy3, verglichen mit Ansätzen des Kontrollpeptids St-Ht-31 (KP), um 15 % geringere  $F_{KC}$ -Werte ein. Wie bei Verwendung der R-bindungsdefizienten C $\alpha$ -Doppelmutante kommt es zu einer geringen Veränderung der Kern-Cytoplasma-Verteilung der C $\alpha$ -Untereinheit in Gegenwart des Inhibitorpeptids, obwohl die Aufhebung der Bindung der R-Dimere zu den AKAPs eigentlich nur die subzelluläre Lokalisation des R-Dimers, aber in Gegenwart von hohen cAMP-Konzentrationen nicht die von rC $\alpha$ myr-Cy3 beeinflussen dürfte. Für die Beeinträchtigung der Akkumulation von rC $\alpha$ myr-Cy3 im Kern durch Blockieren der Interaktion von R-Dimer und AKAP kann es mehrere Gründe geben. Da das Inhibitorpeptid St-Ht-31-IP (und mit Einschränkungen auch das Kontrollpeptid St-Ht-31) in hoher Konzentration verwendet wird, könnte es mit seiner hydrophoben Bindestelle unspezifisch mit noch nicht bekannten hydrophoben Bindepartnern der Kinase interagieren und so deren Retention beeinträchtigen. Zum anderen könnte sich möglicherweise die Bindung zwischen R- und C-Untereinheiten in Abhängigkeit davon verändern, ob das R-Dimer an AKAPs gebunden vorliegt und um welchen Typ von AKAP es sich handelt. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang auch, daß die C-Untereinheiten sich nach Aktivierung durch cAMP in Abhängigkeit von der AKAP-Bindung nicht vollständig von den R-Dimeren lösen und so im Cytoplasma gebunden verbleiben [Johnson *et al.* 1993; Yang *et al.* 1995].

### **Lokalisation von endogenen R-Untereinheiten und endogenem PKI über indirekte Immunfluoreszenz**

Um die Verteilung der bekannten Bindungspartner in den verwendeten Gewebekulturzellen zu untersuchen, wurden mit Hilfe von indirekter Immunfluoreszenz die endogenen R-Untereinheiten und endogenes PKI detektiert. Es ging dabei vor allem auch darum aufzudecken, ob R-Untereinheiten im Kern nachgewiesen werden können, und zu überprüfen, ob PKI in den exponentiell wachsenden Kulturzellen detektiert werden kann.

Es konnte beobachtet werden, daß die verschiedenen R-Isoformen im Cytoplasma, und dort überwiegend an Strukturen gebunden, vorkommen. Die Isoform RI $\alpha$ , die eigentlich ubiquitär exprimiert wird, konnte nicht nachgewiesen werden. Ob sie unterhalb der Nachweisgrenze lag oder der Antikörper seine Funktion nicht erfüllte, blieb unbestimmt. Die Untereinheit RI $\alpha$  wird als eine Art Puffer für die katalytische Aktivität beschrieben [Spaulding 1993], da die RI $\alpha$ -Konzentration an Veränderungen in der Zelle angepaßt werden kann. So ist z.B. der Level an RI $\alpha$  bei erhöhter Konzentration an RII gering [Ottens und McKnight 1989] und bei hoher Konzentration an aktivierter C-Untereinheit hoch [Uhler und McKnight 1987]. Da die RII-Untereinheiten gut detektiert werden konnten und damit anscheinend in höheren Konzentrationen vorlagen, war die Untereinheit RI $\alpha$  möglicherweise herunterreguliert.

Lediglich bei der Färbung gegen die Untereinheit RI $\beta$  konnte ein durch das Antigen blockierbares schwaches Signal im Kern beobachtet werden. Ob R-Untereinheiten im Kern zu finden sind, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Falls dort R-Untereinheiten lokalisiert sein sollten, so wäre dieses nur in geringen Konzentrationen oder auf bestimmte Signale hin der Fall. So konnten z.B. Constantinescu *et al.* [Constantinescu *et al.* 1999] RIII $\beta$  nach chronischer Ethanolinkubation im Kern nachweisen.

Nach den Ergebnissen der indirekten Immunfluoreszenzfärbungen kommen die R-Untereinheiten als Bindungsstellen im Kern für die Retention von rC $\alpha$ myr-Cy3 wahrscheinlich nicht in Frage.

Das detektierte PKI lag diffus über Cytoplasma und Kern verteilt vor, wobei das Fluoreszenzsignal im Kern etwas stärker war als das im Cytoplasma. Insgesamt war das erhaltene Signal gering, was aber den Erwartungen entsprach. PKI ist somit, wenn auch nur in geringem Maße, als Bindungspartner der C $\alpha$ -Untereinheit zu berücksichtigen und der Einfluß seiner Funktion als Exportfaktor auf den sich einstellenden  $F_{KC}$ -Wert in die Überlegungen einzubeziehen. Veränderte Affinitäten von PKI zu den C $\alpha$ -Untereinheiten könnten so einen Einfluß auf deren intrazelluläre Verteilung zur Folge haben. Die im Vergleich zum Wildtyp geringeren  $F_{KC}$ -Werte von rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 lassen sich damit allerdings kaum erklären, da die Daten der Resonant Mirror Affinographie und die Untersuchungen von Orellana *et al.* [Orellana und McKnight 1992] kaum eine Beeinträchtigung der Bindung der C $\alpha$ -Doppelmutante zu PKI zeigen.

### **Viele Bindungspartner von rC $\alpha$ myr im Bindungsassay**

Über einen Bindungsassay, in dem biotinyliertes rC $\alpha$ myr-Protein zusammen mit Retikulozytenextrakt inkubiert wurde, biotinyliertes rC $\alpha$ myr samt Bindungspartnern über Streptavidin-Sepharose-Beads isoliert wurden und die eluierten Bindungspartner im

Coomassie-gefärbten SDS-Gel sichtbar gemacht werden konnten, sollten Bindungspartner der rC $\alpha$ myr detektiert werden.

Mit diesem Assay wurden eine ganze Reihe von Proteinen gefunden, bei denen durch Vergleich mit dem pseudodepletierten Ansatz eine spezifische Bindung der C-Untereinheit angenommen werden kann. Dieser Befund unterstützt die im Import-Assay hinsichtlich der Retention von rC $\alpha$ myr gemachten Beobachtungen, daß rC $\alpha$ myr viele Bindungspartner in der Zelle hat. Eine Identifikation der eluierten Proteine wurde nicht vorgenommen. Daß es sich bei dem verwendeten Retikulozytenextrakt um die lösliche Fraktion der Retikulozyten handelt, könnte einen Hinweis auf die Natur der Bindungspartner geben. Hiernach wäre auszuschließen, daß zu den Bindungspartnern von rC $\alpha$ myr ausschließlich Strukturproteine oder Membranen gehören.

Obwohl unter hohen cAMP-Konzentrationen gearbeitet wurde, scheinen R-Untereinheiten an rC $\alpha$ myr-Cy3 gebunden zu haben. Das gibt einen Hinweis darauf, daß auch die Gegenwart von hohen Konzentrationen an cAMP Interaktionen von C- und R-Untereinheiten nicht ausschließt [Johnson *et al.* 1993; Yang *et al.* 1995].

### **Sättigung der Bindungsstellen durch rC $\alpha$ myr**

Falls spezifische Bindungsstellen die Verteilung der C $\alpha$ -Untereinheit beeinflussen sollten, wäre anzunehmen, daß deren Konzentration begrenzt und damit zu sättigen sei. Aus diesem Grund wurden die sich einstellenden intrazellulären Verhältnisse in Abhängigkeit von der Konzentration an rC $\alpha$ myr-Cy3 im Import-Assay bestimmt.

Es ergab sich eine Sättigungskinetik. Die in einem Konzentrationsbereich von 0,05 - 5  $\mu$ M ermittelten  $F_{KC}$ -Werte, steigen ab einer Konzentration von 1  $\mu$ M nicht mehr linear an. Die Kurve geht in ein Plateau mit  $F_{KC}$ -Werten um 5 über. Wie bei der Aufnahme von Import-Kinetiken mit permeabilisierten Zellen deutlich wurde, werden zuerst Bindungsstellen im Cytoplasma von der in die Zellen diffundierten rC $\alpha$ myr-Cy3 bedient. rC $\alpha$ myr-Cy3 erreicht erst danach den Kern und kann erst dann die Bindungsstellen im Kern besetzen. Ein Equilibrium von frei diffundierender rC $\alpha$ myr-Cy3 stellt sich vermutlich erst nach Absättigung der freien Bindungsstellen ein. Sowohl Pepperkok *et al.* [Pepperkok *et al.* 2000] als auch Harootunian *et al.* [Harootunian *et al.* 1993] geben an, daß die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 konzentrationsunabhängig ist und keiner Sättigung unterliegt. Dazu muß bemerkt werden, daß in beiden Fällen ein Konzentrationsbereich der C-Untereinheit als Bestätigung herangezogen wurde, der bereits im Plateau der hier gefundenen Kinetik lag. Die Beobachtungen widersprechen sich somit nicht. Unter der Annahme, daß der Grad der CREB-Phosphorylierung direkt mit der Konzentration an aktivierter C-Untereinheit im Kern korreliert [Meinkoth *et al.* 1993], stimmt die aufgenommene Kinetik mit einem von Pepperkok

*et al.* [Pepperkok *et al.* 2000] gemachten Experiment überein, in dem die CREB-Phosphorylierung in Abhängigkeit von der mikroinjizierten Konzentration an C-Untereinheit quantifiziert wurde. Es ergab sich eine lineare Konzentrationsabhängigkeit der Phosphorylierung von CREB bis zu einer eingesetzten Konzentration von 1 mg/ml Enzym. Bei höheren Konzentrationen ergab sich auch hier ein Plateau. Mit dem Wissen, daß die injizierte Probe durch die Mikroinjektion durchschnittlich um einen Faktor von 20 verdünnt wird, was einer effektiven Konzentration von 1,25  $\mu\text{M}$  gleichkommt, entsprechen sich beide Beobachtungen. Die in dieser Arbeit durchgeführte Sättigungskinetik ist damit durch die von Pepperkok *et al.* [Pepperkok *et al.* 2000] vorgenommenen Aktivitätsmessungen gestützt. Inwieweit bei der Sättigung der CREB-Phosphorylierung die CREB-Konzentration limitierender Faktor sein könnte, ist unbekannt. Der Turnover dieser Phosphorylierung ist jedoch hoch.

Die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 ist somit offenbar konzentrationsabhängig. Die Sättigungskinetik ist ein Hinweis darauf, daß die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 durch die Anzahl der Bindungsstellen und weniger durch die Affinität der Bindungsstellen beeinflusst wird. Da für die endogene C-Untereinheit Konzentrationen von 0,3 - 1  $\mu\text{M}$  angegeben werden [Hagiwara *et al.* 1993; Hofmann *et al.* 1977; Lohmann und Walter 1984], scheint die indirekt bestimmte Konzentration an Bindungsstellen in der Zelle von etwas mehr als 1  $\mu\text{M}$  realistisch zu sein. In grober Schätzung wären bei einem in Gegenwart von cAMP maximal gemessenen  $F_{KC}$  von 5 dann folglich 15 % der Bindungsstellen im Cytoplasma und 85 % der Bindungsstellen im Kern lokalisiert. Harootunian *et al.* [Harootunian *et al.* 1993] haben für das Cytoplasma eine Bindungskapazität in einer Größenordnung von 1  $\mu\text{M}$  bei basalem cAMP-Level angegeben. Dabei handelt es sich allerdings vornehmlich um R-Untereinheiten.

### Schlußfolgerung

Eine Retention der C $\alpha$ -Untereinheit über Bindungsstellen im Kern, aber auch im Cytoplasma ist wahrscheinlich.

Als mögliche Bindungspartner im Cytoplasma kommen die R-Untereinheiten in diesem Experiment in Frage, obwohl die Interaktion durch cAMP eigentlich aufgehoben sein sollte. Es kann jedoch vermutet werden, daß die C-Untereinheiten z.T. trotz Aktivierung an die R-Untereinheiten assoziiert bleiben. Ob AKAPs, die über hydrophobe Kontakte R-Dimere binden, in der Lage sind, die aktivierte C-Untereinheit auch direkt zu binden, ist noch nicht bekannt.

Das Vorkommen von R-Untereinheiten im Kern ist umstritten. Ein möglicher Bindungspartner im Kern ist PKI, welches die C-Untereinheit allerdings vermutlich nicht im Kern festhält,

sondern diese schnell aus dem Kern exportiert. Daß Substrate im Kern wie z.B. die CRE / ATF-Familie, Histon oder Lamine der Grund für die Retention im Kern sind, ist nicht anzunehmen, da die Zugabe von Inhibitoren der PKA keine Veränderung ihrer intrazellulären Verteilung zur Folge hatte. Eine Möglichkeit könnte die Retention über Adapter-Proteine sein, die die Kinase abseits der ATP- bzw. der Substraterkennungsstelle binden. Für den pro-apoptischen Faktor, BAD, der von PKA phosphoryliert wird [Harada *et al.* 1999], wurde ein solches multifunktionales Adaptermolekül, das Protein 14-3-3, beschrieben, das Serinphosphat binden kann. Da die R-bindungsdefiziente C $\alpha$ -Doppelmutante eine geringere Akkumulation im Kern aufwies als das Wildtyp-Enzym, kann eine Bindung über möglicherweise hydrophobe Wechselwirkungen mit der Region um Histidin 87 und Tryptophan 196 vermutet werden. Eine hydrophobe Interaktion wurde in der Literatur für die Bindung der C-Untereinheit an Chromatin beschrieben [Glukhov *et al.* 1986; Taylor 1982].

Ein Zurückhalten der C $\alpha$ -Untereinheit ausschließlich über Membranbindungen kann nicht angenommen werden, da die Sättigungskinetik für eine begrenzte Anzahl an Bindungsstellen spricht. Eine Membranassoziiierung über die Myristylsäure der C $\alpha$ -Untereinheit ist bisher nur für das Holoenzym *in vitro* nachgewiesen worden. Die Bindung der C $\alpha$ -Untereinheiten an RII-Dimere, nicht aber an RI-Dimere, soll zur Exposition der Myristylsäure führen, was eine Membranbindung ermöglicht. Die Funktion der Myristylsäure, die mit der hydrophoben Oberfläche der katalytischen Kernregion assoziiert vorliegt [Bossemeyer *et al.* 1993], für die aktivierte C $\alpha$ -Untereinheit wird bisher mit erhöhter struktureller Stabilität beschrieben [Yonemoto *et al.* 1993]. Sie ist keine Voraussetzung für die Kernmigration [Meinkoth *et al.* 1990].

Auch Constantinescu *et al.* [Constantinescu *et al.* 1999], die nach chronischer Exposition von Zellen mit Ethanol eine Akkumulation der C $\alpha$ -Untereinheit im Kern beobachten konnten, postulieren als Grund dafür die Existenz eines Bindepartners im Kern, in diesem Fall ein zusätzlicher Inhibitor, der weder R-Untereinheit noch PKI sein soll.

Die Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3 und STI-Cy3 unterscheidet sich dadurch von der von MBP-Cy3, daß die intrazelluläre Verteilung der erstgenannten maßgeblich durch Bindungspartner in der Zelle mitbestimmt wird. Das wurde im Falle der C $\alpha$ -Untereinheit auch durch rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 deutlich. Die sehr frühe Translokationskinetik dieser Mutante entspricht der des Wildtyp-Enzyms. Im weiteren Verlauf erreicht diese aber wahrscheinlich bedingt durch veränderte Bindungseigenschaften für  $F_{K/C}$  nur geringere Werte.

### 3 Das Modell der Kern-Cytoplasma-Translokation der C $\alpha$ -Untereinheit

Im folgenden soll nun in Anbetracht der Ergebnisse dieser Arbeit die Frage beantwortet werden, ob und wenn ja, welches der oben in der Einleitung vorgestellten Modelle der Kern-Cytoplasma-Translokation am ehesten den Mechanismus der Kern-Cytoplasma-Translokation der C $\alpha$ -Untereinheit und ihrer Verteilung zwischen Kern und Cytoplasma beschreibt.

#### Modell des aktiven Imports

Zunächst schienen die beobachteten Abhängigkeiten der intrazellulären Verteilung der C $\alpha$ -Untereinheit von Energie, Temperatur, Ran-System, Cytosol, WGA und Importin  $\beta$  (45-462), die in der Regel als Hinweis für aktiven Transport gelten, für einen aktiven Import der C $\alpha$ -Untereinheit zu sprechen. Aber der Vergleich mit der ungefähr größengleichen Diffusionskontrolle MBP-Cy3, die sehr ähnliche Abhängigkeiten zeigte, läßt vermuten, daß es sich bei den beobachteten Effekten um Sekundäreffekte handelt und die C $\alpha$ -Untereinheit wie MBP in den Kern diffundiert. Gegen das Modell des aktiven Imports spricht auch die für aktiven Transport zu langsam scheinende Kinetik der Kern-Cytoplasma-Translokation von rC $\alpha$ myr-Cy3. FL-BSA-NLS wird über aktiven Transport viel schneller in den Kern importiert als rC $\alpha$ myr-Cy3. Auch STI-Cy3, die kleinere Diffusionskontrolle, gelangt mit größerer Geschwindigkeit in den Kern, was mit der reziproken Abhängigkeit zwischen Stoke'schen Radius und sterischer Hinderung zu erklären ist. Zudem steht der Kernausschluß nach Größenzunahme, was dem Fehlen eines Kernlokalisationssignals gleichkommt, der Annahme des aktiven Transports entgegen. Auch ein zusätzlich zur Diffusion auftretender aktiver Transport ist wenig wahrscheinlich, da dieser vor allem in der frühen Kinetik beim Import-Assay hätte beobachtet werden müssen.

Der aktive Import in den Kern scheint als Möglichkeit der Translokation der C $\alpha$ -Untereinheit nicht zuzutreffen.

#### Modell der Diffusion ohne Retention

Ein in dieser Arbeit gefundenes Beispiel dafür ist MBP-Cy3, das sich, wie im Import-Assay mit Digitonin-permeabilisierten HeLa-Zellen deutlich wurde, gleichmäßig zwischen den zellulären Kompartimenten und dem Reaktionsmix verteilt. rC $\alpha$ myr-Cy3 verhielt sich dagegen im Import-Assay ganz anders. Es akkumulierte in den Zellen und dort vor allem im Kern. Es erreichte viel höhere Werte für  $F_{K/C}$  als MBP-Cy3, was am wahrscheinlichsten auf Bindungsstellen in den Zellen hinweist.

Die von Harootunian *et al.* [Harootunian *et al.* 1993] postulierte freie Diffusion ohne Retention der Probe durch Bindungspartner ist ebenfalls als nicht wahrscheinlich abzulehnen.

### Modell der Diffusion mit Retention

Das dritte Modell ist das der freien Diffusion mit Bindungsstellen, wobei die Bindungsstellen entweder a) nur im Kern, b) nur im Cytoplasma oder aber c) in beiden Kompartimenten lokalisiert sein können. In diesem Modell ist eine Anreicherung in einem Kompartiment über Diffusion möglich, ohne daß gegen die Gesetze der Thermodynamik verstoßen wird. Im Falle einer größeren Anzahl von Bindungsstellen oder eventuell höheraffinen Bindungsstellen in einem der Kompartimente, z.B. dem Kern, würde der energieunabhängige Ausgleich, bezogen auf die Gesamtkonzentration des Substrats, in einer Akkumulation im Kern bei identischer Konzentration an freiem Substrat in beiden Kompartimenten resultieren.

a) Einer Lokalisation aller Bindungsstellen im Kern widerspricht die Beobachtung einer Anreicherung des Enzyms im Cytoplasma während der ersten Minute im Import-Assay. Außerdem müßten höhere  $F_{K/C}$ -Werte gemessen werden, wie z.B. bei STI-Cy3, das - dem Import-Assay nach zu urteilen - viele Bindungsstellen im Kern besitzt. Außerdem dürften die C $\alpha$ -Untereinheiten nach Kerninjektion nicht so schnell aus dem Kern ins Cytoplasma übertreten, wenn es nur im Kern Bindungsstellen gäbe. Da die PKA auch Substrate im Cytoplasma hat, wäre eine solche Annahme zudem physiologisch wenig sinnvoll. Die C-Untereinheit könnte zudem möglicherweise nicht schnell genug auf einen Rückgang der intrazellulären cAMP-Konzentration reagieren.

b) Aufgrund der hohen gemessenen Fluoreszenzintensitäten im Kern ist auszuschließen, daß die aktivierte C-Untereinheit unter den experimentellen Bedingungen nur Bindungsstellen im Cytoplasma hat. Für basale cAMP-Spiegel und physiologische Konzentrationen an C- und R-Untereinheiten ist diese Annahme allerdings richtig. Bei niedrigen cAMP-Konzentrationen liegen die C-Untereinheiten hauptsächlich an R-Dimere im Cytoplasma gebunden vor. Die durch PKI aus dem Kern exportierten C-Untereinheiten können aufgrund der Größenzunahme durch PKI nicht zurück in den Kern diffundieren, und man nimmt an, daß sie von PKI direkt an die R-Untereinheiten, die eine etwas größere Affinität für die C-Untereinheiten haben als PKI, übergeben werden [Wen *et al.* 1995]. Somit wird durch PKI und die hohe Konzentration an hochaffinen R-Untereinheiten im Cytoplasma bei basalem cAMP-Level erreicht, daß die Kinase im Cytoplasma lokalisiert und darüber hinaus inaktiviert ist.

c) Die letzte Variante des dritten Modells, Bindungspartner in Kern und Cytoplasma, scheint für die aktivierte C-Untereinheit zuzutreffen. Wie bereits zuvor beschrieben, zeigen die durchgeführten Import-Assays der C-Untereinheit deutlich deren Bindung in Cytoplasma und Kern. Dieses Modell wird am meisten favorisiert.

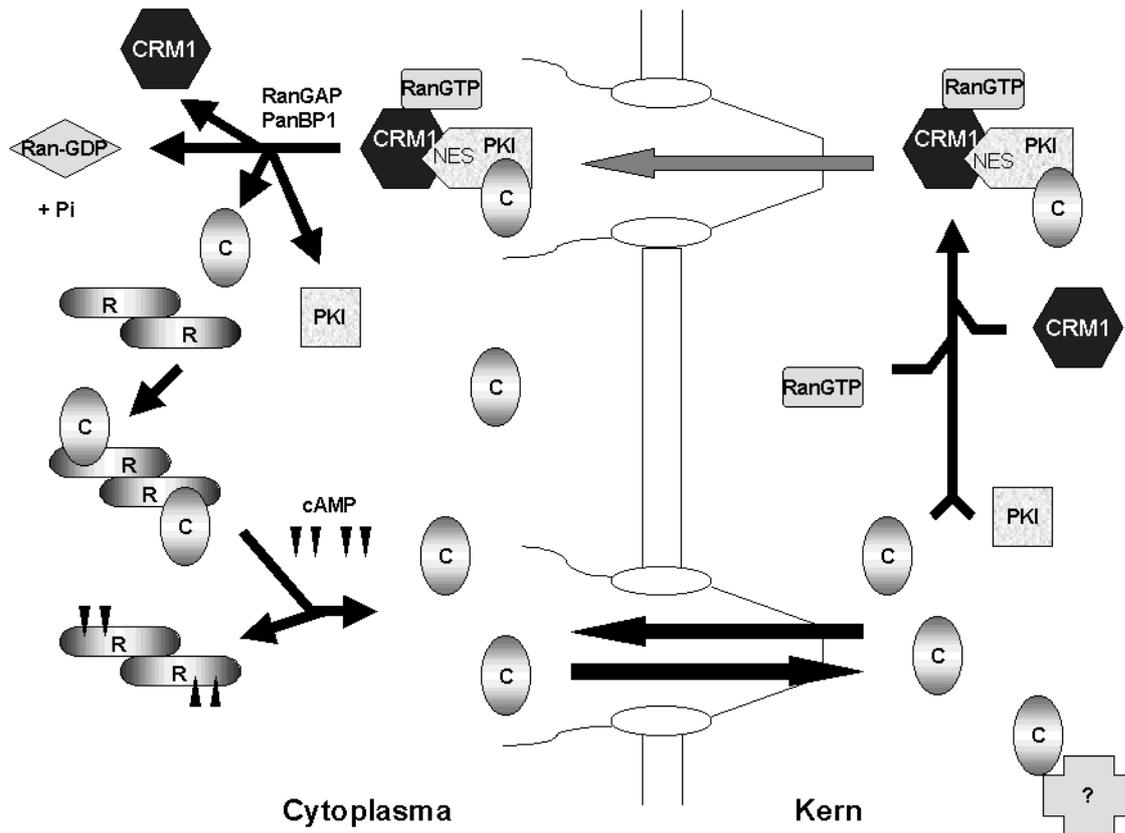
### Die Kern-Cytoplasma-Translokation der C $\alpha$ -Untereinheit

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen legen somit eine Kern-Cytoplasma-Translokation der C $\alpha$ -Untereinheit über Diffusion nahe (Abb. 58). Die Diffusion verläuft über den für Moleküle dieser Größe typischen Diffusionsweg. Da die C $\alpha$ -Untereinheit sowohl im Cytoplasma als auch im Kern Substrate hat, ist es nicht verwunderlich, daß sie nicht mit einem starken NLS ausgestattet ist. Der Export der C $\alpha$ -Untereinheit aus dem Kern erfolgt zusätzlich aktiv (Abb. 58), ist aber von der Gegenwart von PKI als NES-haltigem Adapter abhängig. Dieser wird in Zellzyklus-abhängiger Weise reguliert und ermöglicht eine schnelle Inhibition der PKA-Aktivität im Kern, ohne gleichzeitig die Aktivität im Cytoplasma zu inhibieren. Da PKI die C $\alpha$ -Untereinheiten wieder an die R-Untereinheiten übergeben soll, wird das System PKA mit seiner Hilfe auch wieder in den unaktivierten Ausgangszustand gebracht [Wen *et al.* 1995].

Außer durch PKI wird die intrazelluläre Verteilung der aktivierten C $\alpha$ -Untereinheit hauptsächlich über Bindungsstellen in Kern und Cytoplasma bestimmt, die die C $\alpha$ -Untereinheit aus dem Verteilungsgleichgewicht ziehen. Da die Spezifität der aktivierten C $\alpha$ -Untereinheit sich überwiegend durch deren Lokalisation bestimmt, kommt den Bindeproteinen ein bedeutender Einfluß auf die PKA-Aktivität zu.

Für die Spezifität der Hormonantwort im Cytoplasma sind die AKAPs verantwortlich, die das Holoenzym in die Nähe der cytoplasmatischen Substrate bringen. Welche Strukturen im Kern Ähnliches bewirken, wird die zukünftige Forschung zeigen.

Eine Beeinträchtigung der Kern-Cytoplasma-Translokation der C $\alpha$ -Untereinheit z.B. bei geringem Energiespiegel in der Zelle könnte physiologisch sinnvoll sein, da die Konzentration der Substrate, die aktiv in den Kern gelangen, im Kern begrenzt ist, wenn der Transport limitiert ist. Ein Überschuß an Kinase unter diesen Bedingungen unerwünscht.



**Abbildung 58: Aktivierung und Kern-Cytoplasma-Translokation der C $\alpha$ -Untereinheit**

Nach Anstieg des interzellulären cAMP-Spiegel dissoziiert das Holoenzym durch Bindung von cAMP an die R-Untereinheiten (R). Die aktivierten C-Untereinheiten (C) können im Cytoplasma und im Kern Zielproteine phosphorylieren. Die Translokation in den Kern erfolgt über Diffusion. Dort wird die C-Untereinheit von noch unbekanntem Partnern gebunden. Der Export der C-Untereinheit ins Cytoplasma kann sowohl über Diffusion als auch aktiv über PKI vermittelt erfolgen. Der Exportkomplex, bestehend aus C-Untereinheit, PKI mit exponiertem Kernexportsignal (NES), Exportrezeptor Exportin-1 (CRM1) und Ran-GTP, dissoziiert im Cytoplasma unter Einfluß der Faktoren RanBP1 (Ran-bindendes Protein) und RanGAP (Ran-GTPase-aktivierendes Protein) durch Hydrolyse von GTP. Die C-Untereinheiten werden von PKI an die R-Untereinheiten übergeben, wodurch sich bei basalem cAMP-Level wieder inaktive Holoenzyme ausbilden [Amieux *et al.* 1997; Fantozzi *et al.* 1994; Fornerod *et al.* 1997; Krebs und Beavo 1979; Wen *et al.* 1995].

## 4 Ausblick

Die Aktivität der PKA wird u.a. durch ihre subzelluläre Lokalisation in der Zelle bestimmt [Colledge und Scott 1999]. Wie die Publikationen der jüngsten Vergangenheit zeigen, liegt ein Schwerpunkt der aktuellen Forschung auf der Identifizierung und Charakterisierung der AKAPs, die das inaktive Holoenzym über die R-Untereinheiten assoziieren.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, daß auch die intrazelluläre Verteilung der von den R-Untereinheiten dissoziierten aktiven C-Untereinheiten von Bindungspartnern bestimmt wird. Diese Bindungspartner scheinen anders als die das Holoenzym assoziierenden AKAPs überwiegend im Kern lokalisiert zu sein.

Der Schwerpunkt weiterer Untersuchungen sollte vor allem auf der Identifikation der Bindungspartner der aktivierten C $\alpha$ -Untereinheit liegen. Dabei wäre zunächst zu klären, ob die möglichen Bindungspartner der löslichen Fraktion oder den Strukturkomponenten des Kerns zuzuordnen sind. Dieses wäre z.B. über die sogenannte FRAP (Fluorescence recovery after photobleaching)-Methode möglich, mit der die Mobilität von rC $\alpha$ myr-Cy3 *in vivo* qualitativ untersucht werden kann [Reyes 1997]. Zur Identifikation der nukleären Bindungspartner in der löslichen Fraktion, könnten Bindungsassays mit Nukleoplasma durchgeführt werden. Eine Bindung von aktivierten C $\alpha$ -Untereinheiten an Strukturkomponenten des Kerns könnte an durch Hochsalz extrahierter nukleärer Matrix bzw. Chromatin untersucht werden. Weiterhin könnten Bindungspartner über Co-Lokalisation von C $\alpha$ -Untereinheiten und möglichen Bindungspartnern mit indirekter Immunfluoreszenz detektiert werden.

Darüber hinaus könnte man auch die für die Interaktionen mit den Bindungspartnern verantwortlichen Oberflächendömanen der C $\alpha$ -Untereinheit näher untersuchen. Experimente mit Inhibitoren der Kinase-Aktivität lassen annehmen, daß weder die ATP- noch die Substratbindestelle an der Retention der aktivierten C-Untereinheiten beteiligt ist, da sich die intrazelluläre Verteilung von rC $\alpha$ myr-Cy3 unabhängig von der katalytischen Aktivität zeigt. 85 Diese Annahme konnte anhand der C $\alpha$ -Mutante His-rC $\alpha$  (E91Q) für die ATP-Bindungsstelle bestätigt werden. Durch Mutation der Glutamatreste 127, 170 und 230 in der Substraterkennungsstelle könnte die Rolle der Bindung an Substrate für die intrazelluläre Verteilung von C $\alpha$ -Untereinheit abschließend geklärt werden. Bei diesen Mutanten wurden wesentlich geringere  $K_m$ -Werte für das Substrat Kempetid bestimmt, während die ATP-Bindung weitestgehend unbeeinträchtigt blieb (persönliche Mitteilung Dr. D. Bossemeyer, DKFZ, Heidelberg).

Einen ersten Hinweis auf eine mögliche Bindungsdomäne gibt bereits die hier eingesetzte C $\alpha$ -Doppelmutante rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R). Mit rC $\alpha$ myr (H87Q/W196R)-Cy3 sind geringere  $F_{KC}$ -Werte erreicht worden als mit dem Wildtyp-Enzym, was für eine Beeinträchtigung der

Bindungseigenschaften im Kern sprechen könnte. Die von der Abteilung für Pathochemie in Kooperation mit Pepperkok *et al.* gemachten Beobachtungen, daß die intrazelluläre Verteilung sich abhängig von der Deamidierung des zweiten Aminosäurerestes zeigt, können ebenfalls Hinweis auf eine mögliche Interaktionsstelle sein. Weitere Mutanten der C $\alpha$ -Untereinheit mit Mutationen von Oberflächenresten sollten im Mikroinjektionsexperiment eingesetzt werden. Zudem könnten Kompetitionsstudien mit Mutanten und Wildtypenzym Aufschluß über die Bindung der C $\alpha$ -Untereinheit an Bindungspartner geben.

Neben der Suche nach möglichen Bindungspartnern der Kinase ist die weitere Aufklärung der Diffusion durch NPCs von Interesse. Es sollten Untersuchungen im Hinblick auf Regulation und Wege der Diffusion durch NPCs gemacht werden. Dabei könnte das in dieser Arbeit verwendete MBP als Werkzeug dienen, da es aufgrund seiner molekularen Größe gerade noch unterhalb der Ausschlußgrenze für Diffusion durch NPCs liegt und seine interzelluläre Verteilung nicht durch andere Faktoren wie Retention beeinflusst wird.

## Literaturverzeichnis

- Adam, S.A., Marr, R.S. und Gerace, L. (1990)** Nuclear protein import in permeabilized mammalian cells requires soluble cytoplasmic factors. *J Cell Biol* **111** 807-16
- Adams, J.A., McGlone, M.L., Gibson, R. und Taylor, S.S. (1995)** Phosphorylation modulates catalytic function and regulation in the cAMP- dependent protein kinase. *Biochemistry* **34** 2447-54
- Akey, C.W. (1990)** Visualization of transport-related configurations of the nuclear pore transporter. *Biophys J* **58** 341-55
- Akey, C.W. und Radermacher, M. (1993)** Architecture of the *Xenopus* nuclear pore complex revealed by three- dimensional cryo-electron microscopy. *J Cell Biol* **122** 1-19
- Allen, T.D., Cronshaw, J.M., Bagley, S., Kiseleva, E. und Goldberg, M.W. (2000)** The nuclear pore complex: mediator of translocation between nucleus und cytoplasm. *Journal of Cell Science* **113** 1651-1659
- Amieux, P.S., Cummings, D.E., Motamed, K., Brandon, E.P., Wailes, L.A., Le, K., Idzerda, R.L. und McKnight, G.S. (1997)** Compensatory regulation of *R*alpha protein levels in protein kinase A mutant mice. *J Biol Chem* **272** 3993-8
- Beavo, J.A., Conti, M. und Heaslip, R.J. (1994)** Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterases. *Mol Pharmacol* **46** 399-405
- Beebe, S.J., Oyen, O., Sandberg, M., Froyso, A., Hansson, V. und Jahnsen, T. (1990)** Molecular cloning of a tissue-specific protein kinase (C gamma) from human testis--representing a third isoform for the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Mol Endocrinol* **4** 465-75
- Bonner (1978)** *Chemical and Biochemical Properties of the Nuclear Envelope*. In *The Cell Nucleus*, B. H, ed. (New York: Academic Press), pp. 97-148
- Boshart, M., Weih, F., Nichols, M. und Schutz, G. (1991)** The tissue-specific extinguisher locus *TSE1* encodes a regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase. *Cell* **66** 849-59
- Bossemeyer, D., Engh, R.A., Kinzel, V., Ponstingl, H. und Huber, R. (1993)** Phosphotransferase and substrate binding mechanism of the cAMP- dependent protein kinase catalytic subunit from porcine heart as deduced from the 2.0 Å structure of the complex with Mn<sup>2+</sup> adenylyl imidodiphosphate and inhibitor peptide PKI(5-24). *Embo J* **12** 849-59
- Bossemeyer, D., Kinzel, V. und Reed, J. (1996)** cAMP-dependent protein kinase: structure, function and control. In *Protein Phosphorylation*, F. Marks, ed. (Weinheim - New York - Basel - Cambridge - Tokyo, pp. 37 - 74
- Bradford, M.M. (1976)** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72** 248-54

- Breeuwer, M. und Goldfarb, D.S. (1990)** *Facilitated nuclear transport of histone H1 and other small nucleophilic proteins.* Cell **60** 999-1008
- Cadd, G.G., Uhler, M.D. und McKnight, G.S. (1990)** *Holoenzymes of cAMP-dependent protein kinase containing the neural form of type I regulatory subunit have an increased sensitivity to cyclic nucleotides.* J Biol Chem **265** 19502-6
- Carr, D.W., Stofko-Hahn, R.E., Fraser, I.D., Bishop, S.M., Acott, T.S., Brennan, R.G. und Scott, J.D. (1991)** *Interaction of the regulatory subunit (RII) of cAMP-dependent protein kinase with RII-anchoring proteins occurs through an amphipathic helix binding motif.* J Biol Chem **266** 14188-92
- Chestukhin, A., Litovchick, L., Schourov, D., Cox, S., Taylor, S.S. und Shaltiel, S. (1996)** *Functional malleability of the carboxyl-terminal tail in protein kinase A.* J Biol Chem **271** 10175-82
- Chijiwa, T., Mishima, A., Hagiwara, M., Sano, M., Hayashi, K., Inoue, T., Naito, K., Toshioka, T. und Hidaka, H. (1990)** *Inhibition of forskolin-induced neurite outgrowth and protein phosphorylation by a newly synthesized selective inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, N-[2-(p-bromocinnamylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-89), of PC12D pheochromocytoma cells.* J Biol Chem **265** 5267-72
- Cho-Chung, Y.S., Pepe, S., Clair, T., Budillon, A. und Nesterova, M. (1995)** *cAMP-dependent protein kinase: role in normal and malignant growth.* Crit Rev Oncol Hematol **21** 33-61
- Chrivia, J.C., Uhler, M.D. und McKnight, G.S. (1988)** *Characterization of genomic clones coding for the C alpha and C beta subunits of mouse cAMP-dependent protein kinase.* J Biol Chem **263** 5739-44
- Clegg, C.H., Cadd, G.G. und McKnight, G.S. (1988)** *Genetic characterization of a brain-specific form of the type I regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase.* Proc Natl Acad Sci U S A **85** 3703-7
- Clegg, C.H., Ran, W., Uhler, M.D. und McKnight, G.S. (1989)** *A mutation in the catalytic subunit of protein kinase A prevents myristylation but does not inhibit biological activity.* J Biol Chem **264** 20140-6
- Cordes, V.C., Rackwitz, H.R. und Reidenbach, S. (1997)** *Mediators of nuclear protein import target karyophilic proteins to pore complexes of cytoplasmic annulate lamellae.* Exp Cell Res **237** 419-33
- Cox, S. und Taylor, S.S. (1994)** *Holoenzyme interaction sites in the cAMP-dependent protein kinase. Histidine 87 in the catalytic subunit complements serine 99 in the type I regulatory subunit.* J Biol Chem **269** 22614-22
- Dabauvalle, M.C., Schulz, B., Scheer, U. und Peters, R. (1988)** *Inhibition of nuclear accumulation of karyophilic proteins in living cells by microinjection of the lectin wheat germ agglutinin.* Exp Cell Res **174** 291-6
- Delphin, C., Guan, T., Melchior, F. und Gerace, L. (1997)** *RanGTP targets p97 to RanBP2, a filamentous protein localized at the cytoplasmic periphery of the nuclear pore complex.* Mol Biol Cell **8** 2379-90
- Dickmanns, A., Bischoff, F.R., Marshallsay, C., Luhrmann, R., Ponstingl, H. und Fanning, E. (1996)** *The thermolability of nuclear protein import in tsBN2 cells is suppressed by microinjected Ran-GTP or Ran-GDP, but not by RanQ69L or RanT24N.* J Cell Sci **109** 1449-57
- Dingwall, C., Sharnick, S.V. und Laskey, R.A. (1982)** *A polypeptide domain that specifies migration of nucleoplasmin into the nucleus.* Cell **30** 449-58
- Duronio, R.J., Jackson-Machelski, E., Heuckeroth, R.O., Olins, P.O., Devine, C.S., Yonemoto, W., Slice, L.W., Taylor, S.S. und Gordon, J.I. (1990)** *Protein N-myristoylation in Escherichia coli: reconstitution of a eukaryotic protein modification in bacteria.* Proc Natl Acad Sci U S A **87** 1506-10
- Edwards, A.S. und Scott, J.D. (2000)** *A-kinase anchoring proteins: protein kinase A and beyond.* Curr Opin Cell Biol **12** 217-21

- Eide, T., Coghlan, V., Orstavik, S., Holsve, C., Solberg, R., Skalhegg, B.S., Lamb, N.J., Langeberg, L., Fernandez, A., Scott, J.D., Jahnsen, T. und Tasken, K. (1998) *Molecular cloning, chromosomal localization, and cell cycle-dependent subcellular distribution of the A-kinase anchoring protein, AKAP95*. *Exp Cell Res* **238** 305-16
- Englmeier, L., Olivo, J.C. und Mattaj, I.W. (1999) *Receptor-mediated substrate translocation through the nuclear pore complex without nucleotide triphosphate hydrolysis*. *Curr Biol* **9** 30-41
- Fantozzi, D.A., Harootunian, A.T., Wen, W., Taylor, S.S., Feramisco, J.R., Tsien, R.Y. und Meinkoth, J.L. (1994) *Thermostable inhibitor of cAMP-dependent protein kinase enhances the rate of export of the kinase catalytic subunit from the nucleus*. *J Biol Chem* **269** 2676-86
- Fantozzi, D.A., Taylor, S.S., Howard, P.W., Maurer, R.A., Feramisco, J.R. und Meinkoth, J.L. (1992) *Effect of the thermostable protein kinase inhibitor on intracellular localization of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase*. *J Biol Chem* **267** 16824-8
- Feldherr, C.M. und Akin, D. (1997) *The location of the transport gate in the nuclear pore complex*. *J Cell Sci* **110** 3065-70
- Feldherr, C.M. und Akin, D. (1993) *Regulation of nuclear transport in proliferating and quiescent cells*. *Exp Cell Res* **205** 179-86
- Fernandez, A., Mery, J., Vandromme, M., Basset, M., Cavadore, J.C. und Lamb, N.J. (1991) *Effective intracellular inhibition of the cAMP-dependent protein kinase by microinjection of a modified form of the specific inhibitor peptide PKi in living fibroblasts*. *Exp Cell Res* **195** 468-77
- Finlay, D.R., Newmeyer, D.D., Price, T.M. und Forbes, D.J. (1987) *Inhibition of in vitro nuclear transport by a lectin that binds to nuclear pores*. *J Cell Biol* **104** 189-200
- Fontoura, B.M., Blobel, G. und Matunis, M.J. (1999) *A conserved biogenesis pathway for nucleoporins: proteolytic processing of a 186-kilodalton precursor generates Nup98 and the novel nucleoporin, Nup96*. *J Cell Biol* **144** 1097-112
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. und Mattaj, I.W. (1997) *CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals [see comments]*. *Cell* **90** 1051-60
- Fouchier, R.A., Meyer, B.E., Simon, J.H., Fischer, U., Albright, A.V., Gonzalez-Scarano, F. und Malim, M.H. (1998) *Interaction of the human immunodeficiency virus type 1 Vpr protein with the nuclear pore complex*. *J Virol* **72** 6004-13
- Foulkes, N.S., Laoide, B.M., Schlotter, F. und Sassone-Corsi, P. (1991) *Transcriptional antagonist cAMP-responsive element modulator (CREM) down-regulates c-fos cAMP-induced expression*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** 5448-52
- Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M. und Nishida, E. (1997) *CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal*. *Nature* **390** 308-11
- Gangal, M., Clifford, T., Deich, J., Cheng, X., Taylor, S.S. und Johnson, D.A. (1999) *Mobilization of the A-kinase N-myristate through an isoform-specific intermolecular switch*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** 12394-9
- Gerace, L. und Burke, B. (1988) *Functional organization of the nuclear envelope*. *Annu Rev Cell Biol* **4** 335-74
- Gibson, R.M., Ji-Buechler, Y. und Taylor, S.S. (1997) *Interaction of the regulatory and catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase. Electrostatic sites on the type Ialpha regulatory subunit*. *J Biol Chem* **272** 16343-50
- Gill, G.N. und Garren, L.D. (1969) *On the mechanism of action of adrenocorticotrophic hormone: the binding of cyclic-3',5'-adenosine monophosphate to an adrenal cortical protein*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **63** 512-9

- Gilman, A.G. (1984)** *G proteins and dual control of adenylate cyclase*. Cell **36** 577-9
- Girod, A. (1997)** *Untersuchungen zum molekularen Wirkungsmechanismus von Proteinkinasen am Modell der katalytischen Untereinheit Calpha der Proteinkinase A*. In Biologische Fakultät (Bielefeld: Universität Bielefeld), pp. 176.
- Girod, A., Kinzel, V. und Bossemeyer, D. (1996)** *In vivo activation of recombinant cAPK catalytic subunit active site mutants by coexpression of the wild-type enzyme, evidence for intermolecular cotranslational phosphorylation*. FEBS Lett **391** 121-5
- Glass, D.B., Masaracchia, R.A., Feramisco, J.R. und Kemp, B.E. (1978)** *Isolation of phosphorylated peptides and proteins on ion exchange papers*. Anal Biochem **87** 566-75
- Goldberg, W.M., Cronshaw, J.M., Kiseleva, E. und Allen, T.D. (1999)** *Nuclear pore complex dynamics and transport in higher eukaryotes*. Protoplasma **209** 144-156
- Gorlich, D., Dabrowski, M., Bischoff, F.R., Kutay, U., Bork, P., Hartmann, E., Prehn, S. und Izaurralde, E. (1997)** *A novel class of RanGTP binding proteins*. J Cell Biol **138** 65-80
- Gorlich, D., Kostka, S., Kraft, R., Dingwall, C., Laskey, R.A., Hartmann, E. und Prehn, S. (1995)** *Two different subunits of importin cooperate to recognize nuclear localization signals and bind them to the nuclear envelope*. Curr Biol **5** 383-92
- Gorlich, D., Kraft, R., Kostka, S., Vogel, F., Hartmann, E., Laskey, R.A., Mattaj, I.W. und Izaurraide, E. (1996)** *Importin provides a link between nuclear protein import and U snRNA export*. Cell **87** 21-32
- Gorlich, D. und Kutay, U. (1999)** *Transport between the cell nucleus and the cytoplasm*. Annu Rev Cell Dev Biol **15** 607-60
- Gorlich, D., Pante, N., Kutay, U., Aebi, U. und Bischoff, F.R. (1996)** *Identification of different roles for RanGDP and RanGTP in nuclear protein import*. Embo J **15** 5584-94
- Gorlich, D., Vogel, F., Mills, A.D., Hartmann, E. und Laskey, R.A. (1995)** *Distinct functions for the two importin subunits in nuclear protein import*. Nature **377** 246-8
- Graessmann, A., Graessmann, M. und Mueller, C. (1980)** *Microinjection of early SV40 DNA fragments and T antigen*. Methods Enzymol **65** 816-25
- Granot, J., Mildvan, A.S., Hiyama, K., Kondo, H. und Kaiser, E.T. (1980)** *Magnetic resonance studies of the effect of the regulatory subunit on metal and substrate binding to the catalytic subunit of bovine heart protein kinase*. J Biol Chem **255** 4569-73
- Guthrie, C.R., Skalhegg, B.S. und McKnight, G.S. (1997)** *Two novel brain-specific splice variants of the murine Cbeta gene of cAMP-dependent protein kinase*. J Biol Chem **272** 29560-5
- Hagiwara, M., Inagaki, M. und Hidaka, H. (1987)** *Specific binding of a novel compound, N-[2-(methylamino)ethyl]-5-isoquinolinesulfonamide (H-8) to the active site of cAMP-dependent protein kinase*. Mol Pharmacol **31** 523-8
- Hamamoto, T., Seto, H. und Beppu, T. (1983)** *Leptomycins A and B, new antifungal antibiotics. II. Structure elucidation*. J Antibiot (Tokyo) **36** 646-50
- Hanahan, D. (1983)** *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids*. J Mol Biol **166** 557-80
- Hanks, S.K. und Hunter, T. (1995)** *Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification*. Faseb J **9** 576-96
- Hanks, S.K., Quinn, A.M. und Hunter, T. (1988)** *The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains*. Science **241** 42-52

- Harootunian, A.T., Adams, S.R., Wen, W., Meinkoth, J.L., Taylor, S.S. und Tsien, R.Y. (1993)** *Movement of the free catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase into and out of the nucleus can be explained by diffusion.* *Mol Biol Cell* **4** 993-1002
- Hauer, J.A., Barthe, P., Taylor, S.S., Parello, J. und Padilla, A. (1999)** *Two well-defined motifs in the cAMP-dependent protein kinase inhibitor (PKI $\alpha$ ) correlate with inhibitory and nuclear export function.* *Protein Sci* **8** 545-53
- Hausken, Z.E., Dell'Acqua, M.L., Coghlan, V.M. und Scott, J.D. (1996)** *Mutational analysis of the A-kinase anchoring protein (AKAP)-binding site on RII. Classification Of side chain determinants for anchoring and isoform selective association with AKAPs.* *J Biol Chem* **271** 29016-22
- Hegde, A.N., Goldberg, A.L. und Schwartz, J.H. (1993)** *Regulatory subunits of cAMP-dependent protein kinases are degraded after conjugation to ubiquitin: a molecular mechanism underlying long-term synaptic plasticity.* *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** 7436-40
- Herberg, F.W., Bell, S.M. und Taylor, S.S. (1993)** *Expression of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase in Escherichia coli: multiple isozymes reflect different phosphorylation states.* *Protein Eng* **6** 771-7
- Herberg, F.W., Maleszka, A., Eide, T., Vossebein, L. und Tasken, K. (2000)** *Analysis of A-kinase anchoring protein (AKAP) interaction with protein kinase A (PKA) regulatory subunits: PKA isoform specificity in AKAP binding.* *J Mol Biol* **298** 329-39
- Herberg, F.W. und Taylor, S.S. (1993)** *Physiological inhibitors of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase: effect of MgATP on protein-protein interactions.* *Biochemistry* **32** 14015-22
- Hidaka, H., Inagaki, M., Kawamoto, S. und Sasaki, Y. (1984)** *Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C.* *Biochemistry* **23** 5036-41
- Hinshaw, J.E., Carragher, B.O. und Milligan, R.A. (1992)** *Architecture and design of the nuclear pore complex.* *Cell* **69** 1133-41
- Huang, L.J., Durick, K., Weiner, J.A., Chun, J. und Taylor, S.S. (1997)** *Identification of a novel protein kinase A anchoring protein that binds both type I and type II regulatory subunits.* *J Biol Chem* **272** 8057-64
- Huang, L.J., Wang, L., Ma, Y., Durick, K., Perkins, G., Deerinck, T.J., Ellisman, M.H. und Taylor, S.S. (1999)** *NH<sub>2</sub>-Terminal targeting motifs direct dual specificity A-kinase-anchoring protein 1 (D-AKAP1) to either mitochondria or endoplasmic reticulum.* *J Cell Biol* **145** 951-9
- Hughes, M., Zhang, C., Avis, J.M., Hutchison, C.J. und Clarke, P.R. (1998)** *The role of the ran GTPase in nuclear assembly and DNA replication: characterisation of the effects of Ran mutants.* *J Cell Sci* **111** 3017-26
- Izaurralde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, I.W. und Gorlich, D. (1997)** *The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus.* *Embo J* **16** 6535-47
- Jahnsen, T., Hedin, L., Kidd, V.J., Beattie, W.G., Lohmann, S.M., Walter, U., Durica, J., Schulz, T.Z., Schiltz, E., Browner, M. und et al. (1986)** *Molecular cloning, cDNA structure, and regulation of the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase from rat ovarian granulosa cells [published erratum appears in J Biol Chem 1988 Mar 15;263(8):4041].* *J Biol Chem* **261** 12352-61
- Jarnik, M. und Aebi, U. (1991)** *Toward a more complete 3-D structure of the nuclear pore complex.* *J Struct Biol* **107** 291-308
- Jedrzejewski, P.T., Girod, A., Tholey, A., Konig, N., Thullner, S., Kinzel, V. und Bossemeyer, D. (1998)** *A conserved deamidation site at Asn 2 in the catalytic subunit of mammalian cAMP-dependent protein kinase detected by capillary LC-MS and tandem mass spectrometry.* *Protein Sci* **7** 457-69

- Jenkins, Y., McEntee, M., Weis, K. und Greene, W.C. (1998)** *Characterization of HIV-1 vpr nuclear import: analysis of signals and pathways.* J Cell Biol **143** 875-85
- Johnson, B.D., Scheuer, T. und Catterall, W.A. (1994)** *Voltage-dependent potentiation of L-type Ca<sup>2+</sup> channels in skeletal muscle cells requires anchored cAMP-dependent protein kinase.* Proc Natl Acad Sci U S A **91** 11492-6
- Johnson, D.A., Leathers, V.L., Martinez, A.M., Walsh, D.A. und Fletcher, W.H. (1993)** *Fluorescence Resonance Energy Transfer Within a Heterochromatic cAMP-Dependent Protein Kinase Holoenzyme Under Equilibrium Conditions - New Insights into the Conformational Changes That Result in cAMP-Dependent Activation.* Biochemistry **32** 6402-6410
- Kalderon, D., Richardson, W.D., Markham, A.F. und Smith, A.E. (1984)** *Sequence requirements for nuclear location of simian virus 40 large-T antigen.* Nature **311** 33-8
- Katahira, J., Strasser, K., Podtelejnikov, A., Mann, M., Jung, J.U. und Hurt, E. (1999)** *The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human.* Embo J **18** 2593-609
- Kemp, B.E., Graves, D.J., Benjamini, E. und Krebs, E.G. (1977)** *Role of multiple basic residues in determining the substrate specificity of cyclic AMP-dependent protein kinase.* J Biol Chem **252** 4888-94
- Kiseleva, E., Goldberg, M.W., Allen, T.D. und Akey, C.W. (1998)** *Active nuclear pore complexes in Chironomus: visualization of transporter configurations related to mRNP export.* J Cell Sci **111** 223-36
- Klauck, T.M., Faux, M.C., Labudda, K., Langeberg, L.K., Jaken, S. und Scott, J.D. (1996)** *Coordination of three signaling enzymes by AKAP79, a mammalian scaffold protein.* Science **271** 1589-92
- Klussmann, E., Maric, K., Wiesner, B., Beyermann, M. und Rosenthal, W. (1999)** *Protein kinase A anchoring proteins are required for vasopressin-mediated translocation of aquaporin-2 into cell membranes of renal principal cells.* J Biol Chem **274** 4934-8
- Knighton, D.R., Zheng, J.H., Ten Eyck, L.F., Ashford, V.A., Xuong, N.H., Taylor, S.S. und Sowadski, J.M. (1991)** *Crystal structure of the catalytic subunit of cyclic adenosine monophosphate-dependent protein kinase [see comments].* Science **253** 407-14
- Krebs, E.G. und Beavo, J.A. (1979)** *Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes.* Annu Rev Biochem **48** 923-59
- Kudo, N., Wolff, B., Sekimoto, T., Schreiner, E.P., Yoneda, Y., Yanagida, M., Horinouchi, S. und Yoshida, M. (1998)** *Leptomycin B inhibition of signal-mediated nuclear export by direct binding to CRM1.* Exp Cell Res **242** 540-7
- Kutay, U., Izaurralde, E., Bischoff, F.R., Mattaj, I.W. und Gorlich, D. (1997)** *Dominant-negative mutants of importin-beta block multiple pathways of import and export through the nuclear pore complex.* Embo J **16** 1153-63
- Laemmli, U.K. (1970)** *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature **227** 680-5
- Lanford, R.E. und Butel, J.S. (1984)** *Construction and characterization of an SV40 mutant defective in nuclear transport of T antigen.* Cell **37** 801-13
- Lang, I., Scholz, M. und Peters, R. (1986)** *Molecular mobility and nucleocytoplasmic flux in hepatoma cells.* J Cell Biol **102** 1183-90
- Lee, D.C., Carmichael, D.F., Krebs, E.G. und McKnight, G.S. (1983)** *Isolation of a cDNA clone for the type I regulatory subunit of bovine cAMP-dependent protein kinase.* Proc Natl Acad Sci U S A **80** 3608-12

- Lindqvist, B. und Storgards, T. (1955)** *Molecular-sieving properties of starch.* Nature **175** 511-512
- McKnight, G.S. (1991)** *Cyclic AMP second messenger systems.* Curr Opin Cell Biol **3** 213-7
- Meinkoth, J.L., Ji, Y., Taylor, S.S. und Feramisco, J.R. (1990)** *Dynamics of the distribution of cyclic AMP-dependent protein kinase in living cells [published erratum appears in Proc Natl Acad Sci U S A 1991 Feb 15;88(4):1590].* Proc Natl Acad Sci U S A **87** 9595-9
- Miki, K. und Eddy, E.M. (1999)** *Single amino acids determine specificity of binding of protein kinase A regulatory subunits by protein kinase A anchoring proteins.* J Biol Chem **274** 29057-62
- Moroianu, J. (1999)** *Nuclear import and export: transport factors, mechanisms and regulation.* Crit Rev Eukaryot Gene Expr **9** 89-106
- Nakielnny, S., Siomi, M.C., Siomi, H., Michael, W.M., Pollard, V. und Dreyfuss, G. (1996)** *Transportin: nuclear transport receptor of a novel nuclear protein import pathway.* Exp Cell Res **229** 261-6
- Newlon, M.G., Roy, M., Morikis, D., Hausken, Z.E., Coghlan, V., Scott, J.D. und Jennings, P.A. (1999)** *The molecular basis for protein kinase A anchoring revealed by solution NMR.* Nat Struct Biol **6** 222-7
- Newmeyer, D.D. und Forbes, D.J. (1988)** *Nuclear import can be separated into distinct steps in vitro: nuclear pore binding and translocation.* Cell **52** 641-53
- Nigg, E.A., Hilz, H., Eppenberger, H.M. und Dutly, F. (1985)** *Rapid and reversible translocation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase type II from the Golgi complex to the nucleus.* Embo J **4** 2801-6
- Nowak, I., Seipel, K., Schwarz, M., Jans, D.A. und Hemmings, B.A. (1987)** *Isolation of a cDNA and characterization of the 5' flanking region of the gene encoding the type I regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase.* Eur J Biochem **167** 27-33
- Olsen, S.R. und Uhler, M.D. (1989)** *Affinity purification of the C alpha and C beta isoforms of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase.* J Biol Chem **264** 18662-6
- Olsen, S.R. und Uhler, M.D. (1991)** *Isolation and characterization of cDNA clones for an inhibitor protein of cAMP-dependent protein kinase.* J Biol Chem **266** 11158-62
- Orellana, S.A., Amieux, P.S., Zhao, X. und McKnight, G.S. (1993)** *Mutations in the catalytic subunit of the cAMP-dependent protein kinase interfere with holoenzyme formation without disrupting inhibition by protein kinase inhibitor.* J Biol Chem. **268** 6843-6
- Orellana, S.A. und McKnight, G.S. (1992)** *Mutations in the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase result in unregulated biological activity.* Proc Natl Acad Sci U S A **89** 4726-30
- Otten, A.D. und McKnight, G.S. (1989)** *Overexpression of the type II regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase eliminates the type I holoenzyme in mouse cells.* J Biol Chem **264** 20255-60
- Pepperkok, R., Hotz-Wagenblatt, A., Konig, N., Girod, A., Bossemeyer, D. und Kinzel, V. (2000)** *Intracellular distribution of mammalian protein kinase A catalytic subunit altered by conserved Asn2 deamidation.* J Cell Biol **148** 715-26
- Peters, R. (1986)** *Fluorescence microphotolysis to measure nucleocytoplasmic transport and intracellular mobility.* Biochim Biophys Acta **864** 305-59
- Peters, R. (1984)** *Nucleo-cytoplasmic flux and intracellular mobility in single hepatocytes measured by fluorescence microphotolysis.* Embo J **3** 1831-6
- Qi, M., Zhuo, M., Skalhegg, B.S., Brandon, E.P., Kandel, E.R., McKnight, G.S. und Idzerda, R.L. (1996)** *Impaired hippocampal plasticity in mice lacking the Cbeta1 catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase.* Proc Natl Acad Sci U S A **93** 1571-6

- Reichelt, R., Holzenburg, A., Buhle, E.L., Jr., Jarnik, M., Engel, A. und Aebi, U. (1990)** *Correlation between structure and mass distribution of the nuclear pore complex and of distinct pore complex components.* J Cell Biol **110** 883-94
- Rexach, M. und Blobel, G. (1995)** *Protein import into nuclei: association and dissociation reactions involving transport substrate, transport factors, and nucleoporins.* Cell **83** 683-92
- Ribbeck, K., Kutay, U., Paraskeva, E. und Gorlich, D. (1999)** *The translocation of transportin-cargo complexes through nuclear pores is independent of both Ran and energy.* Curr Biol **9** 47-50
- Richardson, W.D., Mills, A.D., Dilworth, S.M., Laskey, R.A. und Dingwall, C. (1988)** *Nuclear protein migration involves two steps: rapid binding at the nuclear envelope followed by slower translocation through nuclear pores.* Cell **52** 655-64
- Robbins, J., Dilworth, S.M., Laskey, R.A. und Dingwall, C. (1991)** *Two interdependent basic domains in nucleoplasmin nuclear targeting sequence: identification of a class of bipartite nuclear targeting sequence.* Cell **64** 615-23
- Robin, P., Rossignol, B. und Raymond, M.N. (1998)** *PKA inhibitor, H-89, affects the intracellular transit of regulated secretory proteins in rat lacrimal glands.* Am J Physiol **274** C262-71
- Rosenmund, C., Carr, D.W., Bergeson, S.E., Nilaver, G., Scott, J.D. und Westbrook, G.L. (1994)** *Anchoring of protein kinase A is required for modulation of AMPA/kainate receptors on hippocampal neurons.* Nature **368** 853-6
- Rubin, C.S. (1994)** *A kinase anchor proteins and the intracellular targeting of signals carried by cyclic AMP.* Biochim Biophys Acta **1224** 467-79
- Sandberg, M., Levy, F.O., Oyen, O., Hansson, V. und Jahnsen, T. (1988)** *Molecular cloning, cDNA structure and deduced amino acid sequence for the hormone-induced regulatory subunit (RII beta) of cAMP-dependent protein kinase from rat ovarian granulosa cells.* Biochem Biophys Res Commun **154** 705-11
- Scarpetta, M.A. und Uhler, M.D. (1993)** *Evidence for two additional isoforms of the endogenous protein kinase inhibitor of cAMP-dependent protein kinase in mouse.* J Biol Chem **268** 10927-31
- Schmalz, D., Hucho, F. und Buchner, K. (1998)** *Nuclear import of protein kinase C occurs by a mechanism distinct from the mechanism used by proteins with a classical nuclear localization signal.* J Cell Sci **111** 1823-30
- Schmalz, D., Kalkbrenner, F., Hucho, F. und Buchner, K. (1996)** *Transport of protein kinase C alpha into the nucleus requires intact cytoskeleton while the transport of a protein containing a canonical nuclear localization signal does not.* J Cell Sci **109** 2401-6
- Schramm, M. und Selinger, Z. (1984)** *Message transmission: receptor controlled adenylate cyclase system.* Science **225** 1350-6
- Schulz, B. und Peters, R. (1986)** *Intracellular transport of a karyophilic protein.* In Nucleocytoplasmic Transport, R. Peters and M. Trendelenburg, eds. (Berlin: Springer-Verlag), pp. 171-184
- Schulz, B. und Peters, R. (1987)** *Nucleocytoplasmic protein traffic in single mammalian cells studied by fluorescence microphotolysis.* Biochim Biophys Acta **930** 419-31
- Schwoebel, E.D., Talcott, B., Cushman, I. und Moore, M.S. (1998)** *Ran-dependent signal-mediated nuclear import does not require GTP hydrolysis by Ran.* J Biol Chem **273** 35170-5
- Scott, J.D., Glaccum, M.B., Zoller, M.J., Uhler, M.D., Helfman, D.M., McKnight, G.S. und Krebs, E.G. (1987)** *The molecular cloning of a type II regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase from rat skeletal muscle and mouse brain.* Proc Natl Acad Sci U S A **84** 5192-6
- Scott, J.D. und McCartney, S. (1994)** *Localization of A-kinase through anchoring proteins.* Mol Endocrinol **8** 5-11

- Shoji, S., Parmelee, D.C., Wade, R.D., Kumar, S., Ericsson, L.H., Walsh, K.A., Neurath, H., Long, G.L., Demaille, J.G., Fischer, E.H. und Titani, K. (1981)** Complete amino acid sequence of the catalytic subunit of bovine cardiac muscle cyclic AMP-dependent protein kinase. Proc Natl Acad Sci U S A **78** 848-51
- Showers, M.O. und Maurer, R.A. (1986)** A cloned bovine cDNA encodes an alternate form of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase. J Biol Chem **261** 16288-91
- Skalhegg, B.S., Tasken, K., Hansson, V., Huitfeldt, H.S., Jahnsen, T. und Lea, T. (1994)** Location of cAMP-dependent protein kinase type I with the TCR-CD3 complex. Science **263** 84-7
- Solberg, R., Sandberg, M., Natarajan, V., Torjesen, P.A., Hansson, V., Jahnsen, T. und Tasken, K. (1997)** The human gene for the regulatory subunit RI alpha of cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-dependent protein kinase: two distinct promoters provide differential regulation of alternately spliced messenger ribonucleic acids. Endocrinology **138** 169-81
- Spaulding, S.W. (1993)** The ways in which hormones change cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase subunits, and how such changes affect cell behavior. Endocr Rev **14** 632-50
- Spurlino, J.C., Lu, G.Y. und Quioco, F.A. (1991)** The 2.3-A resolution structure of the maltose- or maltodextrin-binding protein, a primary receptor of bacterial active transport and chemotaxis. J Biol Chem **266** 5202-19
- Stade, K., Ford, C.S., Guthrie, C. und Weis, K. (1997)** Exportin 1 (Crm1p) is an essential nuclear export factor. Cell **90** 1041-50
- Steinberg, R.A. (1991)** A kinase-negative mutant of S49 mouse lymphoma cells is defective in posttranslational maturation of catalytic subunit of cyclic AMP- dependent protein kinase. Mol Cell Biol **11** 705-12
- Steinberg, R.A., Cauthron, R.D., Symcox, M.M. und Shuntoh, H. (1993)** Autoactivation of catalytic (C alpha) subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase by phosphorylation of threonine 197. Mol Cell Biol **13** 2332-41
- Stryer, L. (1991)** *Biochemie* (Heidelberg, Berlin, New York: Spektrum Akademischer Verlag GmbH)
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. und Dubendorff, J.W. (1990)** Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods Enzymol **185** 60-89
- Sutherland, E.W. und Rall, T.W. (1957)** J. Am. Chem. Soc. **79** 3608
- Sweitzer, T.D. und Hanover, J.A. (1996)** Calmodulin activates nuclear protein import: a link between signal transduction and nuclear transport. Proc Natl Acad Sci U S A **93** 14574-9
- Takio, K., Smith, S.B., Krebs, E.G., Walsh, K.A. und Titani, K. (1982)** Primary structure of the regulatory subunit of type II cAMP-dependent protein kinase from bovine cardiac muscle. Proc Natl Acad Sci U S A **79** 2544-8
- Talcott, B. und Moore, M.S. (1999)** Getting across the nuclear pore complex. Trends Cell Biol **9** 312-8
- Tang, W.J. und Gilman, A.G. (1992)** Adenylyl cyclases. Cell **70** 869-72
- Tasken, K., Skalhegg, B.S., Solberg, R., Andersson, K.B., Taylor, S.S., Lea, T., Blomhoff, H.K., Jahnsen, T. und Hansson, V. (1993)** Novel isozymes of cAMP-dependent protein kinase exist in human cells due to formation of RI alpha-RI beta heterodimeric complexes. J Biol Chem **268** 21276-83
- Tasken, K., Skalhegg, B.S., Tasken, K.A., Solberg, R., Knutsen, H.K., Levy, F.O., Sandberg, M., Orstavik, S., Larsen, T., Johansen, A.K., Vang, T., Schrader, H.P., Reinton, N.T., Torgersen, K.M., Hansson, V. und Jahnsen, T. (1997)** Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. Adv Second Messenger Phosphoprotein Res **31** 191-204

- Tasken, K.A., Knutsen, H.K., Attramadal, H., Tasken, K., Jahnsen, T., Hansson, V. und Eskild, W. (1991)** *Different mechanisms are involved in cAMP-mediated induction of mRNAs for subunits of cAMP-dependent protein kinases.* Mol Endocrinol **5** 21-8
- Taylor, S.S., Buechler, J.A. und Yonemoto, W. (1990)** *cAMP-dependent protein kinase: framework for a diverse family of regulatory enzymes.* Annu Rev Biochem **59** 971-1005
- Thullner, S., Gesellchen, F., Wiemann, S., Pyerin, W., Kinzel, V. und Bossemeyer, D. (2000)** *The protein kinase A catalytic subunit Cbeta2: molecular characterization and distribution of the splice variant.* Biochem J **351** 123-132
- Towler, D.A., Gordon, J.I., Adams, S.P. und Glaser, L. (1988)** *The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation.* Annu Rev Biochem **57** 69-99
- Uhler, M.D., Carmichael, D.F., Lee, D.C., Chrivia, J.C., Krebs, E.G. und McKnight, G.S. (1986)** *Isolation of cDNA clones coding for the catalytic subunit of mouse cAMP-dependent protein kinase.* Proc Natl Acad Sci U S A **83** 1300-4
- Uhler, M.D. und McKnight, G.S. (1987)** *Expression of cDNAs for two isoforms of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase.* J Biol Chem **262** 15202-7
- Van Patten, S.M., Heisermann, G.J., Cheng, H.C. und Walsh, D.A. (1987)** *Tyrosine kinase catalyzed phosphorylation and inactivation of the inhibitor protein of the cAMP-dependent protein kinase.* J Biol Chem **262** 3398-403
- Van Patten, S.M., Ng, D.C., Th'ng, J.P., Angelos, K.L., Smith, A.J. und Walsh, D.A. (1991)** *Molecular cloning of a rat testis form of the inhibitor protein of cAMP-dependent protein kinase.* Proc Natl Acad Sci U S A **88** 5383-7
- Vijayaraghavan, S., Goueli, S.A., Davey, M.P. und Carr, D.W. (1997)** *Protein kinase A-anchoring inhibitor peptides arrest mammalian sperm motility.* J Biol Chem **272** 4747-52
- Vijayaraghavan, S., Olson, G.E., NagDas, S., Winfrey, V.P. und Carr, D.W. (1997)** *Subcellular localization of the regulatory subunits of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase in bovine spermatozoa.* Biol Reprod **57** 1517-23
- Walsh, D.A., Angelos, K.L., Van Patten, S.M., Glass, D.B. und Garetto, L.P. (1990)** *The Inhibitor Protein of the cAMP-Dependent Protein Kinase.* In Peptides and Protein Phosphorylation, B. E. Kemp, ed. (Boca Raton: CRC Press, Inc.), pp. 43-84
- Walsh, D.A., Ashby, C.D., Gonzalez, C., Calkins, D. und Fischer, E.H. (1971)** *Krebs EG: Purification and characterization of a protein inhibitor of adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinases.* J Biol Chem **246** 1977-85
- Walsh, D.A., Perkins, J.P. und Krebs, E.G. (1968)** *An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle.* J Biol Chem **243** 3763-5
- Wang, H. und Clapham, D.E. (1999)** *Conformational changes of the in situ nuclear pore complex.* Biophys J **77** 241-7
- Weissinger, E.M., Eissner, G., Grammer, C., Fackler, S., Haefner, B., Yoon, L.S., Lu, K.S., Bazarov, A., Sedivy, J.M., Mischak, H. und Kolch, W. (1997)** *Inhibition of the Raf-1 kinase by cyclic AMP agonists causes apoptosis of v-abl-transformed cells.* Mol Cell Biol **17** 3229-41
- Wen, W., Meinkoth, J.L., Tsien, R.Y. und Taylor, S.S. (1995)** *Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus.* Cell **82** 463-73
- Wen, W., Taylor, S.S. und Meinkoth, J.L. (1995)** *The expression and intracellular distribution of the heat-stable protein kinase inhibitor is cell cycle regulated.* J Biol Chem **270** 2041-6
- Wente, S.R. (2000)** *Gatekeepers of the nucleus.* Science **288** 1374-7

- Wiemann, S., Kinzel, V. und Pyerin, W. (1991)** *Isoform C beta 2, an unusual form of the bovine catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase.* J Biol Chem **266** 5140-6
- Yang, S., Fletcher, W.H. und Johnson, D.A. (1995)** *Regulation of cAMP-dependent protein kinase: enzyme activation without dissociation.* Biochemistry **34** 6267-6271
- Yaseen, N.R. und Blobel, G. (1999)** *Two distinct classes of Ran-binding sites on the nucleoporin Nup-358.* Proc Natl Acad Sci U S A **96** 5516-21
- Yoneda, Y., Imamoto-Sonobe, N., Yamaizumi, M. und Uchida, T. (1987)** *Reversible inhibition of protein import into the nucleus by wheat germ agglutinin injected into cultured cells.* Exp Cell Res **173** 586-95
- Yonemoto, W., McGlone, M.L. und Taylor, S.S. (1993)** *N-myristylation of the catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase conveys structural stability.* J Biol Chem **268** 2348-52
- Zetterqvist, Ö.Z., Ragnarsson, U. und Engstrom, L. (1990)** *Substrate Specificity of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase.* In Peptide and Protein Phosphorylation, B. E. Kemp, ed. (Boca Raton: CRC Press, Inc.), pp. 171-187
- Zheng, J., Knighton, D.R., Xuong, N.H., Taylor, S.S., Sowadski, J.M. und Ten Eyck, L.F. (1993)** *Crystal structures of the myristylated catalytic subunit of cAMP- dependent protein kinase reveal open and closed conformations.* Protein Sci **2** 1559-73
- Zimmermann, B. (2000)** *Dissertation.*

# Anhang

## 1 Primer

### Klonierung des Fusionsproteins PKA C $\alpha$ - $\beta$ -Galaktosidase

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>
P1	5' - TAT ACC ATG GGC AAC GCC GCC GC
P2	5' - GCG CGG ATC CCC GAA CTC AGA AAA CTC CTT GCC

### Klonierung des Fusionsproteins PKA C $\alpha$ (1-40)-GST

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>
C $\alpha$ (vorne)	5' - TAT TTT GTT AAA ATT CGC GT
C $\alpha$ (hinten)	5' - TTC AAA CAA GCT TAA GTG GGC TGT
GST (vorne)	5' - GTA TTA AGG TTC CCT ATA CTA GGT
GST (hinten)	5' - TGG GGA TCC TCA CGG AAC CAG ATC

### Mutagenese der PKA C $\alpha$ -Doppelmutante (H87Q/W196R)

<u>Primer</u>	<u>Mutation</u>	<u>Austausch</u>	<u>Sequenz</u>
His87	CAC→CAG	His87Gln	5' - G AAA CAG ATT GAG <b>CAG</b> ACC CTG AAT GAG AAG
His87 (rev.)	GTG→CTG	His87Gln	5' - CTT CTC ATT CAG GGT <b>CTG</b> CTC AAT CTG TTT C
Trp196	TGG→CGG	Trp196Arg	5' - TG AAA GGC CGC ACC <b>CGG</b> ACC TTG TGT GGG
Trp196 (rev.)	CCA→CCG	Trp196Arg	5' - CCC ACA CAA GGT <b>CCG</b> GGT GCG GCC TTT CA

### *De novo*-Synthese von PKI

<u>Primer</u>	<u>Sequenz</u>
P1	5' - T TTG ATC CAT ATG ACT GAT GTG GAA ACT ACT TAT GCA GAT
P2	5' - A GGT AGA AGA ATT GCA ATA CAT GAT ATC CTG GTT TCC TCT
P3	5' - TTA GCC TTG AAA TTA GCA GGT CTT GAT ATC AAC AAG ACA
P4	5' - A CGA AGT TCT ACA GAA CAA AGT GGG GAA GCC CAG GGA GAA
P1R	5' -TCT TCT ACC TGT TCT TCC TGA AGC AAT AAA ATC TGC ATA T
P2R	5' - CAA GGC TAA TTC ATT GCT GTT GCC ACT TGC AGA GGA AAC C
P3R	5' - AGA ACT TCG TTG TGC ATC TTC TTC ACC TTC TGT CTT GTT G
P4R	5' - A AGG ATC CTG CAG TTA GCT TTC AGA TTT TGC TGC TTC TCC CTG G
P1k	5' - T TGG ATC CAT ATG ACT GAT GT
P2k	5' - A GGT AGA AGA AAT GCA ATA CA
P3k	5' - A TTA GCC TTG AAA TTA GCA GG
P4k	5' - A CGA AGT TCT ACA GAA CAA AG
P1Rk	5' - TCT TCT ACC TGT TCT TCC TGA
P2Rk	5' - CAA GGC TAA TTC ATT GCT GTT
P3Rk	5' - AGA ACT TCA TTG TGC ATC TTC
P4Rk	5' - A AGG ATC CTG CAG TTA GCT TT

## 2 Peptidsequenzen

### Kemptid

Sequenz: LRRASLG  
 Strukturformel:  $C_{32}H_6N_{13}O_9$   
 Mr der freien Base: 771,9 Da

### PKI (5-24)

Sequenz: TTYADFIASGRTGRRNAIHD  
 Strukturformel:  $C_{94}H_{148}N_{32}O_{31}$   
 Mr der freien Base: 222,4 Da  
 Kaninchensequenz

### myr PKI (6-24)

Sequenz: myrT\*YADFIASGRTG(D-R)\*\*RNAIHD(OcHx)-COOH\*\*\*  
 Strukturformel:  $C_{110}H_{177}N_{31}O_{30}$   
 Mr der freien Base: 2414,4 Da

- \* N-terminale Myristylierung
- \*\* D-Arginin
- \*\*\* Aspartat(OcHx)-COOH (Cyclohexylmethylester)

### myr PKI (6-24) (random)

Sequenz: myrT\*DIGRYNRAHAT(D-R)\*\*FAIGSD(OcHx)-COOH\*\*\*  
 Strukturformel:  $C_{110}H_{177}N_{31}O_{30}$   
 Mr der freien Base: 2414,4 Da

- \* N-terminale Myristylierung
- \*\* D-Arginin
- \*\*\* Aspartat(OcHx)-COOH (Cyclohexylmethylester)

### SV40 NLS

Sequenz: CGGGPKKKRKVED  
 Strukturformel:  $C_{50}H_{104}N_{20}O_{30}S$   
 Mr der freien Base: 1400,9 Da

### SV40 NLS Peptid-Analog

Sequenz: CGTGPKKKRKVGG  
 Strukturformel:  $C_{55}H_{102}N_{20}O_{15}S$   
 Mr der freien Base: 1315,6 Da

### 3 PKA C $\alpha$ -DNA- und Proteinsequenz

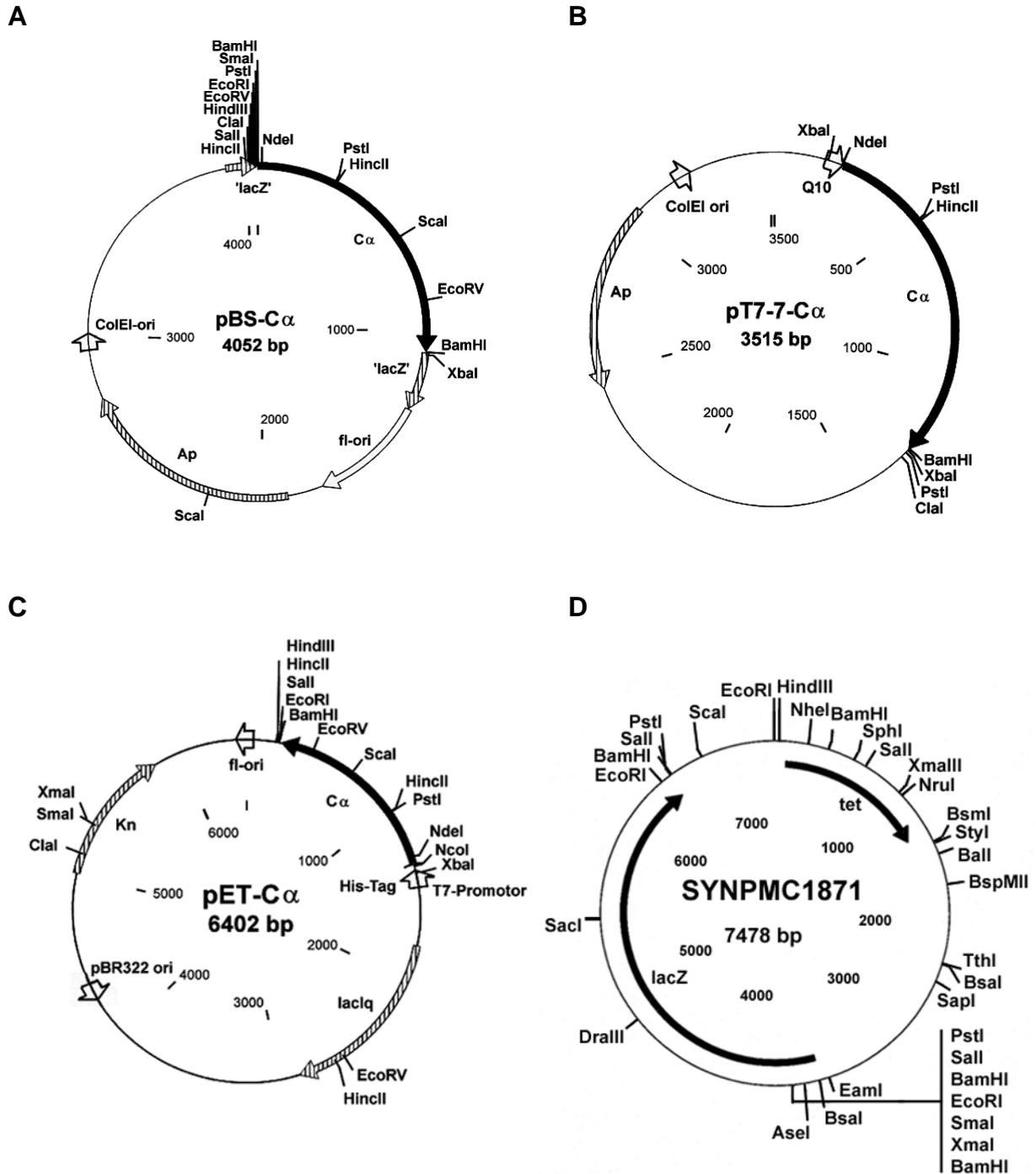
	<b>CAT</b>	<b>ATG</b>	GGC	AAC	GCC	GCC	GCC	GCC	AAG	AAG	GGC	AGC	GAG	CAA	GAA	AGC	GTG	
		<b>M</b>	<b>G</b>	<b>N</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>K</b>	<b>K</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>E</b>	<b>Q</b>	<b>E</b>	<b>S</b>	<b>V</b>	<b>15</b>
49	AAA	GAG	TTC	TTA	GCC	AAA	GCC	AAA	GAA	GAT	TTT	CTT	AAA	AAA	TGG	GAA		
		<b>K</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>L</b>	<b>A</b>	<b>K</b>	<b>A</b>	<b>K</b>	<b>E</b>	<b>D</b>	<b>F</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>K</b>	<b>W</b>	<b>E</b>	<b>31</b>
97	AAT	CCT	GCT	CAG	AAC	ACA	GCC	CAC	TTG	GAT	CAG	TTT	GAA	CGA	ATC	AAG		
		<b>N</b>	<b>P</b>	<b>A</b>	<b>Q</b>	<b>N</b>	<b>T</b>	<b>A</b>	<b>H</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>F</b>	<b>E</b>	<b>R</b>	<b>I</b>	<b>K</b>	<b>47</b>
145	ACC	CTG	GGT	ACG	GGC	TCC	TTC	GGG	CGG	GTG	ATG	CTG	GTG	AAG	CAC	ATG		
		<b>T</b>	<b>L</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	<b>V</b>	<b>M</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>K</b>	<b>H</b>	<b>M</b>	<b>63</b>
193	GAG	ACC	GGG	AAC	CAC	TAC	GCC	ARG	AAG	ATC	CTC	GAC	AAA	CAG	AAG	GTG		
		<b>E</b>	<b>T</b>	<b>G</b>	<b>N</b>	<b>H</b>	<b>Y</b>	<b>A</b>	<b>M</b>	<b>K</b>	<b>I</b>	<b>L</b>	<b>D</b>	<b>K</b>	<b>Q</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>79</b>
241	GTG	AAG	CTG	AAA	CAG	ATT	GAG	CAC	ACC	CTG	AAT	GAG	AAG	CGC	ATC	CTG		
		<b>V</b>	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>Q</b>	<b>I</b>	<b>E</b>	<b>H</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	<b>N</b>	<b>E</b>	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>I</b>	<b>L</b>	<b>95</b>
289	CAG	GCG	GTC	AAC	TTT	CCG	TTC	CTT	GTC	AAA	CTC	GAG	TTC	TCC	TTC	AAG		
		<b>Q</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>N</b>	<b>F</b>	<b>P</b>	<b>F</b>	<b>L</b>	<b>V</b>	<b>K</b>	<b>L</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>F</b>	<b>K</b>	<b>111</b>
337	GAC	AAC	TCA	AAT	TTA	TAC	ATG	GTC	ATG	GAG	TAC	GTG	CCC	GGT	GGG	GAG		
		<b>D</b>	<b>N</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>L</b>	<b>Y</b>	<b>M</b>	<b>V</b>	<b>M</b>	<b>E</b>	<b>Y</b>	<b>V</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>G</b>	<b>E</b>	<b>127</b>
385	ATG	TTC	TCA	CAC	CTG	CGA	CGG	ATC	GGG	AGG	TTC	AGT	GAG	CCC	CAC	GCA		
		<b>M</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>H</b>	<b>L</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>E</b>	<b>P</b>	<b>H</b>	<b>A</b>	<b>143</b>
433	CGC	TTC	TAC	GCC	GCC	CAG	ATT	GTC	CTG	ACC	TTT	GAG	TAC	CTG	CAC	TCG		
		<b>R</b>	<b>F</b>	<b>Y</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>Q</b>	<b>I</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>F</b>	<b>E</b>	<b>Y</b>	<b>L</b>	<b>H</b>	<b>S</b>	<b>159</b>
481	CTT	GAT	CTC	ATT	TAC	CGG	GAC	CTG	AAG	CCA	GAG	AAC	CTC	CTC	ATC	GAC		
		<b>L</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>I</b>	<b>Y</b>	<b>R</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>P</b>	<b>E</b>	<b>N</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>I</b>	<b>D</b>	<b>175</b>
529	CAG	CAG	GGC	TAC	ATT	CAG	GTG	ACA	GAC	TTT	GGT	TTC	GCC	AAG	CGT	GTG		
		<b>Q</b>	<b>Q</b>	<b>G</b>	<b>Y</b>	<b>I</b>	<b>Q</b>	<b>V</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>F</b>	<b>A</b>	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>V</b>	<b>191</b>
577	AAA	GGC	CGC	ACC	TGG	ACC	TTG	TGT	GGG	ACC	CCT	GAG	TAC	TTG	GCC	CCC		
		<b>K</b>	<b>G</b>	<b>R</b>	<b>T</b>	<b>W</b>	<b>T</b>	<b>L</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>T</b>	<b>P</b>	<b>E</b>	<b>Y</b>	<b>L</b>	<b>A</b>	<b>P</b>	<b>207</b>
625	GAG	ATC	ATC	CTG	AGT	AAA	GGC	TAC	AAC	AAA	GCT	GTC	GAC	TGG	TGG	GCC		
		<b>E</b>	<b>I</b>	<b>I</b>	<b>L</b>	<b>S</b>	<b>K</b>	<b>G</b>	<b>Y</b>	<b>N</b>	<b>K</b>	<b>A</b>	<b>V</b>	<b>D</b>	<b>W</b>	<b>W</b>	<b>A</b>	<b>223</b>
673	CTG	GGG	GTC	CTC	ATC	TAC	GAA	ATG	GCC	GCA	GGC	TAC	CCG	CCC	TTC	TTT		
		<b>L</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	<b>L</b>	<b>I</b>	<b>Y</b>	<b>E</b>	<b>M</b>	<b>A</b>	<b>A</b>	<b>G</b>	<b>Y</b>	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>F</b>	<b>F</b>	<b>239</b>
721	GCC	GAC	CAG	CCC	ATC	CAG	ATC	TAC	GAG	AAG	ATT	GTC	TCT	GGG	AAG	GTG		
		<b>A</b>	<b>D</b>	<b>Q</b>	<b>P</b>	<b>I</b>	<b>Q</b>	<b>I</b>	<b>Y</b>	<b>E</b>	<b>K</b>	<b>I</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>G</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>255</b>
769	CGG	TTT	CCA	TCC	CAC	TTC	AGC	TCT	GAC	TTG	AAG	GAT	CTG	CTG	CGC	AAC		
		<b>R</b>	<b>E</b>	<b>P</b>	<b>S</b>	<b>H</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>S</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>L</b>	<b>R</b>	<b>N</b>	<b>271</b>
817	CTC	CTA	CAA	GTG	GAC	CTC	ACC	AAG	CGC	TTT	GGG	AAC	CTC	AAG	AAT	GGG		
		<b>L</b>	<b>L</b>	<b>Q</b>	<b>V</b>	<b>D</b>	<b>L</b>	<b>T</b>	<b>K</b>	<b>R</b>	<b>F</b>	<b>G</b>	<b>N</b>	<b>L</b>	<b>K</b>	<b>N</b>	<b>G</b>	<b>287</b>
865	GTC	AAT	GAT	ATC	AAG	AAC	CAC	AAG	TGG	TTT	GCC	ACA	ACT	GAC	TGG	ATT		
		<b>V</b>	<b>N</b>	<b>D</b>	<b>I</b>	<b>K</b>	<b>N</b>	<b>H</b>	<b>K</b>	<b>W</b>	<b>F</b>	<b>A</b>	<b>T</b>	<b>T</b>	<b>D</b>	<b>W</b>	<b>I</b>	<b>303</b>
913	GCC	ATC	TAC	CAG	AGG	AAG	GTG	GAA	GCT	CCC	TTC	ATA	CCA	AAG	TTT	AAA		
		<b>A</b>	<b>I</b>	<b>Y</b>	<b>Q</b>	<b>R</b>	<b>K</b>	<b>V</b>	<b>E</b>	<b>A</b>	<b>P</b>	<b>F</b>	<b>I</b>	<b>P</b>	<b>K</b>	<b>F</b>	<b>K</b>	<b>319</b>
961	GGC	CCT	GGG	GAC	ACA	AGT	AAC	TTT	GAC	GAC	TAT	GAG	GAG	GAA	GAG	ATC		
		<b>G</b>	<b>P</b>	<b>G</b>	<b>D</b>	<b>T</b>	<b>S</b>	<b>N</b>	<b>F</b>	<b>D</b>	<b>D</b>	<b>Y</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>E</b>	<b>I</b>	<b>335</b>
1009	CGA	GTC	TCT	ATC	AAT	GAG	AAG	TGT	GGC	AAG	GAG	TTT	TCT	GAG	TTC	TAG		
		<b>R</b>	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>I</b>	<b>N</b>	<b>E</b>	<b>K</b>	<b>C</b>	<b>G</b>	<b>K</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>S</b>	<b>E</b>	<b>F</b>	<b>Stopp</b>	<b>350</b>
1057	GGT	GTG	CCT	GTG	<u>CGG</u>	<u>ATC</u>	<u>CGG</u>	G										

**BamHI**

#### Abbildung A1: DNA- und Proteinsequenz der C $\alpha$ -Untereinheit.

Sequenzbezeichnung: BTPKINCA; EMBL / GenBank / DDBJ Databases. Das N-terminale Methionin wird sowohl in Eukaryonten als auch in *E. coli* abgespalten.

### 4 Vektoren



**Abbildung A2 : Plasmidkarten der Vektoren A) pBS-Cα, B) pT7-7-Cα, C) pEt28b-Cα und D) SYNpMC1871**  
 Außerhalb der Vektoren: Restriktionsnukleasen, die die Vektoren an der jeweiligen Position schneiden. *ori*:  
 Replikationsursprung; Ap: Ampillicin- und Carbenicillin-resistenzvermittelndes Gen; Kn: Kanamycin-  
 resistenzvermittelndes Gen; Cα: PKA Cα-Gen

## 5 PCR-Programme

### Ortsspezifische Mutagenese (QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit)

<u>Zyklenzahl</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Zyklenzahl</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>
1	95 °C	30 s	1	95 °C	30 s
12	95 °C	30 s	12	95 °C	30 s
	55 °C	60 s		58 °C	60 s
	68 °C	13 min		68 °C	7 min
1	4 °C	∞	1	4 °C	∞

### Einfügen von Schnittstellen über PCR

<u>Zyklenzahl</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Zyklenzahl</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>
1	94 °C	2 min	1	94 °C	2 min
30	94 °C	1 min	30	94 °C	1 min
	55 °C	60 s		50 °C	30 s
	72 °C	3 min		72 °C	3 min
1	72 °C	7 min	1	72 °C	7 min
1	4 °C	∞	1	4 °C	∞

### De novo-Synthese von PKI über PCR

<u>Zyklenzahl</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>	<u>Zyklenzahl</u>	<u>Temperatur</u>	<u>Zeit</u>
1	94 °C	5 min	1	94 °C	7 min
10	55 °C	36 s	25	55 °C	1 min
	72 °C	2 min		72 °C	2 min
	94 °C	20 min		95 °C	1,5 min
1	72 °C	6 min	1	72 °C	6 min
1	4 °C	∞	1	4 °C	∞

## 6 Abkürzungsverzeichnis

% (v/v)	Volumenprozent
% (w/v)	Gewichtsprozent
8-Br-cAMP	8-Bromoadenosin-3'-5'-Cyclomonophosphat
A	Alanin
Abb.	Abbildung
AKAP	PKA-Ankerprotein (A-kinase anchoring protein)
Asn	Asparagin
Asp	Asparaginsäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine serum albumin)
bzw.	beziehungsweise
C	Katalytische Untereinheit der PKA
C $\alpha$	Katalytische Untereinheit der PKA des Isotyps $\alpha$
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CLSM	Konfokales Laserscanning-Mikroskop
Cy3	Indocarbocyanin
D	Asparaginsäure
Dextran 70S	Dextran mit Molekulargewicht von 70 kDa
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTAF	Dichlorotriazinylamino-Fluoreszein
DTT	1,4-Dithiothreitol
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
ESI-MS	Elektronensprayionisations-Massenspektrometrie
F	Phenylalanin
F <sub>K/C</sub>	Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten in Kern und Cytoplasma auf der Basis der von der Kamera produzierten Grauwerte
FITC	Fluoreszein-Isothiocyanat
FL	5-(6)-Cyrcboxyfluoreszein-N-Hydroxysuccinimidester
G	Glycin
GMG-PNP	5'-Guanylylimidodiphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosintriphosphat
GTP- $\gamma$ -S	Guanosin-5'-0-( $\gamma$ -Thiotriphosphat)
H-8	N-(2-Methylamino)-ethyl-5-isoquinolindulfonamid
H-89	N-[(2)-(p-Bromocinnamylmethylamino)-ethyl]-5-isoquinolindulfonamid
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
IP	Inhibitorpeptid
K	Lysin
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
K <sub>i</sub>	Inhibitorische Konstante
KP	Kontrollpeptid
L	Leucin
LMB	Leptomycin B
LSM	Laserscanning-Mikroskopie (Laser scanning microscopy)
MBP	Maltose-bindendes Protein
MDa	Megadalton
MS	Massenspektrometrie
myr	Myristyliert bzw. Myristylsäure
NES	Kernexportsignal (Nuclear export signal / sequence)
NLS	Kernimportsignal (Nuclear location signal / sequence)

NMT	N-Myristyltransferase
NPC	Kernporenkomplex (Nuclear pore complex)
O.D. <sub>660</sub>	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 660
P	Primer
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Natriumphosphatpuffer
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PKA	cAMP-abhängige Proteinkinase
PKI	Proteinkinase-Inhibitor
PKI(5-24)	Synthetisches Peptid der inhibitorischen Domäne von PKI
Q	Glutamin
R	Arginin
R	Regulatorische Untereinheit der PKA
r	rekombinant
RITC	Rhodamin-B-Isothiocyanat
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
St-Ht-31	AKAP Ht-31 Inhibitorpeptid mit N-terminaler Stearinsäure
STI	Sojabohnen-Trypsininhibitor
SV40	Simianvirus 40
T	Threonin
U	Unit(s)
V	Valin
W	Tryptophan
WGA	Weizenkeimagglutinin
WT	Wildtyp

# Danksagung

Herrn Dr. Dirk Bossemeyer danke ich für die Betreuung dieser Arbeit, die unermüdliche Diskussionsbereitschaft und die vielen neuen Ideen.

Frau Prof. Dr. Elfriede K. Pistorius danke ich für die Bereitschaft, auch diese Arbeit zu begutachten und sie vor der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld zu vertreten.

Bei Herrn Prof. Dr. Volker Kinzel möchte ich mich für die Möglichkeit, diese Arbeit in der Abteilung für Pathochemie am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg anfertigen zu können, bedanken.

Herrn James Richards danke ich für die Mithilfe bei den nicht immer ganz unproblematischen Zellkulturarbeiten.

Herrn Norbert König sei für die Hilfe im Labor und am Computer gedankt.

Herrn Thorsten Schneider und Herrn Frank Gesellchen möchte ich für die immerwährende Diskussionsbereitschaft, die kollegiale Hilfe und das gemeinsame Durchhalten danken.

Allen Mitgliedern der Pathochemie (auch den ehemaligen) und der Zentralen Spektroskopie möchte ich für die angenehme Zusammenarbeit danken.

Herrn Dr. Rainer Pepperkok möchte ich für die Einführung in die Methode der Mikroinjektion danken.

Frau Katharina Ribbeck gilt mein besonderer herzlicher Dank, für die tatkräftige Hilfe bei der Durchführung der Import-Kinetiken, die Bereitstellung von Materialien, die vielen Diskussionen und die Aufmunterungen.

Herrn Dr. Dirk Görlich und Herrn Dr. F. Ralf Bischoff möchte ich für die wertvollen Anregungen und die Bereitstellung von Materialien meinen Dank aussprechen.

Herrn Roger Fischer und Herrn Prof. Dr. Michael Trendelenburg gilt mein großer Dank für die Möglichkeit, die Mikroinjektionsapparatur zu nutzen, und für die vielen Ratschläge.

Der Abteilung von Herrn Dr. Peter Lichter und seinen Mitarbeitern sei für die Möglichkeit der Nutzung der Mikroskope und die freundliche Hilfe gedankt.

Meiner Familie und Ingo Lehrke danke ich für ihre allgegenwärtige Unterstützung.

# Lebenslauf

## Angaben zur Person:

Name: Anna Lisa Picciolo  
Geburtstag: 3. Dezember 1971  
Geburtsort: Bielefeld  
Eltern: Marianne Picciolo, geb. Graul  
Dr. Paolo Picciolo

## Bildungsweg:

1978-1982 Grundschole Lenzinghausen der Stadt Spenge

1982-1991 Gymnasium Marienschule der Ursulinen in Bielefeld  
Abitur

1991-1997 Studium der Biologie an der Universität Bielefeld

1994-1995 Auslandsstudienjahr an der University of Aberdeen, Schottland  
Diplom

1997-2000 Bearbeitung der vorliegenden Dissertation in der Abteilung für Pathochemie am Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg unter der Leitung von Prof. Dr. Volker Kinzel