Universität Ulm

Abteilung Innere Medizin I

Leiter: Prof. Dr. G. Adler

Charakterisierung der regulatorischen Domäne der Proteinkinase D2

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie (Dr. biol. hum.)

der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Alexandra Melanie Auer

aus Passau

2006

Amtierender Dekan:	Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. Thomas Seufferlein
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Michael Kühl
Tag der Promotion:	19. Mai 2006

INHALTSVERZEICHNIS I

ABKÜRZUNGEN IV

1 EINLEITUNG 1
1.1 Intrazelluläre Signalweiterleitung mittels sekundärer Botenstoffe 1
1.1.1 Diacylglycerol als Signalmediator 1
1.1.2 Zielproteine von DAG 3
1.2 Serin-Threonin-Proteinkinasen 3
1.3 PKC-Familie 4
1.3.1 Struktureller Aufbau der PKC 5
1.3.2 Aktivierung der PKCs 5
1.4 Proteinkinase D-Famile 6
1.4.1 Struktureller Aufbau der PKDs 6
1.4.1.1 Cysteinreiche Zinkfingerdomänen in PKD1 9
1.4.1.2 Pleckstrin-Homologiedomäne in PKD1 9
1.4.2 Mechanismen der PKD1-Aktivierung 10
1.4.3 Substrate von PKD1 10
1.4.4 Subzelluläre Lokalisation von PKD1 11
1.4.5 Biologische Funktionen von PKD1 12
1.5 Proteinkinase D2 14
1.6 Regulation des zytoplasmatischen Proteintransports 15
1.6.1 Funktion der Importine und Exportine 16
1.6.2 Sequenzmotive des Imports und Exports 17
1.7 Zielsetzung 18

2 MATERIAL UND METHODEN 19
2.1 Material 19
2.1.1 Chemikalien und Radioaktivität 19
2.1.2 Antiseren und monoklonale Antikörper 19
2.1.3 Zellbiologie 20
2.1.4 Molekularbiologie 20
2.1.4.1 Enzyme und Kits 20
2.1.4.2 Primer für cDNA-Konstrukte 21
2.1.4.3 Plasmide 22

2.1.5	Computerprogramme	22
2.2	**Molekularbiologische Methoden**	**23**
2.2.1	Agarosegelelektrophorese	23
2.2.2	Herstellung RbCl kompetenter E.coli	23
2.2.3	Transformation	24
2.2.4	Plasmid-(DNA-)Isolierung	24
2.2.5	Klonierung von cDNA-Konstrukten	25
2.2.5.1	Restriktionsspaltung	25
2.2.5.2	Dephosphorylierung	25
2.2.5.3	Ligation	25
2.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
2.2.6.1	Klonierung von 5’ EGFP-Tag Konstrukten	27
2.2.6.2	Einführung von Punktmutationen in die PKD2-Sequenz	28
2.2.6.3	Deletionsmutationen in der PKD2-Sequenz	28
2.3	**Proteinbiochemische Methoden**	**29**
2.3.1	Gesamtzelllysate	29
2.3.2	Immunpräzipitation von PKD2	29
2.3.3	Western Blot	30
2.3.4	Transfektion von HEK293 und AGS-B Zellen	30
2.3.5	Aktivierung von PKD2	32
2.3.6	Blockade des nukleären Exports von PKD2	32
2.3.7	Fixierung der Zellen	32
2.3.8	*In vitro*-Kinaseassay	32
2.3.9	Bindung von Phorbolester	33
2.4	**Bildgebende Methoden**	**33**
2.4.1	Time Lapse-Mikroskopie	33
2.4.2	Konfokale Lasermikroskopie	34
3	**ERGEBNISSE**	**35**
3.1	**Rolle der regulatorischen Domäne bei der Bindung von Lipiden am Beispiel des Phorbolesters PDBu**	**35**
3.1.1	Rolle der cysteinreichen Zinkfingerdomänen für die Phorbolester-/Lipidbindung	36
3.1.2	Rolle der Pleckstrin-Homologiedomäne für die Phorbolester-/Lipidbindung	37

3.2 Bedeutung distinkter Domänen für die subzelluläre Lokalisation von PKD2 38
3.2.1 Kontinuierlicher Austausch von PKD2 zwischen Zytoplasma und Zellkern 39
3.2.2 Einfluss der Zinkfingerdomänen auf die Lokalisation von PKD2 41
3.2.2.1 Funktion der C1a-Domäne bei der Lokalisation 42
3.2.2.2 Ein nukleäres Exportsignal in der C1a-Domäne 44
3.2.2.3 NLS im Linker zwischen C1a- und C1b-Domäne 45
3.2.2.4 Funktion der C1b-Domäne bei der Lokalisation 46
3.2.3 Einfluss der Pleckstrin-Homologiedomäne auf die Lokalisation von PKD2 48
3.2.4 Einfluss der Kinasedomäne auf die Lokalisation von PKD2 49
3.2.5 Zusammenfassung: Einfluss der regulatorischen Domäne auf die subzelluläre Lokalisation von PKD2 50
3.3 Bedeutung distinkter Domänen für die katalytische Aktivität von PKD2 51
3.3.1 Einfluss der Zinkfingerdomänen auf die Aktivität von PKD2 51
3.3.2 Rolle der Pleckstrin-Homologiedomäne bei der Aktivierung von PKD2 54
3.3.3 Aktivität-bestimmende Aminosäuren in der Kinasedomäne von PKD2 54
3.4 Einfluss der katalytischen Aktivität auf die subzelluläre Lokalisation von PKD2 57

4 DISKUSSION 35

5 ZUSAMMENFASSUNG 69

6 LITERATURVERZEICHNIS 71

DANKSAGUNG

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ad	auffüllen auf
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzylsulfonylfluorid
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäure
ATCC	*american type culture collection*
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca^{2+}	Calcium
CAMK	Ca^{2+}/Calmodulin-abhängige Kinase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCK_B	$Cholecystokinin_B$
CDK	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	mRNA komplementäre DNA
CK	Casein Kinase
CRD	cysteinreiche Domäne
CTP	Cytidintriphosphat
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modified Eagles medium
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	desoxy ATP/CTP/GTP/TTP
DTT	Dithiothreitol
ECL	*enhanced chemiluminescence*
EDTA	Ethylendiamin-*N, N, N´, N´*- tetraessigsäure
FCS	Fötales Kälberserum

G	Guanin
g	Gramm
$G\alpha_q$	G-Protein-Unterheit α_q
GDP	Guanosindiphosphat
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
GSK	Glycogen Synthasekinase
GTP	Guanosintriphosphat
HDAC	Histondeacetylase
IgG	Immunglobulin
IP_3	Inositoltriphosphat
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LMB	Leptomycin B
LPA	Lysophosphatidsäure
M	molar
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinase
MDa	Megadalton
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mM	millimolar
mRNA	*messenger RNA*
NES	nukleäre Exportsequenz
NLS	nukleäre Lokalisationssequenz
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
nM	nanomolar
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDBu	Phorbol-12,13-dibutyrat
PE	Phorbolester

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PH	Pleckstrin-Homologie-Domäne
PIP_2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphat
PKA	Protein Kinase A
PKB	Protein Kinase B
PKC	Protein Kinase C
PKD	Protein Kinase D
PLC	Phospholipase C
PS	Phosphatidyl-L-serin
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s.o.	siehe oben
sdm	*site directed mutagenesis*
SDS-PAGE	*Sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis*
Ser	Serin
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
U	Enzymeinheit
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
v/v	Volumen pro Volumeneinheit
w/v	Gewicht pro Volumeneinheit
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Nahezu allen Signalkaskaden in eukaryontischen Zellen liegt das Prinzip der Proteinphosphorylierung zu Grunde. Dabei bestimmt die Aktivität von Proteinkinasen und Phosphatasen über die Phosphorylierungszustände von Proteinen und damit auch über zelluläre Prozesse wie Apoptose, Proliferation, Differenzierung und Migration. Nach Erkenntnissen von Manning *et al.* sind im menschlichen Genom 518 putative Proteinkinasen kodiert (Manning *et al.*, 2002), Strukturell unterscheidet man innerhalb einer Proteinkinase eine katalytische und eine regulatorische Domäne. Die Sequenz der katalytischen Domäne legt die Phosphorylierungsaktivität und Substratspezifität der Kinase fest, wohingegen die regulatorische Domäne die Aktivierung der Proteinkinase über die Bindung anderer Proteine bzw. über die Bindung spezifischer sekundärer Botenstoffe („second messenger“) kontrolliert.

1.1 Intrazelluläre Signalweiterleitung mittels sekundärer Botenstoffe

Sekundäre Botenstoffe leiten extrazellulär an der Zelle ankommende Signale ins Zellinnere weiter. Diese niedermolekularen Botenstoffe können von der Zelle in großen Mengen rasch ortsspezifisch gebildet und auch wieder abgebaut und dadurch inaktiviert werden. Sie dienen so als zeitlich und örtlich begrenzte Effektoren, die die Aktivität nachgeschalteter Proteine regulieren. Die sekundären Botenstoffe werden in folgende zwei Gruppen unterteilt: Die hydrophilen Botenstoffe, wie cAMP, Ca^{2+} und Inosit-Phosphate, sind im Zytosol lokalisiert und erreichen von dort aus ihre Proteinsubstrate. Die hydrophoben Botenstoffe sind dagegen in der Membran verankert und regulieren dort die Aktivität ihrer membranassoziierten Effektorproteine. Mitglieder dieser membranverankerten Botenstoffe sind z.B. Phosphatidyl-Inosit-Phosphate, Ceramide, Lysophosphatidsäure (LPA) und Diacylglycerol (DAG) (Liscovitch und Cantley, 1994).

1.1.1 Diacylglycerol als Signalmediator

Für die lipidabhängige Synthese von Diacylglycerol bedarf es der Bindung eines Signalmoleküls (z.B. Vasopressin, Thrombin, Antigen, Gastrin) an den

korrespondierenden G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR) in der Plasmamembran. Wird ein GPCR aktiviert, so stimuliert er die G-Protein-Untereinheit $G\alpha_q$, die die Phosphoinositid-spezifische Phospholipase C-β (PLC-β) aktiviert (Taylor *et al.*, 1991). Die aktivierte PLC-β katalysiert die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-Biphosphat (PIP_2), wodurch die zwei sekundären Botenstoffe Inositol-1,4,5-triphosphat und Diacylglycerol entstehen. Das hydrophile Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) diffundiert in das Zytosol und setzt dort durch Bindung an IP_3-Rezeptoren Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum frei. Das hydrophobe Diacylglycerol (DAG) verbleibt in der Membran und beeinflußt mittels Bindung von Effektorproteinen deren Aktivität (Brose *et al.*, 2004; Abb. 1). Die Hydrolyse von PIP_2 zu IP_3 und DAG kann auch G-Protein-unabhängig z.B. über Rezeptor-Tyrosinkinasen und PLC-γ erfolgen. Die regulatorisch wichtige Funktion von DAG ist die Bindung an cysteinreiche Aminosäuresequenzen, sogenannte C1-Domänen, in Proteinen, die sich über diese Domäne an Membranen anlagern und dort für weitere Modifikationsschritte zur Verfügung stehen.

Moleküle, die die Wirkung von DAG in der Zelle nachahmen, sind synthetische Phorbolester (PE). Sie wirken als potente Tumorpromotoren, die eine Vielzahl von physiologischen Veränderungen in Geweben verursachen. Wird zum Beispiel die Haut von Mäusen wiederholt mit Phorbolester behandelt, kommt es zur Bildung von Tumoren an den behandelten Stellen (Slaga *et al.*, 1989). Phorbolester binden wie DAG an die C1-Domänen von Proteinen, wirken in der Zelle aber unmittelbar und länger, da sie durch ihre Membranpermeabilität ungehindert über die Plasmamembran ins Zytosol diffundieren können und dort langsamer als DAG abgebaut werden.

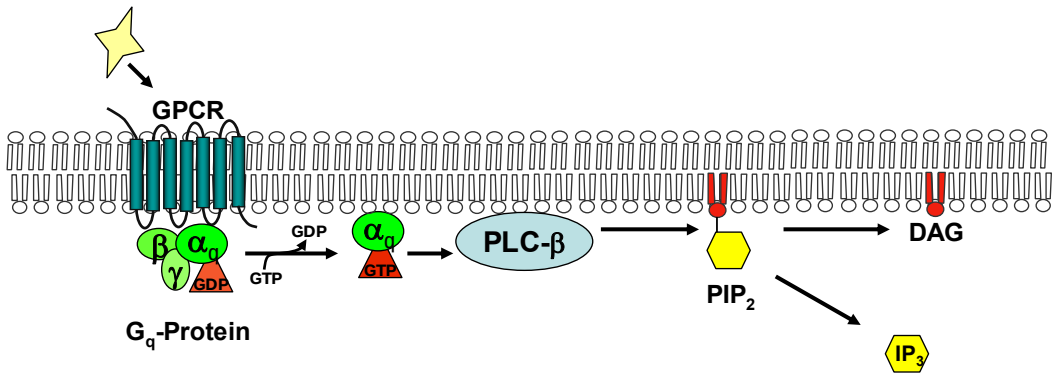

Abb. 1: Inositol-Phospholipid-Weg über einen G-Protein gekoppelten Rezeptor (GPCR). Ein Ligand bindet an den GPCR. Daraufhin vermittelt der aktivierte Rezeptor den Austausch von GDP zu GTP am $G\alpha_q$-Protein. Das aktivierte $G\alpha_q$-Protein stimuliert die Phospholipase C-β (PLC-β), die wiederum Phosphoinositol-1,4-bisphosphat (PIP_2) zu Inositol-1,4,5-triphosphat (IP_3) und Diacylglycerol (DAG) hydrolysiert.

1.1.2 Zielproteine von DAG

Die DAG-bindenden C1-Domänen können in einer einzelnen Kopie oder auch als Duplex in Proteinen vertreten sein. Die Proteinfamilien der Ras-GRPs (Lorenzo *et al.*, 2000), der Chimaerine (Areces *et al.*, 1994) und Munc13 (Kazanietz *et al.*, 1995) enthalten jeweils eine Kopie der C1-Domäne. Einige Proteinkinasen besitzen dahingegen zwei Kopien der C1-Domäne. Zu dieser Gruppe gehören die Diacylglycerol-Kinasen (Shindo *et al.*, 2003), die Familien der klassischen und der neuen Proteinkinasen C (Kazanietz *et al.*, 2002) und die Familie der Proteinkinasen D (Johannes *et al.*, 1994; Valverde *et al.*, 1994; Sturany *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 1999). Die Isoformen der Proteinkinase C-Familie wurden als erste der C1-enthaltenden Proteine als DAG-Rezeptoren charakterisiert. Nishizuka's Arbeitsgruppe brachte erstmals 1980 die Aktivierung der PKC-Familie mit Diacylglycerol in Verbindung (Kishimoto *et al.*, 1980). Kurz darauf wurde gezeigt, dass die Phorbolester die Aktivierung von Proteinkinase C durch DAG *in vitro* und *in vivo* nachahmen können (Castagna *et al.*, 1982).

1.2 Serin-Threonin-Proteinkinasen

Die Proteinkinasen werden auf Grund ihrer Substratspezifität in Serin-Threonin-Kinasen und Tyrosin-Kinasen unterteilt. Die Serin-Threonin-Proteinkinasen werden basierend auf der Sequenzhomologie ihrer katalytischen Domäne in die AGC-Gruppe (Proteinkinasen A, G und C), die CAMK-Gruppe („Ca^{2+}/calmodulin dependent kinases") und die CMGC-Gruppe („Cyclin dependent kinases", MAPKs, GSK3 und CK II) eingeteilt (Manning *et al.*, 2002). In Serin-Threonin-Proteinkinasen umfaßt die Kinasedomäne 250 bis 300 Aminosäuren und enthält hochkonservierte Sequenzen, die über die Bindung und Orientierung von ATP und Substrat bestimmen und damit für die katalytische Aktivität unentbehrlich sind (Johnson *et al.*, 1998; Abb. 2). Am N-terminalen Ende der katalytischen Domäne liegt ein glycinreicher Abschnitt, der die ATP-Bindung vermittelt und zusammen mit einem benachbarten Lysin (K) die maximale Kinaseaktivität ermöglicht. Im zentralen Teil der katalytischen Domäne befindet sich das invariante Aspartat (D) des HR/CDLKxxN-Motivs in einem Bereich, der als „katalytische Schleife" bezeichnet wird, da es als katalytische Basis angesehen werden kann. Das invariante Asparagin (N) dieses Motivs komplexiert zusammen mit dem

invarianten Aspartat (D) des DFG-Motivs den Kofaktor Magnesium, der für die katalytische Aktivität wichtig ist. Das darauffolgende APE-Motiv ist für die Bindung des Substrats verantwortlich (Schenk und Snaar-Jagalska, 1999).

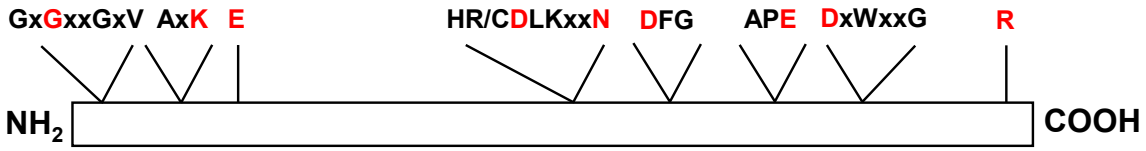

Abb. 2: Kinasedomäne der Serin-Threonin-Proteinkinasen. In den Konsensusmotiven mit den fast immer invarianten Aminosäuren sind die funktionell wichtigsten Aminosäuren rot gekennzeichnet, x steht für eine beliebige Aminosäure (nach Schenk und Snaar-Jagalska, 1999).

1.3 PKC-Familie

Die zur AGC-Gruppe gehörende PKC-Familie wird in drei Unterfamilien unterteilt. Diese unterscheiden sich im Bezug auf ihre Struktur und ihre Aktivierbarkeit durch Lipide und Calcium. Die klassischen PKCs (cPKC) benötigen für ihre Aktivierung Calcium, DAG und Phosphatidylserin und umfassen die Isoformen α, βI, βII und γ. Die neuen PKCs (nPKC) mit ihren Isoformen δ, ε, η und θ sind durch DAG zusammen mit Phosphatidylserin aktivierbar. Die PKC-Isoformen ζ, λ und ι werden in der Familie der atypischen PKCs (aPKC) zusammengefaßt und benötigen für ihre katalytische Aktivität allein Phosphatidylserin (Abb. 3).

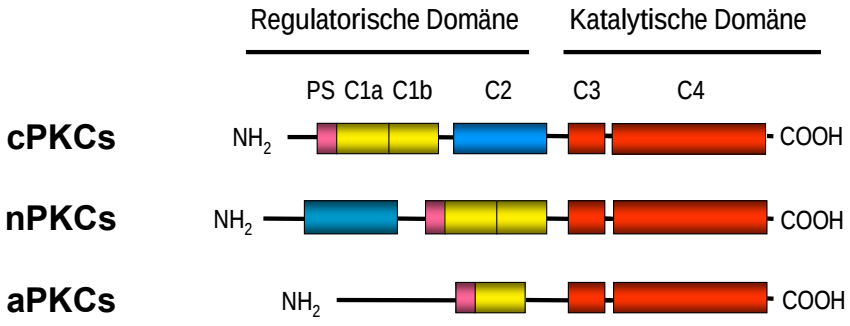

Abb. 3: Schematischer Aufbau der PKC-Familie. Die Proteinkinase C besteht aus einer N-terminal regulatorischen Domäne und einer C-terminalen katalytischen Domäne. Regulatorische Domäne: PS = Pseudosubstratsequenz (pink); C1 = DAG- und Phorbolester-bindende cysteinreiche Domäne, die außer in aPKCs in zwei Kopien (C1a und C1b) vorliegt (gelb); C2 = Lipid- (nPKCs) und Calcium-bindende (cPKCs) cysteinreiche Domäne (blau). Katalytische Domäne: C3 = ATP-bindende Domäne (rot); C4 = Substrat-bindende Domäne (rot) (nach Newton und Johnson, 1998).

1.3.1 Struktureller Aufbau der PKC

Die katalytische Domäne der PKCs befindet sich am C-Terminus und setzt sich aus der C3- und der C4-Domäne zusammen. Die C3-Domäne enthält die Bindungsstelle für ATP. In der C4-Domäne ist die Substratbindungsstelle zu finden. Die Pseudosubstratsequenz in der regulatorischen Domäne kann durch ihre Bindung an diese Substratbindungsstelle der C4-Domäne die katalytische Aktivität von PKC autoinhibitorisch unterbinden (Nishizuka, 1992; Newton, 1995). Die C2-Domäne, die den aPKCs fehlt, bindet in den cPKCs Calcium und in den nPKCs saure Phospholipide. Am N-Terminus der PKCs befinden sich cysteinreiche C1-Domänen, die außer in der Familie der atypischen PKCs in allen PKCs paarweise als C1a- und C1b-Domäne vorhanden sind (Johnson *et al.*, 2000). Allgemein werden cysteinreiche Aminosäuresequenzen in Proteinen als Zinkfingermotive bezeichnet. Die bekannteste Aufgabe von Zinkfingermotiven ist die Bindung an DNA. Andere Zinkfingerdomänen besitzen jedoch anstatt der DNA-Bindung die Fähigkeit, DAG zu binden. Die wichtigsten intrazellulären Bindungspartner von DAG sind die klassischen und neuen PKCs, die unterschiedlich in Zellen und Geweben exprimiert sind (Newton, 1997; Mellor und Parker, 1998).

1.3.2 Aktivierung der PKCs

PKCs werden durch die hydrophoben Kofaktoren Phosphatidylserin und DAG bzw. Phorbolester an Membranen gebunden und aktiviert. Dabei wird die autoinhibitorische Wechselwirkung der Pseudosubstratdomäne mit der Substratbindungsstelle in der C4-Domäne aufgehoben, wodurch für PKC die Bindung eines Substratproteins möglich wird. Da PKCs eine zentrale Rolle in der Proliferation und Differenzierung von Zellen einnehmen, kann ihre unkontrollierte Aktivierung zu unerwünschten Substratphosphorylierungen und somit zu Fehlregulationen der Zellproliferation führen. Zum Beispiel führt die Überexpression von PKCε in Rattenepithelzellen zu einer Transformation der Zellen (Perleti *et al.*, 1996). Des Weiteren bilden mit PKCε transfizierte NIH3T3-Fibroblasten, wenn sie in Gewebe immunsupprimierter Mäuse injiziert werden, an diesen Stellen Tumore aus (Mischak *et al.*, 1993).

Zu den Substraten von PKCs zählen Proteine des Zytoskeletts (Vinculin, Talin, Vimentin), der Membranen (MARCKS, EGFR) und des Kerns (Nucleolin) (Ivaska *et. al*., 2005; Parker und Murray-Rust, 2004). Proteinkinasen können auch andere Proteinkinasen phosphorylieren und aktivieren, wodurch sie die Weiterleitung von Signalen über Phosphorylierungskaskaden gewährleisten. Zu den PKC-Substrat-Kinasen zählen u.a. die Proteinkinase D-Familienmitglieder (Waldron *et al.*, 1999; Brändlin *et al.*, 2002; Sturany *et al.*, 2002).

1.4 Proteinkinase D-Famile

Die Proteinkinase D- (PKD-) Familie der Serin-Threonin-Kinasen umfaßt die PKD1/Proteinkinase Cμ (Johannes *et al.*, 1994; Valverde *et al.*, 1994), PKD2 (Sturany *et al.*, 2001, 2002) und PKD3/Proteinkinase Cν (Hayashi *et al.*, 1999; Abb. 4).

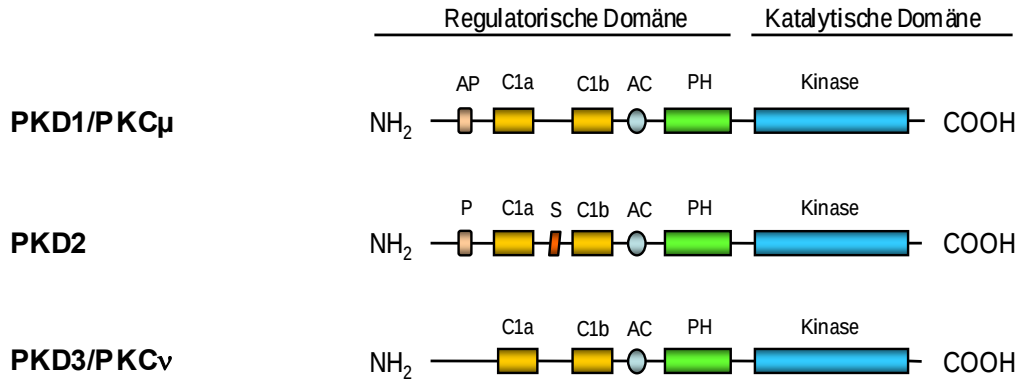

Abb. 4: Domänen-Aufbau der Proteinkinase D-Familie. Abkürzungen: AP = Alanin- und prolinreiche Domäne; P = Prolinreiche Domäne; C1a/C1b = Cysteinreiche Domänen; S = Serinreiche Domäne; AC = Azide Domäne; PH = Pleckstrin-Homologie-Domäne; Kinase = Katalytische Domäne (nach Van Lint *et al.*, 2002).

1.4.1 Struktureller Aufbau der PKDs

Anfangs wurden die PKDs der Familie der atypischen PKCs und damit der AGC-Gruppe von Proteinkinasen zugeschrieben (Johannes *et al.*, 1994; Hanks, 2003), da sie wie diese durch Phosphatidylserin und Diacylglycerol reguliert werden können (Newton, 1997; Mellor und Parker, 1998). Strukturell gesehen unterscheiden sie sich jedoch von den aPKCs, da ihnen zum einen die Pseudosubstratdomäne fehlt und außerdem in ihrer N-terminalen regulatorischen

Domäne auf die Zinkfingerdomäne eine zusätzliche Pleckstrin-Homologie-(PH-) Domäne folgt.

Die Struktur der Isoenzyme PKD1 und PKD2 beginnt mit einer apolaren Region, die reich an Alaninresten und/oder an Prolinresten ist. In PKD3 fehlt diese hydrophobe Region. Alle drei Isoformen enthalten zwei cysteinreiche C1-Domänen, C1a und C1b, auf die eine Region folgt, die reich an negativ geladenen Aminosäuren ist (Rykx *et al.*, 2003). Da sich auch die C-terminale katalytische Domäne der PKDs erheblich von der katalytischen Domäne der PKC-Familie unterscheidet und die höchste Sequenzhomologie mit der Myosin Light Chain Kinase von Dictyostelium und mit den Ca^{2+}/Calmodulin-abhängigen Kinasen (CAMKs) aufweist (Valverde *et al.*, 1994; Sturany *et al.*, 2001), bilden die PKDs in der CAMK-Familie eine eigene neue Gruppe von DAG-bindenden Serin-Threonin-Kinasen (Manning *et al.*, 2002).

Die Mitglieder der PKD-Famile weisen untereinander, besonders in ihrer katalytischen Domäne, einen hohen Grad an Homologie auf (Abb. 5).

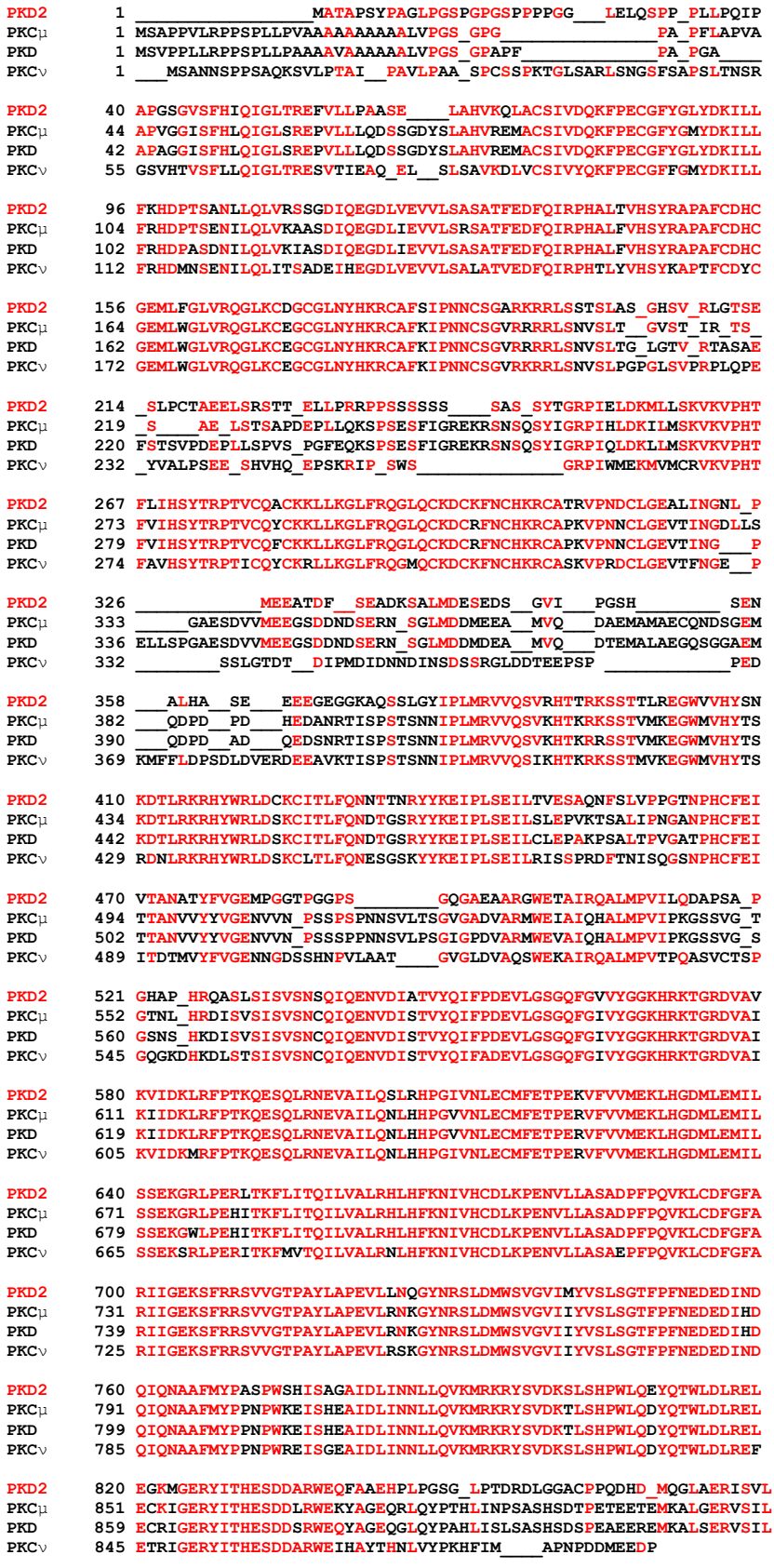

Abb. 5: Vergleich der Aminosäuresequenzen der PKD-Familien-Mitglieder. Die Aminosäuresequenz von humanem PKD2 wurde mit humanem PKCμ, murinem PKD und humanem PKCν verglichen. Zu PKD2 identische Aminosäuren sind rot markiert. PKD2 umfaßt die beiden cysteinreichen Domänen (AS 139-188 und AS 265-314), die Pleckstrin-Homologie Domäne (AS 398-511) und die Kinasedomäne (AS 551-807).

Im Hinblick auf die Expressionsmuster der drei hoch homologen PKD-Isoformen in verschiedenen Geweben wird deutlich, dass es Verteilungsunterschiede der PKDs gibt (Valverde *et al*., 1994; Sturany *et al*., 2001; Hayashi *et al*., 1999). Ob diese Unterschiede nur in der gewebsspezifischen transkriptionellen Regulation oder auch in der Funktion der einzelnen PKD-Isoformen zu tragen kommen, ist bisher unklar.
Von den drei Mitgliedern der PKD-Familie ist bislang die PKD1, die als erste der Isoformen kloniert wurde, die am besten charakterisierte Kinase.

1.4.1.1 Cysteinreiche Zinkfingerdomänen in PKD1

N-terminal enthält PKD1 in ihrer regulatorischen Domäne zwei Kopien der cysteinreichen C1-Domäne, die durch einen ca. 70 Aminosäuren umfassenden „Linker“ getrennt werden. Diese C1-Domänen, C1a und C1b, binden in PKD1 mit hoher Affinität Phorbolester (Valverde *et al.*, 1994; Van Lint *et al.*, 1995; Wang *et al.*, 2003; Rykx *et al.*, 2003), wobei die C1b-Domäne den Großteil der Phorbolesterbindung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* übernimmt (Iglesias *et al.*, 1998a). Werden die C1-Domänen in PKD1 deletiert, führt das zur maximalen Aktivierung der Kinase. Somit kommt den C1-Domänen eine reprimierende Wirkung auf die katalytische Aktivität von PKD1 zu (Iglesias und Rozengurt, 1999).

1.4.1.2 Pleckstrin-Homologiedomäne in PKD1

Auf die Zinkfingerdomänen folgt in den PKDs eine Pleckstrin Homologie (PH)-Domäne (Iglesias *et al.*, 1998b; Sturany *et al.*, 2001; Hayashi *et al.*, 1999), die aus ca. 100 Aminosäuren besteht und nach Pleckstrin, dem Hauptsubstrat der Proteinkinase C in Thrombozyten benannt ist (Musacchio *et al.*, 1993). Die PH-Domäne kommt in Signalproteinen wie Serin-Threonin-Proteinkinasen, Guanin-Nukleotid-Austauschfaktoren, PLCs und Zytoskelettproteinen vor (Lemmon und Ferguson, 2000). In diesen Proteinen vermittelt die PH-Domäne Protein-Protein- sowie Protein-Lipid-Interaktionen (Cozier *et al.*, 2004). Zum Beispiel bindet die PLC-γ über ihre PH-Domäne an das Membranphospholipid PIP_2 (Falasca *et al.*, 1998).
Die PH-Domäne von PKD1 kann sowohl mit der β/γ-Untereinheit von Guanin-Nukleotid-bindenden Proteinen (Jamora *et al.*, 1999), als auch mit PKCη und

PKCε interagieren (Waldron *et al.*, 1999). PH-Domänen besitzen in einigen Proteinkinasen eine autoregulatorische Funktion. So sind z.B. PKD1-Mutanten mit Deletionen oder einzelnen Aminosäuresubstitutionen in der PH-Domäne maximal katalytisch aktiv (Iglesias und Rozengurt, 1998; Waldron *et al.*, 1999). Dies zeigt, dass die PH-Domäne wie die C1-Domänen durch ihre negativ-regulatorischen Eigenschaften dafür verantwortlich sind, PKD1 in einem katalytisch inaktiven Zustand zu halten.

1.4.2 Mechanismen der PKD1-Aktivierung

Ein wichtiger Aspekt für die Regulation von Proteinkinasen ist die Phosphorylierung von aktivierenden Aminosäuren in der katalytischen Schleife der Kinasedomäne (Johnson *et al.*, 1998; Taylor *et al.*, 2005). Die katalytische Schleife stellt in der PKD-Familie eine hochkonservierte Region dar. Dort befinden sich zwei Serine, in muriner PKD1 an den Positionen 744 und 748 (Iglesias *et al.*, 1998c), die von aktivierten PKCs transphosphoryliert werden, was zur Aktivierung der Kinase führt (Zugaza *et al.*, 1996; Waldron *et al.*, 1999; Brandlin *et al.*, 2002). Außerdem kommt es dabei auch zu einer C-terminalen Autophosphorylierung der der PKD1 am Serin 916 (Matthews *et al.*, 1999).
In B- und T-Lymphozyten führt eine Rezeptoraktivierung zur Aktivierung von PKD1 (Matthews *et al.*, 2000). Des Weiteren kann PKD1 über die Interaktion ihrer PH-Domäne mit der β/γ-Untereinheit heterotrimerer G-Proteine direkt aktiviert werden (Jamora *et al.*, 1999). Außerdem kommte es in Leukämiezellen zur PKD1-Aktivierung, wenn in diesen Zellen durch genotoxische Reagenzien Apoptose induziert wird, wie es bei einer Chemotherapie der Fall sein könnte. Dabei wird PKD1 von aktiver Caspase-3 zwischen regulatorischer Domäne und Kinasedomäne gespalten. Die abgespaltene Kinasedomäne besitzt per se katalytische Aktivität (Endo *et al.*, 2000).

1.4.3 Substrate von PKD1

Als erstes *in vivo*-Substrat von PKD1 wurde das integrale Membranprotein Kidins220 („Kinase D interacting substrate of 220 kDa“) beschrieben, das selektiv in den Nervenendigungen neuroendokriner Zellen exprimiert ist und von aktiver PKD1 phosphoryliert wird (Iglesias *et al.*, 2000). Aktive PKD1 kann auch c-Jun

phosphorylieren, bildet mit JNK („c-Jun N-terminal kinase“) einen Komplex aus und hemmt den JNK-Signalweg (Hurd *et al.*, 2002). Ist PKD1 an der Plasmamembran lokalisiert, kann es dort das Ras-Effektorprotein RIN1 phosphorylieren, das daraufhin den Komplex mit Ras verläßt und an 14-3-3 Proteine bindet. Das freigesetzte Ras interagiert mit Raf und aktiviert somit die Raf-Signalkaskade (Wang *et al.*, 2002). Des Weiteren wird humane PKD1 durch oxidativen Stress über Scr und Abl in der PH-Domäne am Tyrosin 463 phosphoryliert. Gleichzeitig aktiviert oxidativer Stress PKCs, die wiederum humane PKD1 aktivieren, indem sie es in der katalytischen Schleife an Serin 738 und Serin 742 phosphorylieren. Aktive PKD1 kann IKKβ aktivieren und führt so letztendlich zur Aktivierung von NFκB (Storz und Toker, 2003). In Herzmuskelzellen ist das Zytoskelettprotein Troponin I ein Substrat von PKD1, wobei PKD1 eine regulatorische Rolle in der Funktion der Myofilamente zugesprochen wird (Haworth *et al.*, 2004). Aktive PKD1 phosphoryliert in Herzmuskelzellen die Histondeacetylase 5 (HDAC5), ein Enzym, das im Kern Chromatinmodifikationen induziert und kardiale Hypertrophie supprimiert. Diese Suppression wird durch die PKD1-abhängige HDAC5-Phosphorylierung neutralisiert, da phosphoryliertes HDAC5 aus dem Kern exportiert wird (Vega *et al.*, 2004).

1.4.4 Subzelluläre Lokalisation von PKD1

In unstimulierten Zellen befindet sich PKD1 im Zytoplasma und in einem geringeren Ausmass auch im Golgi und den Mitochondrien (Matthews et al, 2000a; Rey und Rozengurt, 2001; Rey *et al.*, 2001a; Liljedahl *et al.*, 2001; Hauser *et al.*, 2002). Bei einer Rezeptoraktivierung transloziert PKD1 vom Zytosol an die Plasmamembran, wo das C1b-Motiv die Bindung an das membrangebundene DAG vermittelt (Rey *et al.*, 2003). Für eine Translokation von der Plasmamembran zurück ins Zytosol, benötigt PKD1 die PKC-abhängige Phosphorylierung der Serine 744 und 748 in der katalytischen Schleife (Rey *et al.*, 2001b). Phosphorylierte PKD1 wird dann über seine C1b-Domäne in den Kern importiert, wo es vorübergehend akkumuliert bevor es durch einen CRM1-abhängigen nukleären Export, für den die PH-Domäne von PKD1 nötig ist, wieder ins Zytosol exportiert wird (Rey *et al.*, 2001a). Die Aktivierung von PKD1 in B-Zellen und Mastzellen über deren Antigenrezeptor verläuft ebenfalls über eine schnelle

Translokation von PKD1 vom Zytosol zur Plasmamembran, jedoch folgt darauf keine Kernlokalisation der aktivierten PKD1 (Matthews *et al.*, 2000). Diese unterschiedlichen Beobachtungen zeigen, dass zusätzlich zur strukturellen Integrität von PKD1 auch andere Faktoren wie Zellkontext, Stimulus und Adaptorproteine die intrazelluläre Verteilung von PKD1 beeinflussen. In diesem Zusammenhang ist das Protein Kinase A Anker Protein (AKAP-lbc) interessant, das als Adaptorprotein einen Multiproteinkomlex mit PKD1, PKCη und PKA ausbildet. Die Lokalisation von AKAP bestimmt die gleichzeitige und gemeinsame Lokalisation seiner gebundenen Proteine in der Zelle (Hoshi *et al.*, 2005). Außerdem stellt AKAP eine Plattform dar, auf der Phosphorylierungsereignisse von PKA und PKC stattfinden, die zur Aktivierung der ebenfalls gebundenen PKD1 führen (Carnegie *et al.*, 2004).

1.4.5 Biologische Funktionen von PKD1

Die biologischen Rollen von PKD1 sind durch ihre katalytische Aktivität und ihre subzelluläre Lokalisation bestimmt, die von ihrer regulatorischen Domäne moduliert werden (Iglesias und Rozengurt, 1999; Oancea *et al.*, 2003).

PKD1 wurde in verschiedenen Zelllinien im Golgi-Apparat nachgewiesen (Prestle *et al.*, 1996). Über ihre C1a-Domäne wird PKD1 von DAG an das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) rekrutiert (Maeda *et al.*, 2001), um dort über ihre katalytische Aktivität die Abschnürung und den Transport beladener Vesikel zu regulieren (Baron und Malhotra, 2002; Lilijedahl *et al.*, 2001). In epithelialen MDCK („Madin-Darby canine kidney“)-Zellen ist aktive PKD1 am Golgi für die basolaterale Proteinsekretion nötig (Yeaman *et al.*, 2004). Zusätzlich reguliert PKD1 den vesikulären Transport zur Plasmamembran, indem sie am Golgikomplex die für die Struktur und Funktion des Golgikomplexes maßgebliche Phosphatidylinositol-4-kinase IIIβ phosphoryliert und aktiviert (Hausser *et al.*, 2005). Der PKD1-abhängige Vesikeltransport an die Plasmamembran gewährleistet auch den Nachschub von Strukturproteinen und Enzymen in die „leading edges“ motiler Zellen und unterstützt so die gerichtete Motilität der Zelle. Inhibiert man PKD1 in 3T3-Fibroblasten, kommt die gerichtete Zellmotilität zum Erliegen (Pringozhina und Waterman-Storer, 2004).

Für die Invasion und die Metastasierung müssen Krebszellen Invadopodien ausbilden und eine gerichtete Bewegung vollziehen können. In den Invadopodien

solcher invasiven Zellen bildet PKD1 einen Komplex mit Cortactin, einem aktinbindenden Protein, und Paxillin aus, einem fokalen Adhäsionsprotein (Bowden *et al.*, 1999). Außerdem fördert PKD1 die Regeneration und den Transport von αvβ3-Integrin an neugebildete „Focal Adhesions“ in NIH3T3-Zellen und beeinflusst so die Zellmigration (Woods *et al.*, 2004). Wird in Prostatakarzinomzellen die PKD1-abhängige Phosphorylierung von E-Cadherin inhibiert, kommt es zur Destabilisierung des Cadherin-Catenin-Komplexes und die Karzinomzellen gewinnen an Motilität. Diese Vorgänge könnten zur Metastasenbildung bei Prostatakarzinomen beitragen (Jaggi *et al.*, 2003, 2005).

PKD1 steuert in Zellen auch die Empfindlichkeit gegenüber der Apoptose. Bei einer Behandlung mit dem Apoptose-auslösenden Tumor Nekrose Faktor α (TNFα) kann die Überexpression von PKD1 apoptotische Effekte der Zelle hemmen (Johannes *et al.*, 1998). Durch oxidativen Stress wird PKD1 über Src und Abl in der PH-Domäne und über PKC in der katalytischen Schleife phosphoryliert und vermittelt in diesem aktivierten Zustand die Aktivierung von NFκB und damit die Resistenz gegen Apoptose in den Zellen (Storz und Toker, 2003). Eine Apoptose-bedingte Spaltung von PKD1 zwischen der regulatorischen Domäne und der Kinasedomäne durch Caspase-3 dahingegen sensibilisiert die Zellen für Apoptose (Endo *et al.*, 2000).

In Keratinozyten geht eine erhöhte Expression von PKD1 mit einer erhöhten Proliferation der Zellen einher (Rennecke *et al.*, 1999). Zusätzlich kommt es bei der PKD1-Überexpression in Swiss3T3 Zellen zu vermehrter DNA-Synthese und bei Stimulation mit Vasopression, Bombesin oder Phorbolester zu gesteigerter Zellproliferation (Zhukova *et al.*, 2001). Die PKD1-abhängige Phosphorylierung von HDAC5 vermittelt den Export von HDAC5 aus dem Kern, was eine Hypertrophie in Herzmuskelzellen verursacht (Vega *et al.*, 2004). In T-Zellen wiederum führt die Phosphorylierung von HDAC7 durch PKD1 und der damit verbundene Kernexport zur negativen Selektion der T-Zellen und somit zur Apoptose (Dequiedt *et al.*, 2005).

1.5 Proteinkinase D2

Die Proteinkinase D2 wurde als letzte der drei PKD-Isoformen 2001 in unserem Labor kloniert (Sturany *et al*., 2001). Bislang liegen nur wenige Daten zu diesem Mitglied der PKD-Familie vor.

PKD2 ist ubiquitär exprimiert, wobei ihre Expression in den verschiedenen Zell- und Gewebstypen unterschiedlich hoch ist. So zeigt PKD2 verglichen mit PKD1 ein höheres Expressionsniveau in Pankreaskarzinomzellen und anderen epithelialen Tumorzellen, wohingegen ihre Expression im gesunden Pankreas, in der Niere, in der Leber und in der Plazenta im Vergleich zu PKD1 relativ geringer ausfällt (Johannes *et al*., 1994; Sturany *et al.*, 2001). Damit liegt die Vermutung nahe, dass das Expressionslevel von PKD2 im Gegensatz zu PKD1 in bestimmten Tumoren erhöht ist und PKD2 dadurch eine Vermittlerrolle für tumorspezifische Eigenschaften in der Zelle übernimmt. Außerdem ist PKD2 in rasch proliferierenden Geweben wie der Darmmukosa und den Testis exprimiert, aber auch in Teilen des zentralen Nervensystems (Sturany *et al.*, 2001).

Als physiologischer Aktivator von PKD2 ist das Neuropeptid Gastrin bekannt, das als Ligand des G-Protein gekoppelten CCK_B-Rezeptors an einer Vielzahl biologischer Prozesse im Gastrointestinaltrakt wie Sekretion, Wachstum und Transformation beteiligt ist (Seufferlein *et al*., 1995; Yassin, 1999; Kaufmann *et al*., 1997). Durch die CCK_B-Rezeptoraktivierung wird über den Phosphoinositid-Weg DAG gebildet, das klassische und neue PKCs aktivieren kann. Diese aktivierten Isoformen PKCα, PKCε und PKCη haben ihrerseits die Fähigkeit, PKD2 in der katalytischen Schleife an den Serinen 706 und 710, korrespondierend zu den Serinen 738 und 742 in humaner bzw. 744 und 748 in muriner PKD1, zu phosphorylieren, und vermitteln damit die Aktivierung von PKD2 (Sturany *et al.*, 2002). Für Phorbolester wurde gezeigt, dass sie nicht nur von PKD2 gebunden werden, sondern auch die katalytische Aktivität von PKD2 *in vitro* und *in vivo* stimulieren (Sturany *et al.*, 2001). In Übereinstimmung mit Daten, die zeigen, dass in PKD1 das Serin 916 eine Autophosphorylierungsstelle darstellt, die mit dem Aktivitätsstatus der Kinase korreliert (Matthews *et al.*, 1999; Vertommen *et al.*, 2000), wurde in PKD2 das korrespondierende Serin 876 ebenfalls als eine Autophosphorylierungsstelle identifiziert (Sturany *et al.*, 2001; Alessi *et al.*, 1997; Pullen *et al.*, 1998).

Vor kurzem wurde gezeigt, dass bei oxidativem Stress im Gegensatz zu PKD1 die Aktivierung von NFκB durch PKD2 nicht die katalytische Aktivität der Kinase benötigt (Mihailovic *et al.*, 2004). Daher könnte PKD2 weitere, zu den anderen PKD-Isoenzymen unterschiedliche regulatorische Funktionen besitzten. Da die Funktion der meisten Proteinkinasen entscheidend von ihrer Lokalisation innerhalb der Zelle abhängt, könnte die Steuerung der subzellulären Lokalisation von PKD2 in Tumorzellen ihre Funktion in bzw. an den jeweiligen Kompartimenten bestimmen. Zur Lokalisation von PKD2 gibt es unterschiedliche Angaben. Es wurde vorgeschlagen, dass im Gegensatz zu PKD1 und PKD3 die Aktivierung von PKD2 in bestimmten Zellmodellen nicht ihre Translokation in den Kern induziert (Rey *et al.*, 2003). Jedoch konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass PKD2 in Magenkarzinomzellen im Zellkern lokalisiert ist, wenn der nukleäre Export der Zellen pharmakologisch geblockt wird (Schunter, 2005). Dies ist ein erster Hinweis drauf, dass zwischen Zellkern und Zytoplasma ein kontinuierlicher Austausch von PKD2 stattfindet.

1.6 Regulation des zytoplasmatischen Proteintransports

Der Transport von Makromolekülen zwischen dem Kern und dem Zytoplasma regelt in Eukaryonten fundamentale zelluläre Prozesse wie Genexpression und Signaltransduktion. Die Trennung der beiden Kompartimente durch die Zellkernhülle macht es z.B. möglich, den Aufenthalt von Transkriptionsaktivatoren und -repressoren und damit den Ablauf der Transkription zu steuern. Der nukleozytoplasmatische Transport findet über den nukleären Porenkomplex (NPC) statt, der die zwei Lipiddoppelschichten der Kernhülle durchdringt und eine große Anzahl verschieden großer Moleküle transportieren kann (Pante und Kann, 2002). Der NPC funktioniert als hochselektives molekulares Sieb, über das Makromoleküle, die größer als 50 kDa sind, nur über einen aktiven Transport in oder aus dem Kern gelangen (Mattaj und Englmeier, 1998; Görlich und Kutay, 1999; Rout und Aitchison, 2001; Vasu und Forbes, 2001). Die meisten Transportereignisse durch den NPC werden von löslichen Rezeptoren vermittelt, deren größte Gruppe die Familie der Importin β-ähnlichen Transportfaktoren (Importine und Exportine, auch Karyopherine genannt) darstellt.

1.6.1 Funktion der Importine und Exportine

Die Substratbindung und die Freisetzung von Importinen und Exportinen wird über die asymmetrische Verteilung der zwei Aktivitätszustände der kleinen GTPase Ran, den sogenannten RanGTP-Gradienten, reguliert (Mattaj und Englmeier, 1998; Görlich und Kutay, 1999; Macara, 2001; Lei und Silver, 2002; Weis, 2002). Die wichtigste Eigenschaft des RanGTPase-Zyklus ist, dass GTP-Beladung und GTP-Hydrolyse in verschiedenen Kompartimenten stattfinden (Abb. 6). Importine binden ihre Substrate in Abwesenheit von Ran im Zytoplasma und setzen sie im Kern wieder frei, wenn sie dort an RanGTP binden. Das entladene Importin wird dann im Komplex mit RanGTP schnell wieder ins Zytoplasma zurücktransportiert. Exportine hingegen können nur an ihre Fracht binden, wenn RanGTP anwesend ist und assoziieren deshalb mit ihren Substraten ausschließlich im Kern. Nach dem Export ins Zytoplasma löst sich der trimere Exportin/RanGTP/Substrat-Komplex durch RanGTP-Hydrolyse auf und die einzelnen Komponenten sind frei im Zytoplasma verfügbar (Abb. 6).

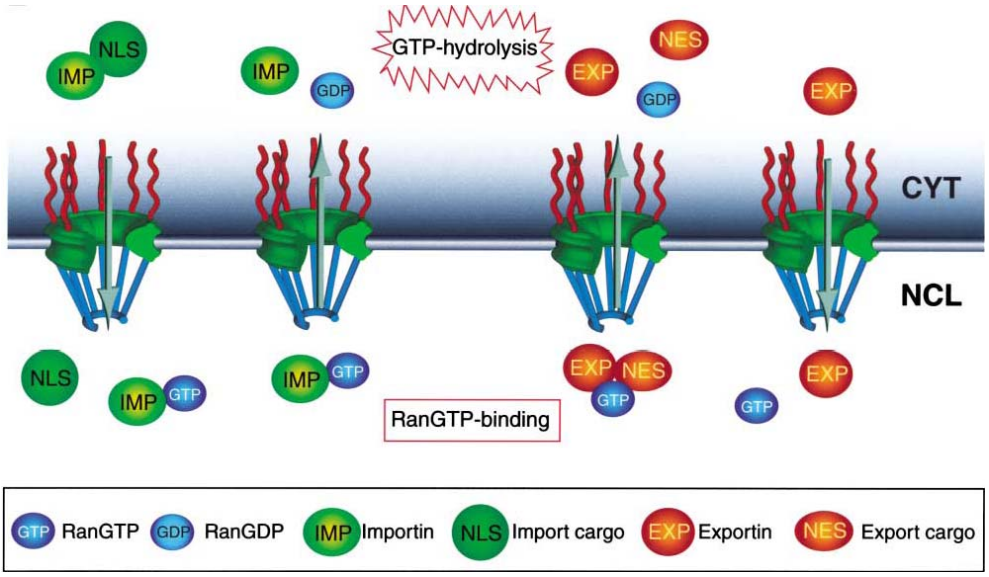

Abb. 6: Regulation des Kernimports und -exports. Über seine NLS wird ein Protein in Interaktion mit Importin durch die nukleäre Pore in den Kern transportiert. Dort löst sich der Komplex bei der Bindung von RanGTP an Importin. Die NES eines Proteins vermittelt im Zellkern einen Komplex mit Exportin und RanGTP, der über die Kernpore ins Zytoplasma translociert. Dort wird das Substrat durch die Hydrolyse von RanGTP zu RanGDP wieder freigegeben (Abbildung wurde aus Weis, 2003 entnommen).

1.6.2 Sequenzmotive des Imports und Exports

Die Interaktion zwischen dem Transportfaktor und dem Substrat wird über kleine Signalsequenzen im Substrat vermittelt. Die am besten untersuchten Signale für die Interaktion mit Importin sind die lysin-/argininreichen „klassischen“ nukleären Lokalisationssequenzen (NLS), die vom Importin α/β-Dimer erkannt werden. Dazu gehört das pat4-Sequenzmotiv, das aus entweder vier basischen Aminosäuren (Lysine (K) oder Arginine (R)) oder aus drei basischen Aminosäuren in Verbindung mit einem Histidin (H) oder Prolin (P) besteht (K/R_4 bzw. K/R_3 + H/P). Das pat7-NLS-Motiv beginnt mit einem Prolin, dem innerhalb der nächsten drei Aminosäurereste eine Sequenz aus vier Aminosäuren folgt, in der drei basische Aminosäuren zu finden sind ($PX_{(1-3)}K/R_3$; X = beliebige Aminosäure). Ein weiteres NLS-Motiv stellt die „bipartite“-NLS dar. Sie besteht aus zwei basischen Aminosäuren, einem Spacer aus zehn und einer Sequenz aus fünf Aminosäuren, von denen mindestens drei Aminosäuren basisch sind ($K/R_2X_{10}K/R_{3-5}$).

Eine kurze, leucinreiche nukleäre Exportsequenz (NES) bestimmt den Export eines Proteins aus der Zelle (Görlich und Mattaj, 1996, Xu und Massague, 2004). Dieses NES-Motiv „LLLXLLXXLXLX“ (L = Leucin, X = beliebige Aminosäure) kann anstatt Leucin auch Valin enthalten. Diese Sequenzen werden vom Exportin Crm1 erkannt, das daraufhin den Export des Proteins vermittelt (Mattaj und Englmeier, 1998; Wen *et al.*, 1995). Der NES-Crm1-abhängige Export kann durch Leptomycin B (LMB) inhibiert werden. Dieses Antimykotikum bindet an Crm1 und verhindert so die Bildung des Crm1/RanGTP/Substrat-Komplexes (Kudo *et al.*, 1998; Nishi *et al.*, 1994). Das Programm pSort II macht es möglich, verschiedene putative NLS-Motive wie pat4, pat7 oder „bipartite“ in Proteinen zu lokalisieren (Nakai und Horton, 1999). Web-basierte Programme unterstützen auch bei der Suche nach putativen NES-Sequenzen wie z.B. das Programm NetNES (La Cour *et al.*, 2004).

1.7 Zielsetzung

Bisher liegen kaum Daten über die Regulation und Funktion der Proteinkinase D2 vor. Der Hinweis, dass zwischen Zellkern und Zytoplasma ein kontinuierlicher Austausch an PKD2 stattfindet, warf die Frage auf, wie die subzelluläre Lokalisation von PKD2 in der Zelle reguliert ist und in welcher Weise die katalytische Aktivität der Kinase darauf Einfluss nimmt. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Struktur und Funktion des regulatorischen Teils von PKD2 zu untersuchen, im Bezug auf die Bindung des DAG-Analogs Phorbolester, die subzelluläre Lokalisation von PKD2 und die Kontrolle ihrer katalytischen Aktivität. Für eine funktionelle Charakterisierung dieser regulatorischen Domäne mußten Mutanten der Subdomänen von PKD2 kloniert, in HEK293 und AGS-B humanen Magenkarzinomzellen exprimiert und *in vitro* und *in vivo* in Zellen untersucht werden. Dabei sollte ein besonderer Schwerpunkt darauf gelegt werden, wie das Zusammenwirken von Struktur, Lokalisation und Aktivität von PKD2 ihre Aufgaben in der Zelle bestimmen könnte. In Anbetracht der hohen Homologie zwischen den PKD-Isoformen könnten PKD2 und die gut charakterisierte PKD1 durch Unterschiede in ihrer Regulation und abhängig vom Zellkontext auch unterschiedliche biologische Funktionen in der Zelle erfüllen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und Radioaktivität

Sämtliche Chemikalien wurden in p.a. Qualität von den Firmen Bio-Rad (Mannheim), Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roche (Basel, Schweiz), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Auf weitere Bezugsquellen wird in den jeweilgen Methodenerklärungen eingegangen. [^{32}P] γATP (5000 Ci/mmol; 37 GBq = 1 mCi) wurde von der Firma Amersham Pharmacia Biotech, [^{3}H]PDBu von der Firma MPBiotech geliefert.

2.1.2 Antiseren und monoklonale Antikörper

Tab. 1: Antiseren und monoklonale Antikörper

Spezies	Spezifität	Herkunft
Kaninchen	PKD2	Upstate
Kaninchen	PKD2	Orbigen
Kaninchen	PKD-pSer$^{744/748}$	Cell Signaling Technology
Maus (monoklonal)	Flag M2	Sigma
Maus	GFP	Roche
Anti-Maus IgG Peroxidase-Konjugat		Amersham, Pharmacia
Anti-Kaninchen IgG Peroxidase-Konjugat		BioRad

Der polyklonale antiphospho-PKD1/Proteinkinase Cμ-Ser^{744}/Ser^{748}-Antikörper erkennt auch analog die phosphorylierten Serine 706/710 in PKD2. Western Blots mit diesem Antikörper wurden mit ‚pSer$^{706/710}$' markiert.

2.1.3 Zellbiologie

Tab. 2: Verwendete Zelllinen

Zelllinie	Gewebe	Spezies/Herkunft
HEK293	embryonale Niere	Homo sapiens/ATTC: American Type Culture
AGS-B	Magenkarzinom	Höcker *et al.*, 1997

AGS-B Zellen sind humane AGS Magenkarzinomzellen, die mit dem Expressionskonstrukt CCK_B-pcDNAI-neo stabil transfiziert sind. Das Expressionskonstrukt enthält die cDNA des CCK_B/Gastrinrezeptors und ein Neomycinresistenzgen. Die AGS-B Zellen und die humane embryonale Nierenzellinie HEK293 wurden in DMEM (Life Technologies) mit 10% FCS (BioChrom) und 50 I.U./ml Penicillin [100 iE/ml]/Streptomycin [100 µg/ml]) kultiviert. Alle Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und in Gegenwart von 5% CO_2 inkubiert.

2.1.4 Molekularbiologie

2.1.4.1 Enzyme und Kits

Tab. 3: Verwendete Enzyme und Kits

Enzym/Kit	Bezeichnung	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Calf Intestinal Phosphatase (CIP)	New England Biolabs
DNA-Polymerasen	Taq-Polymerase	
	Pfu-Turbo-Polymerase	Stratagene
Restriktionsendonukleasen		New England Biolabs
Ligase	T4 DNA Ligase	New England Biolabs
Plasmid-Präparation	Plasmid Mini Kit	Qiagen
	Nucleobond 500	Machery-Nagel
Gelextraktion	QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Site directed mutagenesis	QuikChange XL Kit	Stratagene

2.1.4.2 Primer für cDNA-Konstrukte

Tab. 4: Synthetisierte Primer

DNA-Konstrukt	Primer-Bezeichnung	PCR-Primer
PKD2-ΔC1a/C1b	3' ΔC1a/C1b	5' ctcccccagcgggcggatctggaa 3'
	5' ΔC1a/C1b	5' atccgcccgctgggggaggccctt 3'
	3' XbaI	5' gaatagggccctctagatgcatgc 3'
PKD2-ΔPH	EcoRI5'	5' gcgaattcgccaccgccccctctt 3'
	3' ΔPH	5' gatgacggggctggatttccgcgt 3'
	5' ΔPH	5' aaatccagccccgtcatccttcag 3'
	3' XbaI	5' gaatagggccctctagatgcatgc 3'
PKD2-ΔC1a	EcoRI5'	5' gcgaattcgccaccgccccctctt 3'
	3' ApaI	5' ccgtgagggcccgcgggcgg 3'
PKD2-ΔC1b	EcoRI5'	5' gcgaattcgccaccgccccctctt 3'
	3' SalI	5' cgacgcgtcgaccttggagagc 3'
	5' SalI	5' acgcgtcgactgcctgggggag 3'
	3' XbaI	5' gaatagggccctctagatgcatgc 3'

PKD2 und PKD2-Mutanten wurden in das EGFP-C2-Expressionplasmid kloniert. Die Mutanten PKD2-ΔC1a/C1b und PKD2-ΔPH wurden durch eine "splice-overlap PCR"-Strategie direkt in pcDNA3 von Dr. Sabine Sturany generiert. Die Deletionen in den Mutanten PKD2-ΔC1a und PKD2-ΔC1b wurden in EGFP-PKD2 mittels PCR mit Primern kloniert, die spezielle Restriktionsschnittstellen enthalten. Die Punktmutanten PKD2-$L^{159}/V^{163}A$, PKD2-$L^{315}A$, PKD2-$L^{315/319}A$, PKD2-$K^{193}A/R^{194}G$, PKD2-$D^{685}A$ (von Dr. Sabine Sturany) und PKD2-$S^{706/710}E$ (von Dr. Sabine Sturany) wurden mittels „site-directed mutagenesis" mit dem QuikChangeXL-Kit von Stratagene über PCR in EGFP-PKD2 generiert. Für die Mutanten PKD2-C1a bzw. -C1b wurde jeweils die C1a- bzw. die C1b-Domäne mittels PCR mit Primern, die Restriktionsschnittstellen für die Insertion in den leeren Vektor enthielten, aus der Sequenz von PKD2 amplifiziert und in den leeren Vektor kloniert.

Die Kombinationsmutante PKD2-$L^{159}/V^{163}A$-$S^{706/710}E$ wurde über eine HindIII-Schnittstelle zwischen der PH-Domäne und der Kinasedomäne aus den jeweils einzelnen Mutanten kloniert.

2.1.4.3 Plasmide

Zur Propagation der Plasmide wurde der Bakterienstamm *E. coli* XL-1 blue (Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F'proAB, $lac^qZ\Delta M15Tn10(tet^r)$], Bullock *et al.*, 1987) verwendet.
Die in dieser Arbeit verwendeten Vektorplasmide sind in Tabelle 5A und die mit ihnen konstruierten rekombinanten Plasmide in Tabelle 5B aufgeführt.

Tab. 5A: Vektorplasmide

Plasmid	Größe [kb]	Resistenz	Herkunft
pcDNA3	4,7	Ampicillin	Invitrogen
Flag-pcDNA3	4,7	Ampicillin	Dr. F. Oswald*, Universitätsklinikum Ulm, Innere Medizin I
pEGFP-C2	5,4	Kanamycin	Clontech

*Das für das Flag-Nonapeptid (MDYKDDDDK) codierende Oligonukleotid (ATGGACTACAAAGACGATGACGATAAA) wurde in drei verschiedenen Leserahmen in den pcDNA3 Vektor kloniert.

Tab. 5B: Rekombinante Plasmide

Insert	Vektor	Schnittstellen für das Insert	Größe des Inserts [kb]	Bezeichnung
PKD2 und PKD2-Mutanten	Flag1-pcDNA3	EcoRI/XhoI	2,9	Flag-PKD2
PKD2 und PKD2-Mutanten	EGFP-C2	EcoRI/XbaI	2,9	EGFP-PKD2

2.1.5 Computerprogramme

Für Sequenzanalysen auf DNA- und Proteinebene:
Für den Vergleich und die Analyse von Sequenzen auf Nukleotid- und Aminosäureebene wurde das Programm MacMolly®Tetra, Version 3.9, 1999 von SoftGene GmbH verwendet.

Die Analyse der Nukleotid- und Aminosäuresequenzen über das Internet wurde mit dem Computerprogramm Basic Local Alignment Tool (BLAST, Altschul *et al.*, 1990) erstellt, wobei die Sequenzen mit den Datenbanken GenBank und Swiss-Prot verglichen wurden.

Für densitometrische Bestimmungen von Autoradiographien:
MacBas 2.5 software (Fuji Photo Film Co., Ltd)

2.2 Molekularbiologische Methoden

Einfache molekularbiologische Methoden wurden nach den Standardprotokollen von Sambrook *et al.* (1989) und Ausubel (1994) durchgeführt.

2.2.1 Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde mit Gelen aus Agarose (Biozyme) durchgeführt, deren Konzentration je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Moleküle zwischen 0.7 und 1,5% Agarose variierte. Nach Aufkochen der Agarose in 1xTAE (0,04 M Tris-actetat, 0,001 M EDTA), wurde dem Gel vor dem Gießen 7,5 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml EtBr in aqua bidest.) je 100 ml zugegeben. Vor dem Laden des Gels wurden die DNA-Proben mit 6-fach DNA-Ladepuffer (30% (v/v) Glycerin, 0,2% (w/v) Orange G) versetzt. In einer Horizontalgelapparatur (BioRad), die mit 1xTAE aufgefüllt wurde, wurde eine Stromstärke von 20-100 mA angelegt. Die Gelfragmente wurden mittels einer UV-Lampe bei 302 nm sichtbar gemacht. Als Größenmarker dienten 1 kb (500bp–12kb) und 100 bp (100–1500bp) DNA-Marker (Life Technologies). Zur Gelextraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde der QIAquick Gelextraktion Kit (Qiagen, siehe Angaben des Herstellers) verwendet.

2.2.2 Herstellung RbCl kompetenter E.coli

Zur Herstellung kompetenter Bakterien wurde der *Escherichia coli* Stamm XL1-blue (Bullock *et al.*, 1987) verwendet. In 10 ml Luria Bertani-Medium (Trypton: 10g/l, Hefeextrakt: 5g/l, NaCl: 10g/l) mit 15 µg/ml Tetracyclin wurde eine Vorkultur bei 37°C unter Schütteln (250 rpm) über Nacht angezogen. Am nächsten Morgen

wurden mit dieser Kultur 200 ml LB/tet (15 µg/ml) angeimpft und bis zu einer OD600 von 0,4 – 0,6 kultiviert. Nach einer Abkühlung der Bakterien auf Eis, erfolgte eine Zentrifugation bei 2500 rpm und 4°C für 12 min. Nach dem Verwerfen des Überstands wurden die Zellen in 16,5 ml eisgekühltem RF1-Puffer (100 mM RbCl/50 mM $MnCl_2$/30 mM KAc/10 mM $CaCl_2$ x 2 H_2O pH 5,8 + 15 % (w/v) Glycerol) resuspendiert. Nach einer 20 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen erneut zentrifugiert (s.o.). Das Pellet wurde in 4 ml eiskaltem RF2-Puffer (10 mM MOPS/10 mM RbCl/75 mM $CaCl_2$ x 2 H_2O pH 6,8 + 15 % (w/v) Glycerol) resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das resuspendierte Bakterienpellet aliquotiert (jeweils 100µl), in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

2.2.3 Transformation

Kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und von Plasmiden 0,1 bis 1 µg DNA (Isolierung von Plasmid-DNA QIAfilter Maxipräparation, Qiagen, siehe Angaben des Herstellers) und von Ligationen der gesamten Ansatz (10-20 µl) zu 50 µl kompetente *E. coli* Zellen pipettiert. Nach 20 min Inkubation auf Eis und einem anschließenden Hitzeschock bei 42°C für 2 min wurden die Bakterien auf Ampicillin-Platten (LB-Medium 1,5% (w/v) Agar, 100µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert. Bei Ligationen wurde je Ansatz 100µl SOB-Medium (Trypton 20g/l, Hefeextrakt 5g/l, NaCl 0,5g/l; KCl 2,5mM, $MgCl_2$ 10mM, $MgSO_4$ 10mM) nach dem Hitzeschock zugegeben und vor dem Ausstreichen noch 1h bei 37°C inkubiert.

2.2.4 Plasmid-(DNA-)Isolierung

Die Gewinnung der DNA basiert auf dem Prinzip der alkalischen Lyse. Die Reinigung der erfolgt über eine Ionenaustauscher-Matrix, an die die DNA unter niedrigen Salz- und pH-Bedingungen gebunden wird. Verunreinigungen werden bei mittleren Salzbedingungen ausgewaschen. Anschließend wird die Plasmid-DNA unter hohen Salzbedingungen von der Matrix eluiert. Es wurden die Plasmid-Kits der Firma Qiagen entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

2.2.5 Klonierung von cDNA-Konstrukten

2.2.5.1 Restriktionsspaltung

Restriktionsanalysen werden in 20-50 µl-Ansätzen durchgeführt. Für die Hydrolyse von 1 µg DNA werden 5-10 U Enzym eingesetzt, wobei darauf zu achten ist, dass die Enzymmenge 10 Vol% des Gesamtansatzes nicht überschreitet, da das im Lagerungspuffer enthaltene Glycerin die Aktivität des Enzyms stört. Die optimalen Bedingungen werden mit dem vom Hersteller mitgelieferten Restriktionspuffer eingestellt, die Hydrolyse erfolgt, in Abhängigkeit von dem gewählten Enzym, meist bei 37°C. Eine Inkubationszeit von 1-2 h ist ausreichend. Die Analyse der Restriktionsprodukte erfolgt mittels Agarosegelelektrophorese.

2.2.5.2 Dephosphorylierung

Um Religation von nur einfach geschnittener Vektor-DNA zu verhindern, werden die endständigen 5´-Phosphatgruppen mit alkalischer Phosphatase abgespalten. Dazu werden etwa 10 µg linearisierter gereinigter Vektor-DNA mit 1/10 Vol. 10x Alkalische Phosphatase-Puffer und 1-2 U alkalischer Phosphatase versetzt, der Ansatz wird bei 37°C 30 min inkubiert. Für die Dephosphorylierung glatter Enden wird die doppelte Menge Enzym eingesetzt und bei 50°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Denaturierung des Enzyms bei 75°C gestoppt. Bevor die so behandelte DNA für die Ligation eingesetzt werden kann, muß eine Aufreinigung der DNA erfolgen.

2.2.5.3 Ligation

Zur Vermehrung und weiteren Untersuchung rekombinanter DNA-Fragmente werden diese in Plasmidvektoren ligiert. Voraussetzung für die Ligation sind kompatible Enden der zu ligierenden Fragmente, die durch Restriktion erzeugt und mit den nachfolgend aufgeführten Methoden optimiert werden können. Die T4-DNA-Ligase benötigt für die Verknüpfung der offenen Enden ATP, das im Puffer supplementiert werden muß. Die Bedingungen für eine optimale Ligation müssen innerhalb der folgenden Rahmenbedingungen im Einzelnen adaptiert werden. Das Reaktionsvolumen sollte möglichst gering gehalten werden, die Temperatur sollte zwischen 14°C und 20°C liegen und die Reaktionsdauer von 2 h bis 24 h richtet

sich nach der Art der Ligation („sticky“- oder „blunt-end“). Es werden zwischen 20 und 100 ng linearisierter Vektor-DNA mit dem 5-10fachen molaren Überschuß an Insert-DNA gemischt, der Ansatz mit 1/10 Volumen 10x Ligase-Puffer des entsprechenden Herstellers versetzt und mit ATP zu einer Endkonzentration von 1 mM supplementiert. Durch Zugabe von 1 U Ligase wird die Reaktion gestartet.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist eine enzymatische Amplifikation eines DNA-Bereiches, der von zwei Oligonukleotiden („Primer“) flankiert wird, die jeweils an den Enden des DNA-Bereiches liegen (sense- bzw. anti-sense Orientierung; Mullis und Faloona, 1987). Für die Reaktion wird die hitzestabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium Thermus aquaticus (Taq-Polymerase) verwendet. Dieses Enzym besitzt ein Temperaturoptimum bei 70° bis 72°C und ist für kurze Zeit auch bei Temperaturen bis zu 95°C stabil. Für die Amplifikation von DNA wurden in einer 50µl Reaktion folgende Komponenten zugesetzt: Primer (sense und anti-sense) jeweils [100 pm], dNTPs Mix (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) [0,6 mM], $MgCl_2$ [2 mM], PCR-Puffer (10x) (Life Technologies): 5 µl, template: Plasmid (0,1 – 0,5 µg DNA), Taq-Polymerase (Life Technologies) [2,5 U].

PCR-Bedingungen:

	94°C	2 min
35 Zyklen	94°C	30 sec
	40-68°C	50 sec
	72°C	1min/2kb des zu amplifizierenden Konstrukts
	72°C	10 min: terminale Extension

Für eine Mutagenese mittels PCR wurden Oligonukleotide mit den erwünschten Basenaustauschen generiert. Durch die Basenaustausche stimmten die Oligonukleotide nicht mehr hundertprozentig mit der Matrize überein, so dass ein Absinken der Annealing-Temperatur nach jedem Zyklus um 0,5°C bei 33 Zyklen ein Annealing von Oligonukleotiden und Matrize ermöglichte.

PCR-Bedingungen:

	95°C	2 min
	95°C	30 sec
35 Zyklen	64°C	50 sec
jeden Zyklus - 0,5°C	72°C	1min/2kb des zu amplifizierenden Konstrukts
	72°C	10 min: terminale Extension

Für die „site-directed mutatgenesis“ (sdm) wurde der QickChangeXL-Kit von Stratagene benutzt. Diese Strategie der PCR wird benutzt, um z.B. einen Aminosäureaustausch auf der DNA-Basis eines Proteins durchzuführen (Punktmutation). Dafür werden Primer generiert, die an derselben Stelle in der DNA einmal in sense- und einmal in anti-sense-Richtung annealen und die beide eine Baseveränderung, die für eine andere Aminosäure codiert, im Vergleich zur Matrixsequenz tragen. Da bei dieser PCR-Methode das Plasmid in seiner gesamten Länge amplifiziert wird, wurde eine DNA-Polymerase mit einer Proofreading-Einheit verwendet (Pfu-turbo-Polymerase, Stratagene). Für die Amplifikation wurden in einer 50µl Reaktion folgende Komponenten zugesetzt: Primer (sense und anti-sense) jeweils [10 pm], dNTPs Mix (dATP, dGTP, dCTP und dTTP) [0,6 mM], $MgCl_2$ [2 mM], PCR-Puffer (10x) (Stratagene): 5 µl, Qick-Solution (Stratagene): 3 µl, template: Plasmid (10 ng DNA), Pfu-turbo-Polymerase (Stratagene) [2 U].

PCR-Bedingungen:

	95°C	2 min
	95°C	30 sec
18 Zyklen	68°C	50 sec
	72°C	1min/1kb des zu amplifiziernden Plasmids
	72°C	10 min: terminale Extension

2.2.6.1 Klonierung von 5’ EGFP-Tag Konstrukten

PKD2 wurde, wie 2001 bei Sturany *et al.* beschrieben, kloniert.

Für ein N-terminales tagging aller PKD2-Konstrukte mit dem „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP) wurde das Startcodon in PKD2 unter gleichzeitiger Einführung einer EcoRI-Schnittstelle mittels PCR-Mutagenese (siehe Abschnitt

2.2.6.1) verändert. Das PCR-Fragment wurde über EcoRI und XbaI in den EGFP-C2-Vektor subkloniert.

2.2.6.2 Einführung von Punktmutationen in die PKD2-Sequenz

Mittels der „site-directed mutatgenesis“-(sdm-)PCR wurden Punktmutationen in PKD2 eingeführt. Als template wurde der EGFP-PKD2-Wildtyp verwendet. Wurden zwei nahe beieinander gelegene Aminosäuren in der Sequenz verändert, so wurde erst mit Primern, die nur eine Aminosäure veränderten, eine sdm-PCR durchgeführt. Das daraus resultierende Plasmid wurde als template für eine weitere sdm-PCR mit einem zweiten Paar Primern verwendet, die nun die Veränderungen für beide Aminosäuren trugen. Nach den jeweiligen sdm-PCRs wurde der Ansatz mit dem Restriktionsenzym DpnI (10 U, New England Biolabs) für 1h bei 37°C verdaut, wobei DpnI die methylierte template DNA spaltete und damit nur die in der PCR generierte DNA im Ansatz übrig blieb. Dieser Verdau wurde in E. coli XL-1-Blue Bakterien transformiert und die Bakterien über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.6.3 Deletionsmutationen in der PKD2-Sequenz

In einigen PKD2-Mutanten wurden einzelne Domänen deletiert. Dafür wurden jeweils PCRs von den Domäne-begrenzenden Sequenzen bis zum C-terminalen und zum N-terminalen Ende von PKD2 durchgeführt. In den zwei Primerpaaren waren jeweils Veränderungen der Sequenz zu Schnittstellen enthalten. Die Primer, die an den C-Terminus bzw. N-Terminus von PKD2 annealen sollten, enthielten eine EcoRI- bzw. XbaI-Schnittstelle für die Klonierung in den EGFP-C2-Vektor. Die zwei Primer, die die zu deletierende Domäne flankieren, enthalten beide eine Erkennungssequenz für dasselbe Restriktionsenzym. Somit können nach den PCR-Reaktionen die beiden PCR-Konstrukte über die gemeinsame Schnittstelle ligiert und als gesamtes Konstrukt in den EGFP-C2-Vektor über EcoRI und XbaI inseriert werden.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Gesamtzelllysate

Die Zellen wurden in 1 ml (für eine 10 cm Schale) oder 300 µl (für eine 35 mm Schale) Lysierungspuffer A (50 mM Tris/HCl, pH 7,6; 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 2 mM Dithiothreitol, Proteaseinhibitoren: Aprotinin (10 µg/ml), Leupeptin (100 µg/ml), Pepstatin (0,7 µg/ml) und 1 mM AEBSF und 1% Triton X-100) 15 min bei 4°C lysiert und anschließend zentrifugiert (14 000 rpm /min, 4°C, 10 min). Der Überstand wurde mit 200µl (1 ml Zellysat) bzw. 60 µl (300 µl Zellysat) 6x SDS-PAGE-Probenpuffer (30% (w/v) Glycerin, 4% (w/v) SDS, 50 mM TrisHCl pH 6,8, 5% (w/v) DTT, 0,005% (w/v) Bromphenolblau) versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt.

2.3.2 Immunpräzipitation von PKD2

Zur Immunpräzipitation von PKD2 wurden je nach Fragestellung unterschiedliche Antikörper verwendet. Der Überstand nach der Zentrifugation (siehe Gesamtzellysate) wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und mit dem PKD2-Antikörper (1:200; upstate oder Orbigen), dem GFP-Antikörper (1:250) oder dem Flag M2-Antikörper (Sigma, 5 µg Antikörper/ml Lysierungspuffer), der an Agarose gekoppelt ist, für 60 Minuten bei 4°C auf dem Rollschüttler inkubiert. Nach Zugabe von 30 µl ProteinA-SepharoseTM 6MB (Pharmacia Biotech) wurde weitere 60 Minuten bei 4°C inkubiert, kurz abzentrifugiert und die ProteinA-Sepharose beads zweimal mit Lysierungspuffer A gewaschen. Zu den abzentrifugierten, gewaschenen Protein A Sepharose Beads wurde 2x SDS-PAGE-Probenpuffer zugegeben, 5 min bei 95°C erhitzt und die eluierten Proteine mittels SDS-PAGE analysiert. Für ein anschließendes Kinaseassay wurden die Immunpräzipitate dagegen einmal mit Lysierungspuffer A und zweimal mit Lysierungspuffer B (Lysierungspuffer A ohne Triton X100) gewaschen. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) Proteine wurden in einem diskontinuierlichen SDS-Elektrophoresesystem nach Lämmli (Lämmli, 1970) in einem Sammelgel (Sammelgelpuffer: 0,5M TrisHCl; pH 6,8 mit 4% Acrylamid) und einem anschließenden Trenngel (Trenngelpuffer: 1,5M TrisHCl; pH 8,8 mit 10% bzw. 12,5% Acrylamid) aufgetrennt. Für die Ermittlung der Molekulargewichte

wurde der Proteingrößenstandard BENCHMARK prestained protein ladder (enthält 10 Proteine von 10 bis 200 kDa) (Life Technologies) verwendet. Als Elektrophoresepuffer wurde ein Trispuffer (0,1% SDS (w/v), 384 mM Glycin, 50 mM Tris) eingesetzt.

2.3.3 Western Blot

Die in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer (4h bei 400 mA) auf eine PVDF-Membran (Millipore) transferiert (Transferpuffer: 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol). Die Immundetektion spezifischer Proteine erfolgte mit Peroxidase-gekoppelten anti-Maus oder anti-Kaninchen Zweitantikörpern nach Standardprotokollen. Als Erstantikörper dienten die verschiedenen PKD2-Antikörper, der GFP-Antikörper oder der Flag-M2-Antikörper. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran zum Blocken der freien Bindungsstellen für 1h bei RT in PBS mit 3% Milchpulver (fettfrei) inkubiert. Dann wurde die Membran mindestens 1h mit entsprechend in PBS mit 3% Milchpulver (fettfrei) verdünntem Antikörper geschwenkt. Nach mehrmaligem Waschen mit 0,05% PBS/Tween20 erfolgte eine einstündige Inkubation mit Anti-Maus/bzw.-Kaninchen spezifischen IgG, die mit Peroxidase gekoppelt sind. Die Konjugate wurden in PBS/0,05% Tween20 verdünnt. Zur Visualisierung der Immunkomplexe wurde die Membran mehrmals mit PBS/0,05% Tween20 gewaschen und mit Substratlösung (ECL, Amersham) für die Peroxidase 1 min inkubiert und auf einen Röntgenfilm (BioMaxLight-1/ BioMaxML, Eastman Kodak) zwischen 1 und 30 min exponiert.

2.3.4 Transfektion von HEK293 und AGS-B Zellen

Transfektion mit PEI:

Diese Methode eignet sich besonders gut für exponentiell wachsende HEK293-Zellen. Sind die Zellen zu ca. 50% konfluent (35 mm-Schale), werden sie auf 1ml serumfreies DMEM-Medium gestetzt. 2 µg DNA wird zusammen mit 100 µl 150 mM NaCl im Eppendorf-Cup vorgelegt. In einem weiteren Cup werden 100 µl 150 mM NaCl mit 4,7 µl 10%-iges Polyethylenimid (PEI; sigma) durch Schwenken gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde das NaCl-PEI-Gemisch zu dem NaCl-DNA-Mix getropft und ohne Mischen 15-20 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden 200 µl der Transfektionsmischung auf die serumfreien Zellen getropft, vorsichtig gemischt und für 5-7 h bei 37°C in den Inkubator gestellt. Daraufhin wurde 1 ml DMEM mit 10% FCS zu den Zellen gegeben und diese 24-48 h inkubiert.

Transfektion mit Nucleofector:

Diese Art der Transfektion stellte eine Mischung aus Elektroporation und liposomaler Transfektion dar. Hierfür wurde das Gerät (Nucleofector) und der Kit der Firma Amaxa verwendet. AGS-B-Zellen einer konfluente 10cm-Schale wurde bei 1000 rpm für 4 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert und das überstehende Medium vorsichtig abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 100 µl Solution-R resuspendiert, 5 µg DNA zugesetzt und in eine sterile Elektroporationsküvette transferiert. Die Elektroporation wurde für AGS-B-Zellen mit dem Programm I-13 durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl DMEM inkl. 10% FCS verdünnt und entweder in eine 10cm-Schale mit 10% DMEM transferiert oder auf 3 (für Western Blot-Analysen) oder 4 (für Fluoreszenzmikroskop-Studien) 35mm-Schalen mit Medium verteilt und für 24-48 h inkubiert. Für Mikroskopie-Studien wurden die Zellen entweder für lebend-Untersuchungen in MatTek-35mm-Schälen mit Glasboden oder für spätere Fixierung auf sterile 12 mm-Deckgläschen ausplattiert.

Transfektion mit Fugene:

Bei der Transfektion von Zellen mit dem Reagenz FUGENE (Roche) handelt es sich um einen Liposomen-vermittelten Gentransfer. Die zu transfizierende DNA wird von polykationischen Lipiden komplexiert und in dieser Form durch Verschmelzung mit der Zellmembran oder über Endocytose in die eukaryontischen Zellen aufgenommen. 24 h vor der Transfektion mit DNA der PKD2-Konstrukte wurden HEK293 oder AGS-B Zellen in einer Dichte von 5×10^4 Zellen in 35mm-Schalen mit oder ohne sterile 12mm-Deckgläschen ausplattiert. Für die Transfektion wurden 3 µl FUGENE in 100 µl DMEM verdünnt und nach 5 min Inkubation bei Raumtemperatur zu 1 µg DNA gegeben. Nach einer weiteren Inkubation von 15 min wurde der DNA/FUGENE-Komplexes auf HEK293 Zellen in DMEM mit 10% FCS getropft. Für Experimente wurden die Zellen 24-48 h nach der Transfektion eingesetzt.

2.3.5 Aktivierung von PKD2

24 h nach der Transfektion wurden die Zellen auf Minimalmedium ohne FCS gesetzt und für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Dann wurden sie mit dem Neuropeptid Gastrin (100 nM) oder dem Phorbolester PDBu (400nM; jeweils in DMEM-Medium verdünnt) für die entsprechenden Zeiten im Brutschrank stimuliert. Die Kontroll-Zellen erhielten die gleiche Menge Medium ohne den jeweiligen Stimulator.

2.3.6 Blockade des nukleären Exports von PKD2

Durch die Zugabe von Leptomycin B (LMB) (20 ng/ml; verdünnt in 10% FCS-haltigem DMEM-Medium) zu transfizierten AGS-B Zellen und eine anschließende Inkubation im Brutschrank für 1 h führten zur Blockade des Crm1-abhängigen Exports von PKD2.

2.3.7 Fixierung der Zellen

Auf Deckgläschen ausgesäte AGS-B-Zellen wurden für Mikroskopieaufnahmen nach eventueller Stimulation auf ihrem Untergrund fixiert. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen zweimal mit warmen PBS gewaschen. Dann wurden pro 35mm-Schale 1 ml 4 % Formaldehyd/PBS-Lösung auf die Zellen gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgten 3 weitere Waschschritte mit PBS. Mit Mounting Medium wurden die Deckgläschen auf Objektträger aufgebracht und über Nacht bei Raumtemperatur ausgehärtet.

2.3.8 *In vitro*-Kinaseassay

Die Kinaseaktivität von PKD2 und ihren Mutanten und der Effekt von Gastrin und PDBu wurde mittels *in vitro*-Kinaseassays untersuchten. PKD2-Immunpräzipitate wurden wie oben beschrieben hergestellt und einmal mit Lysierungspuffer A und zweimal mit Lysierungspuffer B gewaschen und dann trocken gesaugt. Für eine Untersuchung der Autokinaseaktivität bzw. der Phosphorylierung des artifiziellen Substrates Histon H1 wurden die gewaschenen Immunkomplexe in 20 µl Kinase-Mix (100 µM [γ-^{32}P]ATP – 400-600 cpm/pmol, 30 mM Tris/HCl, pH 7,4, 30 mM

$MgCl^2$, 1mM DTT) ohne oder mit 0,5 mg/ml Histon H1 resupendiert und für 10 min bei 30°C inkubiert. Nach dem Stoppen der Kinasereaktion mit 14 µl 6x SDS-Probenpuffer und 5 min Erhitzung bei 95°C, erfolgte eine Analyse mittels SDS-PAGE. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel für 5 min in Fixierlösung (Essigsäure: 7%, Methanol: 25%) fixiert, getrocknet und auf einen Röntgenfilm (BioMaxLight-1/ BioMaxML, Eastman Kodak) zwischen 30 min und 2 h exponiert.

2.3.9 Bindung von Phorbolester

Um die Bindung von [^{3}H]PDBu in intakten HEK293-Zellen zu untersuchen, wurden entweder mit pEGFP-Vektor oder mit einem pEGFP-PKD2-Konstrukt transfizierte Zellen zweimal mit DMEM gewaschen und mit Bindungsmedium (DMEM mit 1 mg/ml BSA und 10 nM [^{3}H]PDBu) für 30 min bei 37°C inkubiert. Bei Kontroll-Zellen wurde dem Bindungsmedium zusätzlich 1 µM nicht-radioaktives PDBu zugesetzt. Nach einem schnellen Waschschritt mit eiskaltem PBS wurden die Zellen und bei 4°C lysiert (0,5 ml 0.1N NaOH, 2% SDS /35 mm Schale). Das Zellysat wurde anschließend in 9,5 ml eines Szintillationsgemisches (Triton/Toluol: Rotiszint, Roth) aufgenommen. Die gebundene Radioaktivität wurde mittels eines Beckman ß-Szintillationszählers ausgewertet. Mittels der Kontroll-Zellen wurde unspezifisch gebundene Radioaktivität bestimmt.

2.4 Bildgebende Methoden

2.4.1 Time Lapse-Mikroskopie

Bei dieser Mikroskopietechnik wurde ein Epi-Fluoreszenzmikroskop von Olympus mit angeschlossener CCD-Kamera benutzt. In der integrierten Inkubationskammer 5% CO_2 und 37°C wurden lebende AGS-B-Zellen in MatTek-Schälchen mit Glasboden untersucht. Die Lokalisation der transfizierten EGFP-PKD2 und ihrer jeweiligen Mutanten wurde mittels ihrer grünen Fluoreszenz (EGFP) in den lebenden Zellen vor und nach der Behandlung mit Gastrin beobachtet.

2.4.2 Konfokale Lasermikroskopie

Hierfür wurde das konfokale Laserscanmikroskop LSM510 Meta (Carl Zeiss) mit einem 488-nm Argonlaser und der LSM5.1 Software verwendet. Es wurden sowohl fixierte Präparate auf Deckgläschen als auch lebende AGS-B-Zellen in MatTek-Schälchen mit Glasboden an diesem Mikroskop untersucht. Die lebenden AGS-B-Zellen wurden 24-48 h nach der Transfektion in DMEM mit zusätzlich 30 mM Hepes, pH 7, in einem LSM 510 Inkubator S (Carl Zeiss) mit 5% CO_2 und 37°C untersucht. Die Zellen waren mit EGFP-PKD2 und den jeweiligen Mutanten transfiziert. Die Lokalisation der EGFP-PKD2-Proteine wurde in diesen Zellen beobachtet bevor und nachdem ihrem Medium entweder Gastrin (100 nM) oder LMB (20ng/ml) zugegeben wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Rolle der regulatorischen Domäne bei der Bindung von Lipiden am Beispiel des Phorbolesters PDBu

Der Phorbolester PDBu (Phorbol-12,13-dibutyrat) ist eine synthetische Substanz, die die Wirkung des membranverankerten Lipid-Botenstoffes Diacylglycerol in der Zelle nachahmen kann. Wie unter Abschnitt 1.1.2 und 1.4.1.2 beschrieben, können die C1-Domäne oder die PH-Domäne in Proteinen an Lipide binden. 2001 wurde bereits von Sturany *et al.* gezeigt, dass bei einer Expression von PKD2 in HEK293-Zellen gleichzeitig die Menge an gebundenem Phorbolester in der Zelle steigt (Sturany *et al.*, 2001). Um aufzuklären, welche Domänen von PKD2 an dieser Phorbolesterbindung beteiligt sind, wurden verschiedene Mutanten von PKD2 hergestellt, die alle N-terminal die Sequenz für ein „enhanced green fluorescence protein“ (EGFP) als Fusionsprotein enthalten. Anhand dieses „Tags“ ist es möglich, die Fusionsproteine über die Erkennung des EGFP zu immunpräzipitieren, in Western Blots nachzuweisen oder in Zellen die Lokalisation dieses Fusionsproteins zu bestimmen. Um die Eigenschaften der regulatorischen Domäne von PKD2 näher zu charakterisieren, wurden folgende Mutanten erstellt (Abb. 7). In PKD2 wurden die PH-Domäne (AS T397-M509; PKD2-ΔPH), die beiden cysteinreichen C1-Domänen (AS H139-C314; PKD2-ΔC1a/C1b), nur die C1a-Domäne (AS H139-P185; PKD2-ΔC1a) oder nur die C1b-Domäne (AS H265-C314; PKD2-ΔC1b) entfernt, wobei bei allen Mutanten außer der PKD2-ΔC1a/C1b die prolinreiche, die serinreiche und die azide Domäne erhalten blieben (vgl. Abb. 4). Die Sequenzdeletionen der C1a- und C1b-Domänen in PKD2 sind im Vergleich zu den Deletionen in PKD1 in Abb. 8 dargestellt.

Es gelang, diese PKD2-Mutanten zu klonieren und gleichmäßig in HEK293 Zellen zu exprimieren (Abb. 9 und Abb. 10, oben).

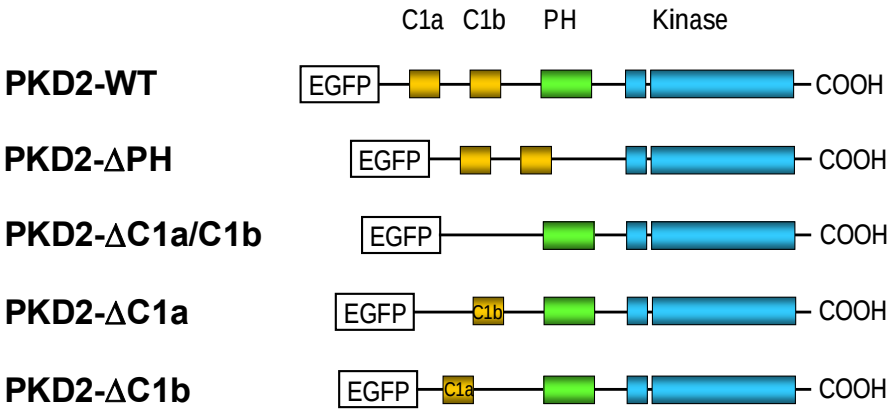

Abb. 7: Schematische Darstellung der verwendeten PKD2-Konstrukte. Es wurden folgende Deletionsmutanten von PKD2 durch Deletion einzelner Domänen hergestellt: PKD2-ΔPH, -ΔC1a/C1b, -ΔC1a und -ΔC1b. PKD2-WT und diese Konstrukte wurden mit einem N-terminalen „enhanced green fluorescence protein“ (EGFP)-Tag versehen.

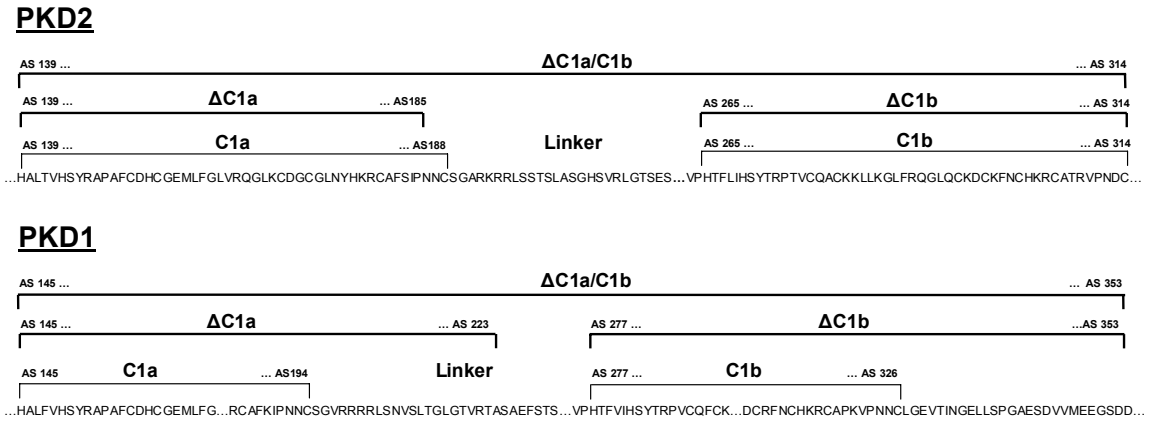

Abb. 8: Sequenzvergleich der Deletionsmutationen der C1a/C1b-, C1a- und C1b-Domänen von PKD2 und PKD1 (Rey *et al*., 2001a).

3.1.1 Rolle der cysteinreichen Zinkfingerdomänen für die Phorbolester-/Lipidbindung

Es wurde untersucht, in wie weit sich die PKD2-Mutanten hinsichtlich der Bindung von [^{3}H]-markiertem Phorbolester unterscheiden. Dafür wurden die unterschiedlichen PKD2-Zinkfingermutanten in HEK293-Zellen transfiziert und exprimiert und die Zellen mit 10nM [^{3}H]PDBu inkubiert. Als Kontrolle für unspezifische Bindungen diente der Zusatz von nichtmarkiertem PDBu [10µM], das die Bindung von [^{3}H]PDBu kompetitiv hemmt. Die Deletion der C1-Domänen (PKD2-ΔC1a/C1b) führte zum Verlust der gesamten Phorbolesterbindungsfähigkeit von PKD2. Die PKD2-Mutante, der nur die C1a-Domäne fehlte (PKD2-ΔC1a), war immer noch fähig, Phorbolester zu binden, aber

die Menge an gebundenem [^{3}H]PDBu war im Vergleich zum PKD2-Wildtyp um 50% niedriger (Abb. 9). Dagegen zeigte sich, dass die Deletion nur der C1b-Domäne (PKD2-ΔC1b) zu einem völligen Verlust der Phorbolesterbindung an PKD2 führt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass beide C1-Domänen zur Bindung von Phorbolester an PKD2 beitragen, wobei die C1b-Domäne für den Großteil des gebundenen Phorbolesters verantwortlich ist.

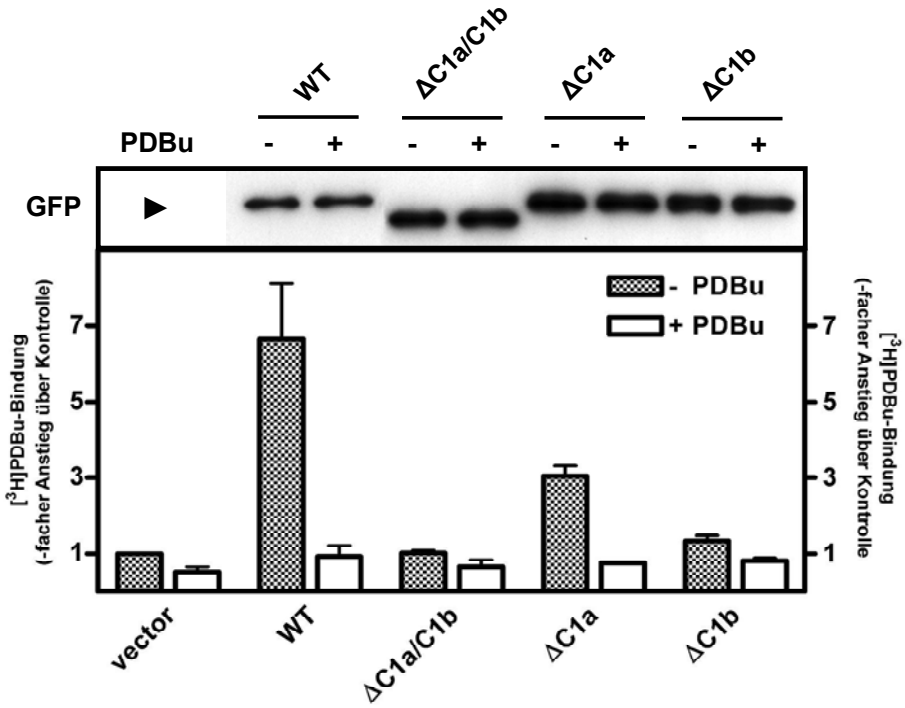

Abb. 9: Die Rolle der Zinkfingerdomänen von PKD2 bei der Bindung von [^{3}H]PDBu. Oben: Expressionsnachweis der EGFP-PKD2-Konstrukte in HEK293-Zellen, die für 15 min entweder mit 400 nM PDBu (+) oder Lösungsmittel (-) inkubiert wurden. Die Fusionsproteine wurden in den Zell-Lysaten mit einem anti-GFP Antikörper (GFP) nachgewiesen. Unten: Mit EGFP-Vektor, EGFP-PKD2-WT, -ΔC1a/C1b, -ΔC1a und -ΔC1b transfizierte HEK293-Zellen wurden mit 10 nM [^{3}H]PDBu in Anwesenheit (PDBu, +) oder Abwesenheit (PDBu, -) von 10 µM unmarkiertem PDBu inkubiert.

3.1.2 Rolle der Pleckstrin-Homologiedomäne für die Phorbolester-/Lipidbindung

Die PKD2-Mutante, der die PH-Domäne fehlt (PKD2-ΔPH), wies bei ihrer Expression in HEK293-Zellen eine vergleichbar hohe Bindungsaffinität für Phorbolester wie der Wildtyp von PKD2 auf (Abb. 10). Dies zeigt deutlich, dass im Gegensatz zu den Zinkfingerdomänen die PH-Domäne bei der Phorbolesterbindung in PKD2 keine Rolle spielt.

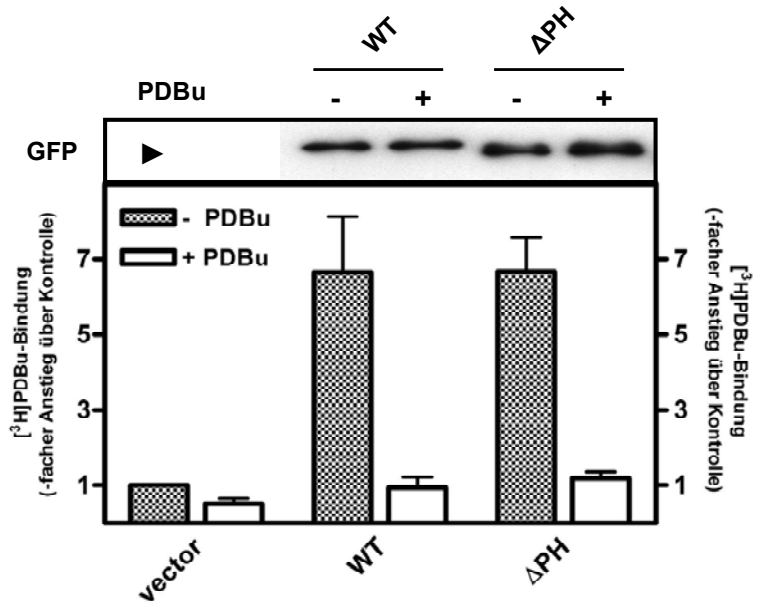

Abb. 10: Die Rolle der Pleckstrin-Homologiedomäne in PKD2 bei der Bindung von [^{3}H]PDBu. Oben: Expressionsnachweis von EGFP-PKD2-WT und EGFP-PKD2-ΔPH in HEK293-Zellen, die für 15 min entweder mit 400 nM PDBu (+) oder Lösungsmittel (-) inkubiert wurden. Die Fusionsproteine wurden in den Zell-Lysaten mit einem anti-GFP Antikörper (GFP) nachgewiesen. Unten: Mit EGFP-Vektor, EGFP-PKD2-WT und EGFP-PKD2-ΔPH transfizierte HEK293-Zellen wurden mit 10 nM [^{3}H]PDBu in Anwesenheit (PDBu, +) oder Abwesenheit (PDBu, -) von 10 µM unmarkiertem PDBu inkubiert.

3.2 Bedeutung distinkter Domänen für die subzelluläre Lokalisation von PKD2

Die regulatorische und katalytische Domäne einer Proteinkinase können ihre subzelluläre Lokalisation bestimmen (Filhol *et al.*, 2003). Bisher ist sehr wenig über die subzelluläre Lokalisation von PKD2 bekannt. Dabei stellte sich die Frage, ob PKD2 unter physiologischen Bedingungen im Kern lokalisiert ist (Rey *et al.*, 2003a). Hierfür wurde die subzelluläre Lokalisation von PKD2 in humanen AGS-B Magenkarzinomzellen, einem epithelialen Tumorzellmodel, untersucht. Die AGS-B-Zellen sind stabil mit dem CCK_B-/Gastrin-Rezeptor transfiziert, über den PKD2 aktiviert werden kann, wenn die Zellen mit Gastrin behandelt werden (Sturany *et al.*, 2002). Die EGFP-PKD2-Konstrukte wurden in diese Zellen transfiziert, exprimiert und ihre Lokalisation mittels eines konfokalen Lasermikroskops (siehe Abschnitt 2.4.2) in den Zellen beobachtet. Ein Großteil von EGFP-PKD2-Wildtyp ist im Zytoplasma detektierbar. Um die subzelluläre Lokalisation von PKD2 nach einem physiologischen Stimulus zu bestimmen, wurden die transfizierten AGS-B-Zellen mit 100 nM Gastrin behandelt.

3.2.1 Kontinuierlicher Austausch von PKD2 zwischen Zytoplasma und Zellkern

Eine Behandlung der AGS-B-Zellen mit Gastrin führte zu einer extrem raschen Akkumulation von EGFP-PKD2 an der Plasmamembran und anschließend im Kern (Abb. 11). Die Lokalisation von PKD2 konnte an einem Time Lapse-Mikroskop (siehe Abschnitt 2.4.1) in lebenden AGS-B-Zellen beobachtet werden. Unstimuliert lag EGFP-PKD2-WT gleichmäßig verteilt im Zytoplasma vor. Bereits nach weniger als einer Minute nach der Zugabe von Gastrin ins Medium wanderte PKD2 rasch an die Plasmamembran. Nach 40 min Stimulation mit Gastrin war PKD2 hauptsächlich im Kern und perinukleär lokalisiert. Wurde in den AGS-B-Zellen allerdings der Crm1-abhängige Export mit Leptomycin B (LMB; siehe Abschnitt 1.6.2) blockiert, kam es zu einer fast vollständigen Akkumulation von EGFP-PKD2 im Zellkern.

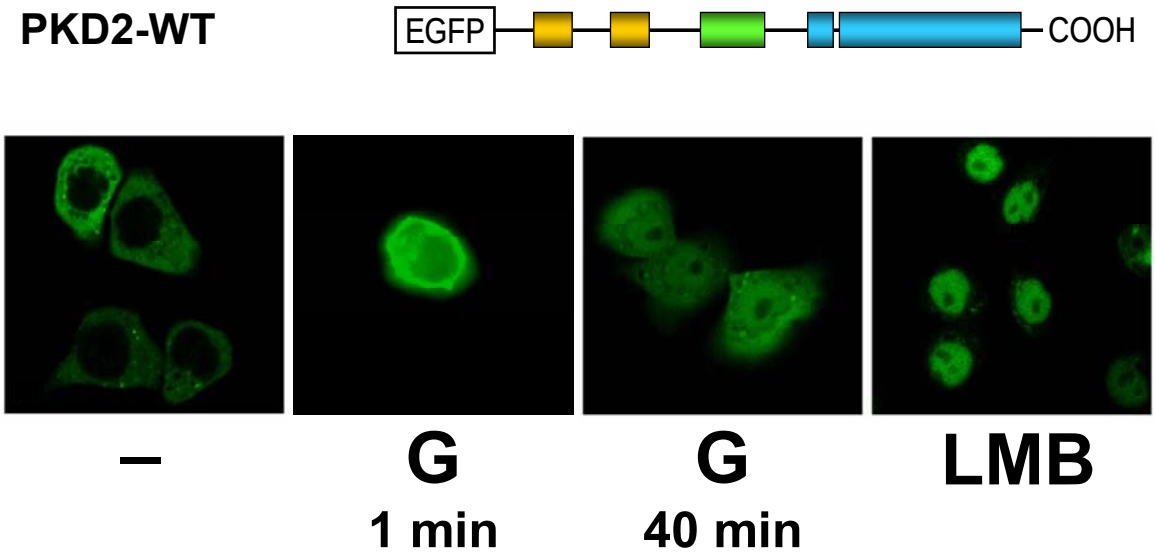

Abb. 11: Subzelluläre Lokalisation von EGFP-PKD2-WT in AGS-B-Zellen. Nach Transfektion von AGS-B-Zellen mit dem Fusionsprotein EGFP-PKD2 wurden die lebenden Zellen vor bzw. 1 min und 40 min nach der Zugabe von 100 nM Gastrin (G) beobachtet. Für die Blockade des Exports wurden die transfizierten, lebenden AGS-B-Zellen für 1 h mit 10 ng/ml Leptomycin B (LMB) inkubiert (Abbildungen entstanden in Zusammenarbeit mit Julia von Blume).

Dieser Austausch von PKD2 zwischen dem Zytoplasma und dem Kern wird an der Kernpore reguliert. Wie unter 1.6.2 in der Einleitung beschrieben tragen viele Zellproteine kurze Lokalisationssignale in ihrer Aminosäuresequenz. Eine arginin- und lysinreiche nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) im Protein wird vom Importfaktor Importin α/β erkannt, der das Protein in den Kern transportiert. An eine kurze, leucinreiche nukleäre Exportsequenz (NES) im Protein kann der

Exportfaktor Crm1 binden, und vermittelt damit den aktiven Export des Proteins aus dem Zellkern.

Mit dem Programm pSort II wurden putative NLS-Motive wie pat4 oder „bipartite“ in der C1a-Domäne, im Linker zwischen C1a- und C1b-Domäne, in der PH-Domäne und in der katalytischen Domäne von PKD2 gefunden. Die schwerer zu definierenden putativen NES-Motive wurden mit dem Programm NetNES im Linker zwischen C1a- und C1b-Domäne, in der C1b-Domäne, C-terminal der C1b-Domäne, C-terminal der PH-Domäne und in der katalytischen Domäne von PKD2 ermittelt (Abb. 12). Im Folgenden wurde nun untersucht, welche dieser Signalsequenzen in PKD2 fähig sind, eine Lokalisation von PKD2 in den bzw. aus dem Zellkern zu ermöglichen.

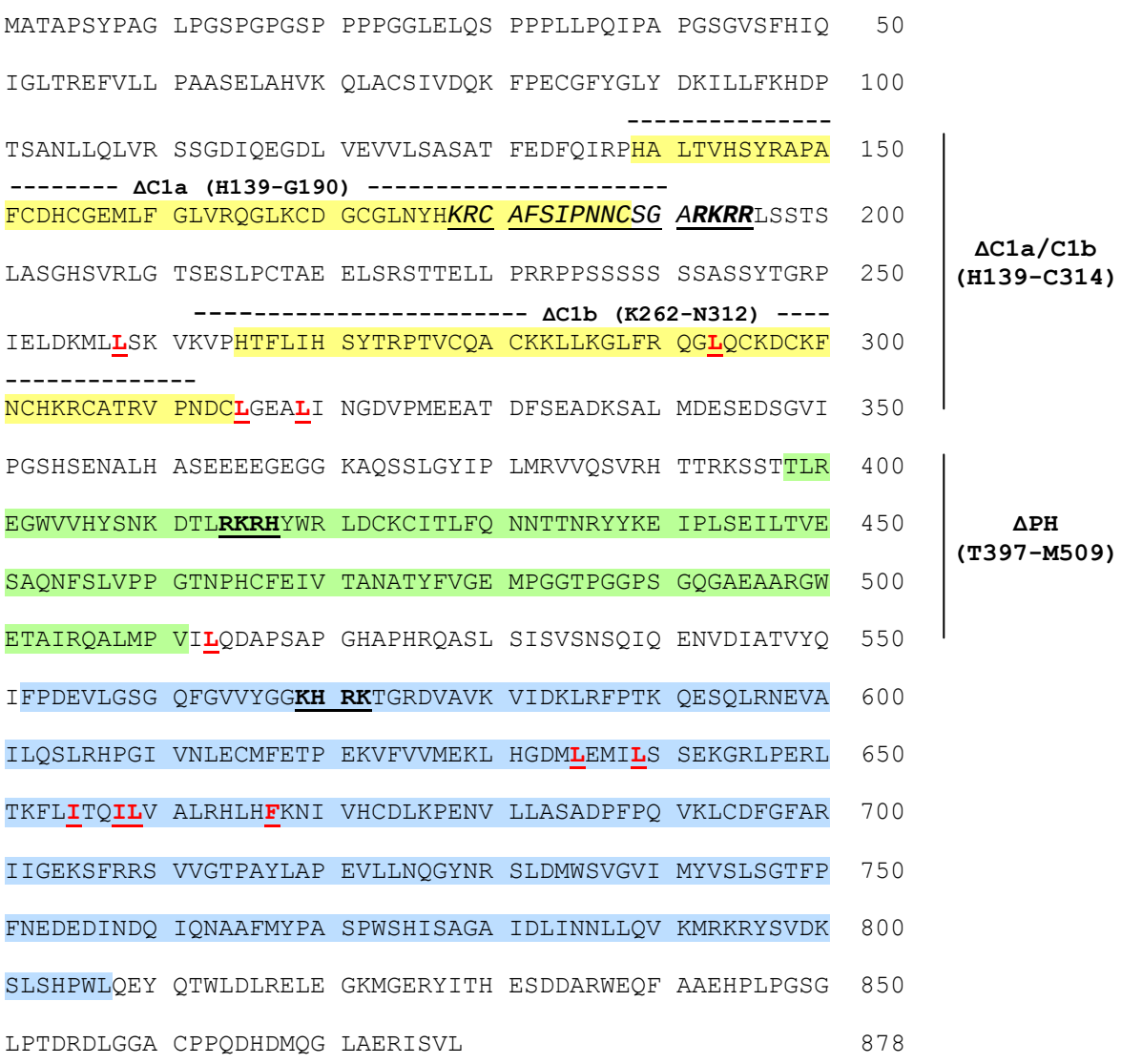

Abb. 12: Putative NES und NLS in der PKD2-Sequenz. Die C1a- und C1b-Domänen wurden in gelb, die Pleckstrin-Homologiedomäne wurde in grün und die Kinasedomäne in blau hervorgehoben. Die verschiedenen Deletionsmutationen in PKD2 sind über oder rechts der Sequenz angegeben. Die nukleären Importsequenzen (NLS) pat4 (**fett**) und bipartite (*kursiv*) und die nukleären Exportsequenzen (NES; rot) sind im Text gekennzeichnet.

3.2.2 Einfluss der Zinkfingerdomänen auf die Lokalisation von PKD2

Die PKD2-Mutante, der die gesamte C1a/C1b-Domäne fehlt (EGFP-PKD2-ΔC1a/C1b) war in transfizierten, unstimulierten AGS-B-Zellen hauptsächlich im Zytoplasma zu finden. Nach einer Behandlung mit Gastrin stieg die Menge an EGFP-PKD2-ΔC1a/C1b in der perinukleären Region der Zellen an, und in einem weit weniger starken Ausmaß im Kern verglichen zum Wildtyp von PKD2. Diese Daten verdeutlichen, dass die Akkumulation von PKD2 im Kern zumindest teilweise verhindert wird, wenn die C1a/C1b-Domäne fehlt. Wird der nukleäre

Export in diesen Zellen mit LMB blockiert, lokalisiert etwa nur die Hälfte des EGFP-PKD2-ΔC1a/C1b-Proteins im Kern (Abb. 13). Die C1a/C1b-Domäne scheint daher eine wichtige Rolle in der Regulation der Kernlokalisation von PKD2 zu spielen.

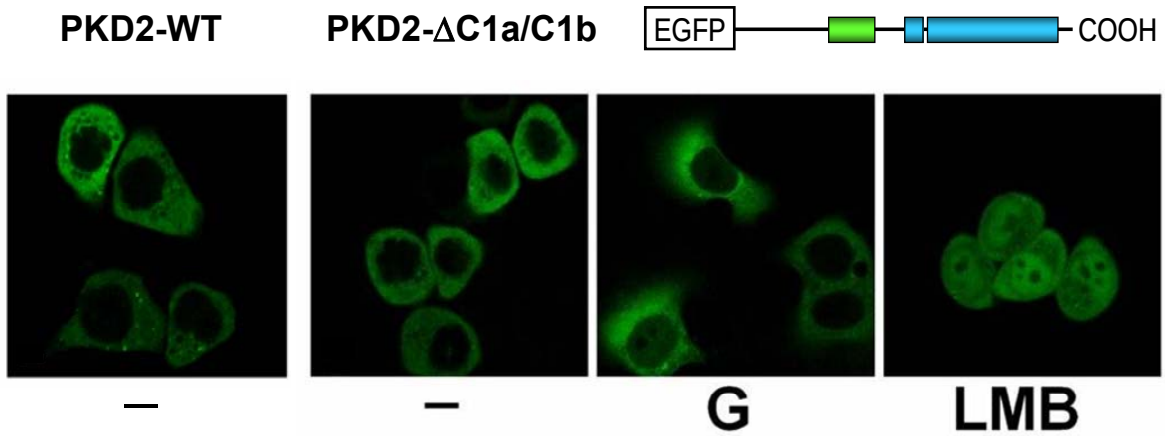

Abb. 13: Subzelluläre Lokalisation der Mutante EGFP-PKD2-ΔC1a/C1b. Nach Transfektion von AGS-B-Zellen mit EGFP-PKD2-ΔC1a/C1b wurden die Zellen jeweils nicht stimuliert (-), für 40 min mit 100 nM Gastrin (G) oder für 1 h mit 10 ng/ml Leptomycin B (LMB) inkubiert. Links zum Vergleich: unstimulierte AGS-B-Zellen transfiziert mit EGFP-PKD2-WT (Abbildungen entstanden in Zusammenarbeit mit Julia von Blume).

3.2.2.1 Funktion der C1a-Domäne bei der Lokalisation

Um die Bedeutung der C1-Domänen in PKD2 für deren nukleäre Lokalisation zu untersuchen, wurde eine Mutante von PKD2 hergestellt, die nur die C1a-Domäne von PKD2 besitzt (PKD2-C1a; AS 1-191) und die an EGFP gekoppelt wurde, um ihre subzelluläre Lokalisation verfolgen zu können (Abb. 14). Dieses Fusionsprotein ist sowohl im Zytoplasma als auch im Kern von transfizierten AGS-B-Zellen zu finden. Auch bei einer Inkubation mit Gastrin oder Leptomycin B veränderte sich die subzelluläre Lokalisation von PKD2-C1a kaum (Abb. 14, unten). Wie der Vergleich mit der subzellulären Verteilung von leerem EGFP-Vektor mit und ohne Gastrinbehandlung bzw. LMB zeigt, ist die Lokalisation der Mutante PKD2-C1a kaum vom leeren Vektor zu unterscheiden (Abb. 14, oben). Ihre Verteilung in der Zelle könnte aber auch an der geringen Größe des Fusionsproteins liegen, das eine Masse von ca. 45 kDa besitzt. Bis zu einer Masse von 50 kDa kann ein passiver, diffusiver nukleozytoplasmatischer Molekülaustausch über die Kernpore erfolgen.

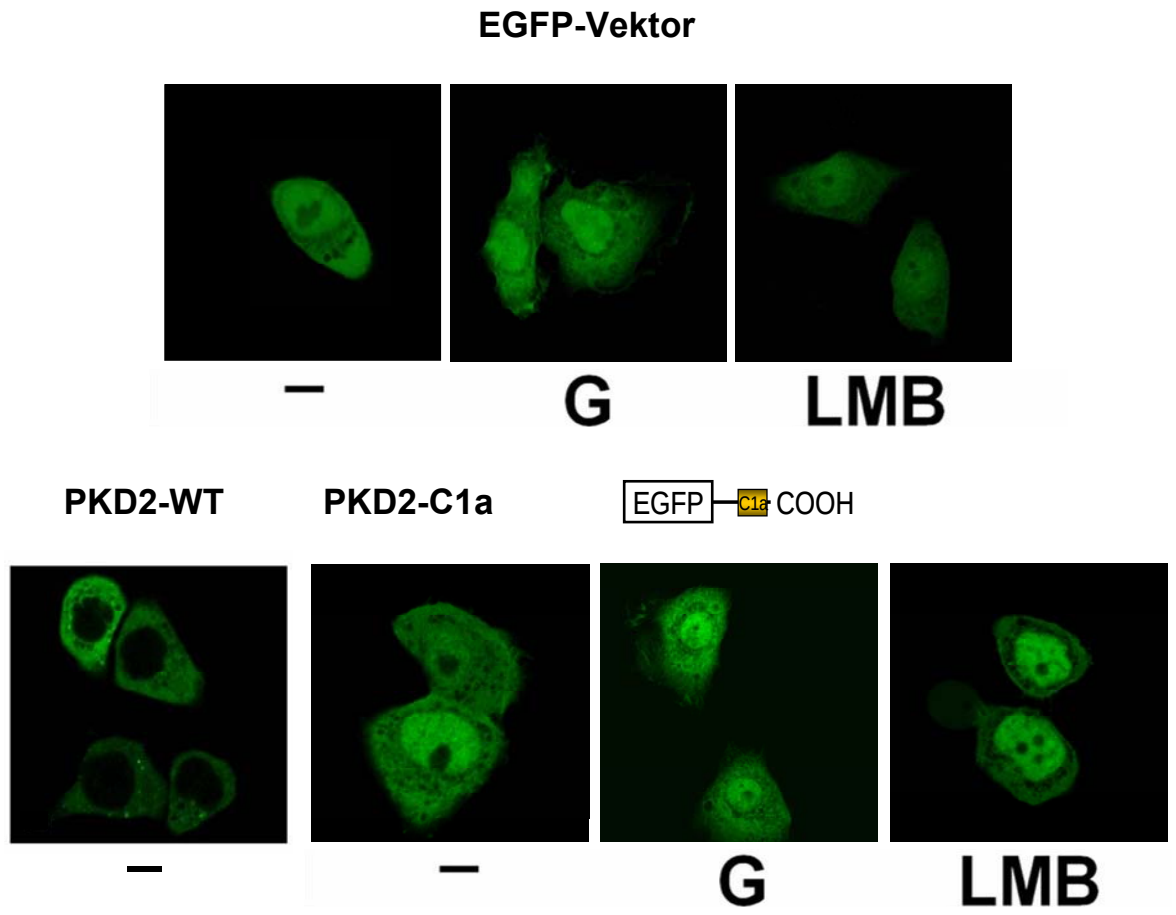

Abb. 14: Subzelluläre Lokalisation der Mutante EGFP-PKD2-C1a. Oben: AGS-B-Zellen wurden mit leerem EGFP-Vektor transfiziert und entweder für 40 min mit 100 nM Gastrin (G) oder für 1 h mit 10 ng/ml Leptomycin B (LMB) inkubiert. Unten: Nach Transfektion der AGS-B-Zellen mit EGFP-PKD2-C1a wurden die Zellen entweder für 40 min mit 100 nM Gastrin (G) oder für 1 h mit 10 ng/ml Leptomycin B (LMB) inkubiert. Links zum Vergleich: unstimulierte AGS-B-Zellen transfiziert mit EGFP-PKD2-WT. Links zum Vergleich: unstimulierte AGS-B-Zellen transfiziert mit EGFP-PKD2-WT (Abbildungen entstanden in Zusammenarbeit mit Julia von Blume).

Die C1a-Domäne von PKD2 enthält an ihrem C-Terminus die ersten elf Aminosäuren einer putativen „bipartite“ NLS (Abb. 12). Um herauszufinden, ob dieser erste Teil der bipartite NLS auch relevant für den nukleären Import von PKD2 ist, wurde die subzelluläre Lokalisation der PKD2-ΔC1a-Mutante, der diese C1a-Domäne fehlt, untersucht. Überraschenderweise war PKD2-ΔC1a bereits in unstimulierten AGS-B-Zellen großteils im Kern detektierbar. Eine Inkubation der Zellen mit Gastrin und Leptomycin B erhöhte die Menge an akkumuliertem PKD2-ΔC1a im Kern nicht weiter (Abb. 15). Das bedeutet, dass die C1a-Domäne eher ein funktionelles nukleäres Exportsignal als ein Importsignal besitzen muss.

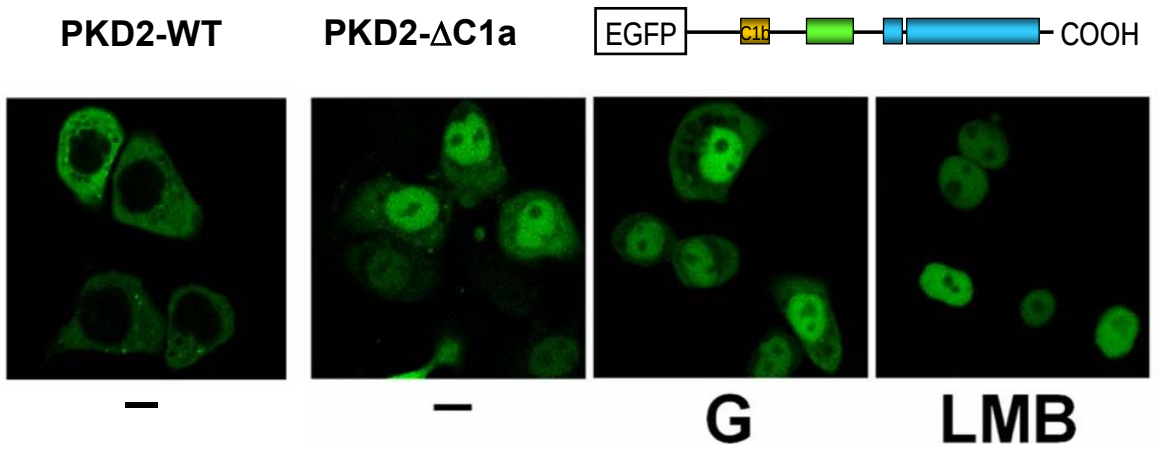

Abb. 15: Subzelluläre Lokalisation der Mutante EGFP-PKD2-ΔC1a. Nach Transfektion von AGS-B-Zellen mit EGFP-PKD2-ΔC1a wurden die Zellen jeweils nicht stimuliert (-), für 40 min mit 100 nM Gastrin (G) oder für 1 h mit 10 ng/ml Leptomycin B (LMB) inkubiert. Links zum Vergleich: unstimulierte AGS-B-Zellen transfiziert mit EGFP-PKD2-WT (Abbildungen entstanden in Zusammenarbeit mit Julia von Blume).

3.2.2.2 Ein nukleäres Exportsignal in der C1a-Domäne

Für nukleäre Exportsignale (NES) ist eine Reihe von Leucin- oder Valinresten (LLLXLLXXLXLX) charakteristisch. Ausgehend davon wurde eine mögliche NES in der C1a-Domäne von PKD2 zwischen den Aminosäuren 159 und 167 identifiziert, die von dem Programm NetNES nicht angegeben worden war (Abb. 16, oben; Abb. 12). Eine EGFP-PKD2-Mutante, die einen zweifachen Aminosäureaustausch in dieser putativen NES enthält, indem Leucin 159 und Valin 163 zu Alaninen verändert wurden (EGFP-PKD2-$L^{159}/V^{163}A$), akkumulierte im Gegensatz zu PKD2-Wildtyp auch im Kern von AGS-B-Zellen. Eine Behandlung der Zellen mit Gastrin führte zu keiner weiteren sichtbaren Zunahme von PKD2-$L^{159}/V^{163}A$ im Zellkern. Nur nach einer Behandlung mit Leptomycin B lokalisierte diese Mutante ausschließlich nukleär (Abb. 16). Somit stellt sich die Sequenz L^{159}/V^{163} in der C1a-Domäne von PKD2 als funktionelle NES dar und ist ein wichtiges Element des Exports von PKD2 aus dem Zellkern ins Zytoplasma.

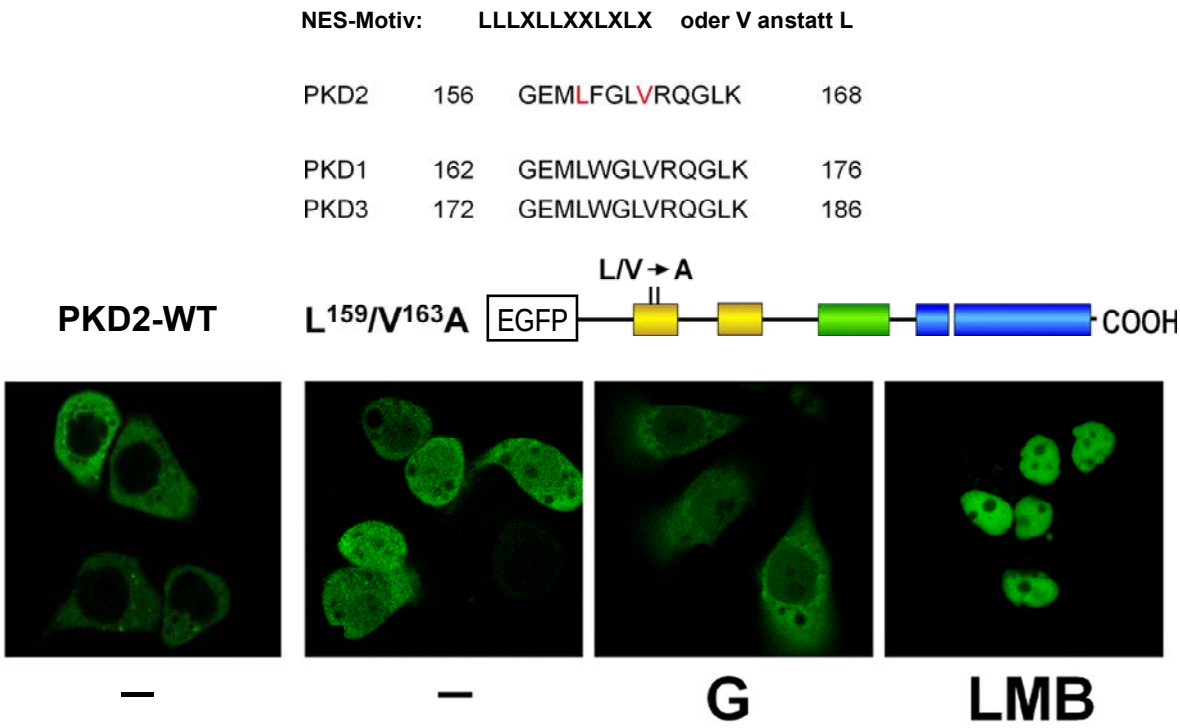

Abb. 16: Subzelluläre Lokalisation der Mutante EGFP-PKD2-L^{159}/V^{163}A. Oben: Schema der Mutation eines putativen NES-Motivs in der C1a-Domäne. Dieses Motiv ist in der PKD-Familie hochkonserviert. In PKD2 wurden das Leucin (L) 159 und das Valin (V) 163 zu Alanin (A) mutiert. (X = beliebige Aminosäure). Unten: Nach der Transfektion von AGS-B-Zellen mit dieser Mutante EGFP-PKD2-L^{159}/V^{163}A wurden die Zellen für 40 min mit 100 nM Gastrin (G) oder für 1 h mit 10 ng/ml Leptomycin B (LMB) inkubiert. Links zum Vergleich: unstimulierte AGS-B-Zellen transfiziert mit EGFP-PKD2-WT (Abbildungen entstanden in Zusammenarbeit mit Julia von Blume).

3.2.2.3 NLS im Linker zwischen C1a- und C1b-Domäne

Die nukleären Lokalisationssequenzen (NLSs), die den Import in den Kern vermitteln, werden in verschiedene Kategorien unterteilt. Die klassische NLS stellt ein Muster aus vier basischen Aminosäuren (K oder R; pat4 NLS) dar (Hicks und Raikhel, 1995). Eine zweiteilige „bipartite“ NLS besteht aus zwei basischen Aminosäuren, einem „Spacer“ von zehn Aminosäuren und einer weiteren Region mit mindestens drei basischen Aminosäuren aus insgesamt fünf Aminosäuren (Robbins *et al.*, 1991). Die cysteinreichen Zinkfingerdomänen von PKD1 enthalten ein solches putatives „bipartite“ Kernimportsignal (Rey *et al.*, 2001a). Ähnliche Signalsequenzen sind in PKD2 am C-Terminus der C1a-Domäne und im Verbindungsstück, dem „Linker“, zwischen C1a und C1b zu finden. Wie die Lokalisationsstudien der PKD2-ΔC1a zeigten, enthält die C1a-Domäne kein nukleäres Importsignal, womit sich der erste Teil dieser putativen „bipartite“ NLS in PKD2 als nicht funktionell relevant erwies (siehe Abb. 15). Der zweite Teil dieser

„bipartite“ NLS im „Linker“ zwischen C1a und C1b von PKD2 (^{192}RKRR^{195}) stellt für sich selbst eine „monopartite pat4“ NLS dar (Abb. 17, oben). Um festzustellen, ob diese Sequenz eine funktionelle Relevanz für die Lokalisation von PKD2 hat, wurden das Lysin 193 und das Arginin 194 mittels „site-directed mutagenesis“ (siehe Abschnitt 2.2.6.2) jeweils zu Alanin und Glycin mutiert. Diese Mutante, EGFP-PKD2-K^{193}A/R^{194}G, war größtenteils im Zytoplasma von unstimulierten AGS-B-Zellen lokalisiert. Interessanterweise gab es keine Akkumulation im Zellkern von EGFP-PKD2-K^{193}A/R^{194}G nach Behandlung der Zellen sowohl mit Gastrin als auch mit Leptomycin B (Abb. 17, unten). Folglich ist die „monopartite pat4“ NLS im Verbindungsstück zwischen der C1a- und der C1b-Domäne von PKD2 für den nukleären Import von PKD2 funktionell relevant.

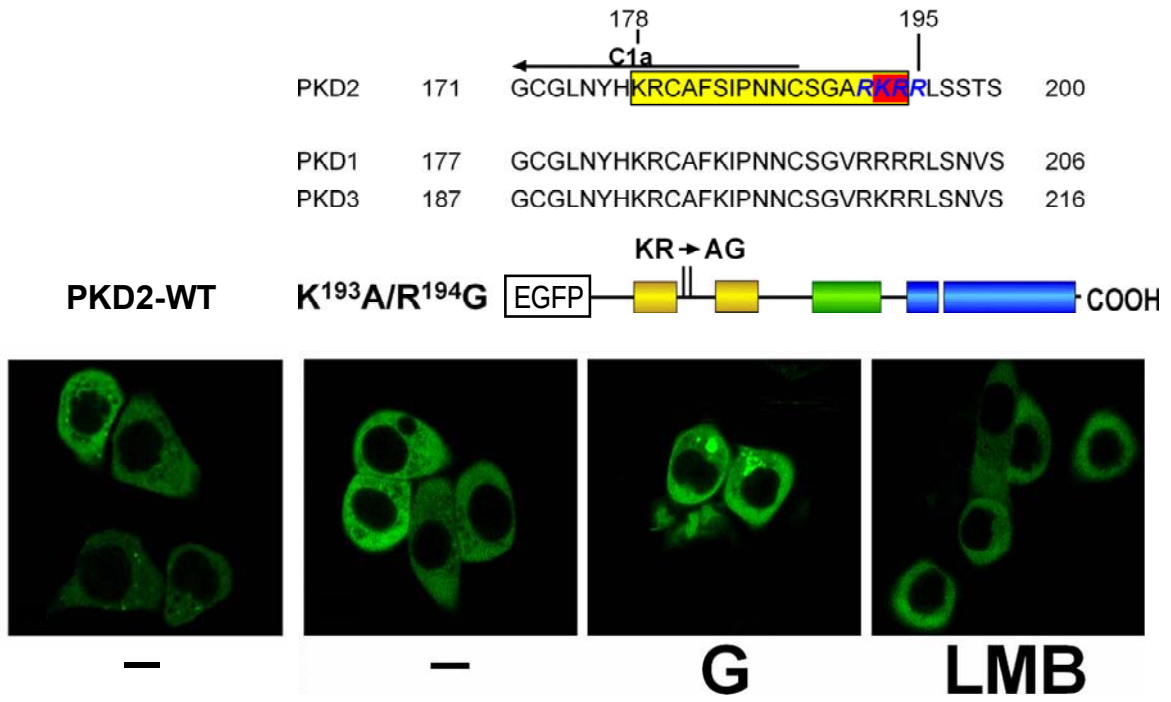

Abb. 17: Subzelluläre Lokalisation der Mutante EGFP-PKD2-K^{193}A/R^{194}G. Oben: Schema der Mutation eines putativen NLS-Motivs C-terminal der C1a-Domäne von PKD2. Dieses Motiv ist in der PKD-Familie hochkonserviert. In PKD2 wurden das Lysin 193 und das Arginin 194 zu Alanin bzw. Glycin mutiert. Unten: Nach Transfektion von AGS-B-Zellen mit dieser Mutante EGFP-PKD2-K^{193}A/R^{194}G wurden die Zellen für 40 min mit 100 nM Gastrin (G) oder für 1 h mit 10 ng/ml Leptomycin B (LMB) inkubiert. Links zum Vergleich: unstimulierte AGS-B-Zellen transfiziert mit EGFP-PKD2-WT (Abbildungen entstanden in Zusammenarbeit mit Julia von Blume).

3.2.2.4 Funktion der C1b-Domäne bei der Lokalisation

Um zu untersuchen, in wie weit die C1b-Domäne von PKD2 die subzelluläre Lokalisation der Kinase beeinflußt, wurde eine Mutante generiert, die nur die C1b-Domäne von PKD2 enthält (PKD2-C1b; AS 265-315) und an EGFP gekoppelt

wurde (Abb. 18). Diese PKD2-C1b war sehr gleichmäßig in den transfizierten AGS-B-Zellen verteilt. Wurden die Zellen mit Gastrin inkubiert, stieg die Lokalisation von EGFP-PKD2-C1b im Zellkern etwas an. Mit Leptomycin B konnte dieser Effekt noch verstärkt werden, jedoch verblieb noch viel Fusionsprotein im Zytoplasma (Abb. 18, unten). Wie bei der Mutante EGFP-PKD2-C1a ist auch hier die subzelluläre Verteilung von EGFP-PKD2-C1b vom leeren EGFP-Vektor kaum zu unterscheiden (Abb. 18, oben), sie könnte aber auch auf die relativ geringe Größe des Proteins zurückzuführen sein. Mit einer Masse von ca. 32 kDa ist es wahrscheinlich, dass ein Großteil dieser Mutante mittels Diffusion durch den Kern wandert. Das Experiment mit Leptomycin B konnte zeigen, dass der Kernexport von EGFP-PKD2-C1b zumindest in geringem Ausmaß Crm-1-abhängig zu sein scheint.

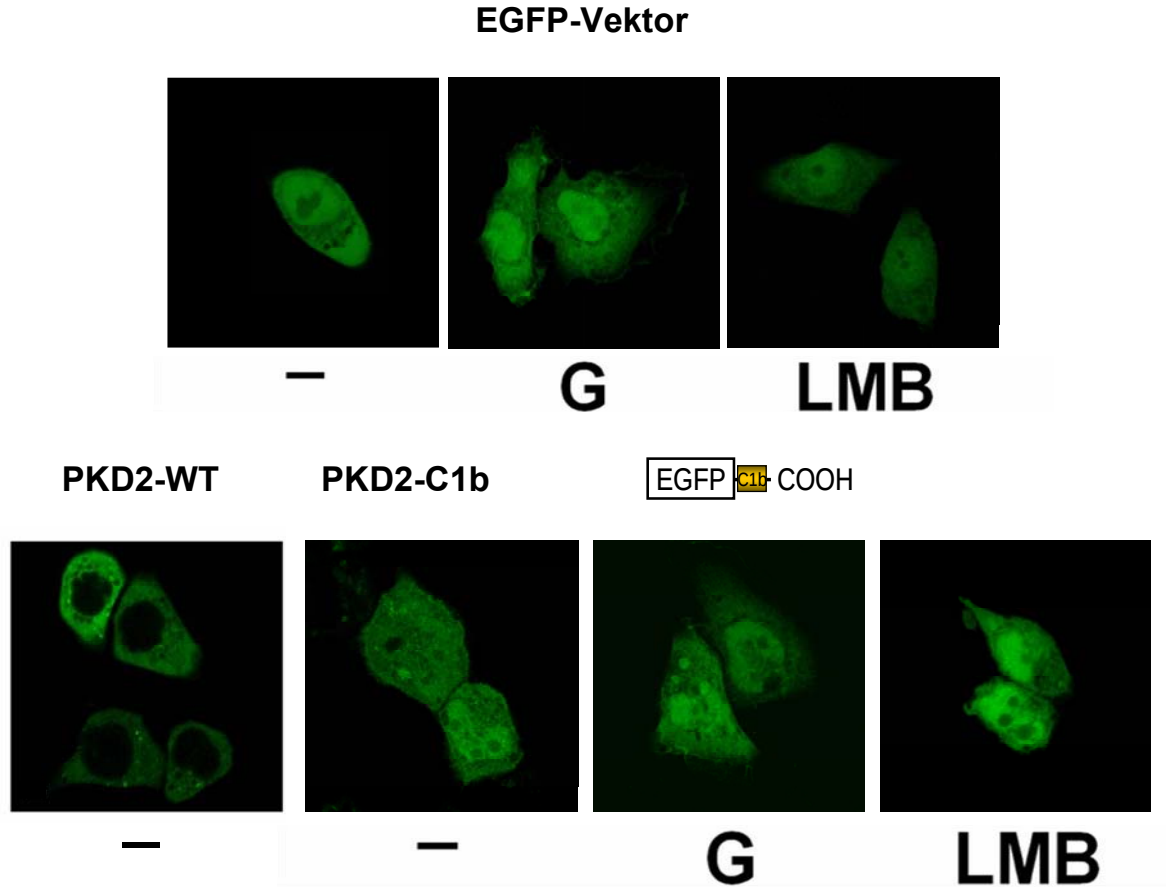

Abb. 18: Subzelluläre Lokalisation der Mutante EGFP-PKD2-C1b. Oben: AGS-B-Zellen wurden mit leerem EGFP-Vektor transfiziert und entweder für 40 min mit 100 nM Gastrin (G) oder für 1 h mit 10 ng/ml Leptomycin B (LMB) inkubiert. Unten: Nach Transfektion der AGS-B-Zellen mit EGFP-PKD2-C1b wurden die Zellen entweder für 40 min mit 100 nM Gastrin (G) oder für 1 h mit 10 ng/ml Leptomycin B (LMB) inkubiert. Links zum Vergleich: unstimulierte AGS-B-Zellen transfiziert mit EGFP-PKD2-WT (Abbildungen entstanden in Zusammenarbeit mit Julia von Blume).

Als Nächstes wurde untersucht, ob die Mutante PKD2-ΔC1b, die keine Lipide mehr bindet (siehe Abb. 9), auch eine Rolle in der Regulation des nukleozytoplasmatischen Shuttling von PKD2 spielen könnte. Wie in Abb. 19 gezeigt, war PKD2-ΔC1b größtenteils im Zytoplasma unstimulierter AGS-B-Zellen detektierbar. Diese Erkenntnis steht im Gegensatz zur Lokalisation von PKD2-ΔC1a, die unstimuliert im Kern zu finden ist. Außerdem kam es zu keiner sichtbaren nukleären Akkumulation von PKD2-ΔC1b bei einer Stimulation der AGS-B-Zellen mit Gastrin. Wurden die Zellen jedoch mit Leptomycin B inkubiert und damit der Crm1-abhängige Kernexport blockiert, war PKD2-ΔC1b fast vollständig im Kern vorzufinden. Das bedeutet, dass nach der Deletion der C1b-Domäne von PKD2 diese Mutante, im Gegensatz zu PKD2-ΔC1a, immer noch kontinuierlich in den Kern importiert und aus dem Kern exportiert wird. Da sie dabei allerdings den Kern sehr schnell verläßt, und somit ihr Export schneller ist als ihr Import, ist sie unstimuliert hauptsächlich in Zytoplasma sichtbar.

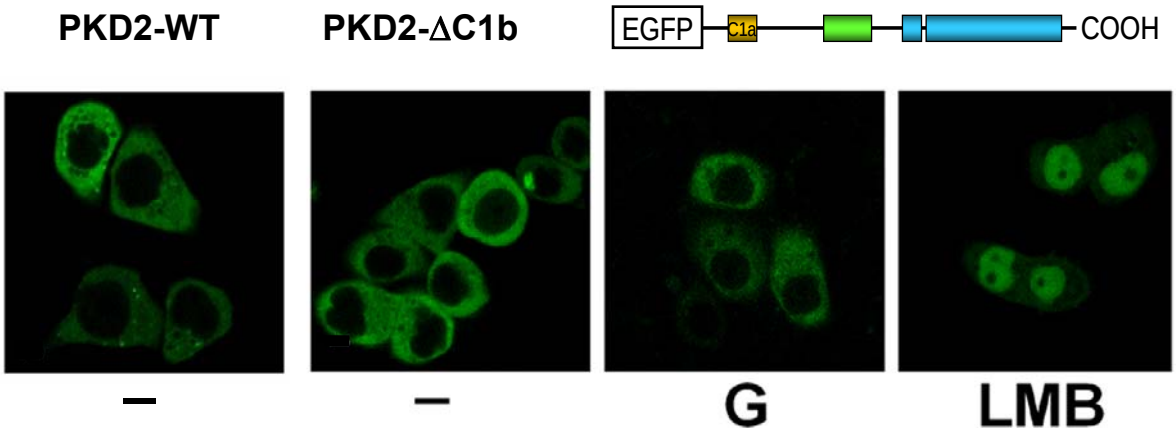

Abb. 19: Subzelluläre Lokalisation der Mutante EGFP-PKD2-ΔC1b. Nach Transfektion von AGS-B-Zellen mit EGFP-PKD2-ΔC1b wurden die Zellen jeweils für 40 min mit 100 nM Gastrin (G) oder für 1 h mit 10 ng/ml Leptomycin B (LMB) inkubiert. Links zum Vergleich: unstimulierte AGS-B-Zellen transfiziert mit EGFP-PKD2-WT (Abbildungen entstanden in Zusammenarbeit mit Julia von Blume).

3.2.3 Einfluss der Pleckstrin-Homologiedomäne auf die Lokalisation von PKD2

Es ist gezeigt worden, dass PKD1 in ihrer PH-Domäne ein funktionelles nukleäres Exportsignal enthält, da die Mutante PKD1-ΔPH bereits in unstimulierten Zellen im Kern lokalisiert (Rey *et al.*, 2001a). Wie in Abb. 12 gezeigt, fand das Programm NetNES hingegen in PKD2 keine NES in der PH-Domäne, jedoch erkannte das Programm pSortII in der PH-Domäne von PKD2 eine putative NLS mit dem Motiv

^{414}RKRH^{417} (Abb. 20, oben). Untersuchungen der PKD2-Mutante, der die gesamte PH-Domäne fehlt (PKD2-ΔPH), zeigten, dass PKD2-ΔPH in unstimulierten Zellen vorherrschend im Zytoplasma und um den Kern zu finden war (Abb. 20). PKD2-ΔPH akkumulierte jedoch nicht im Kern. Nur nach Inkubation mit Gastrin und Leptomycin B war EGFP-PKD2-ΔPH klar im Kern von AGS-B-Zellen zu sehen (Abb. 20, unten). Damit ähnelt die subzelluläre Lokalisation von PKD2-ΔPH in unstimulierten Zellen sehr der des PKD2-Wildtyps. Folglich enthält die PH-Domäne von PKD2 im Gegensatz zu PKD1 keine funktionelle NES. Die von pSortII vorgeschlagene NLS in der PH-Domäne von PKD2 ist ebensowenig funktionell wirksam.

```
PKD2    399  LREGWVVHYSNKDTLRKRHYWRLDCKCITLFQNNTTNRYYKEIPLSEILTVESAQNFSLVP  459
PKD1    323  MKEGWMVHYTSKDTLRKRHYWRLDSKCITLFQNDTGSRYYKEIPLSEILSLEPVKTSALIP  483

PKD2    460  PGTNPHCFEIVTANATYFVGEMPGGTPGGPS_______GQGAEAARGWETAIRQALM       509
PKD1    484  NGANPHCFEITTANVVYYVGENVVN_PSSPSPNNSVLTSGVGADVARMWEIAIQHALM       533
```

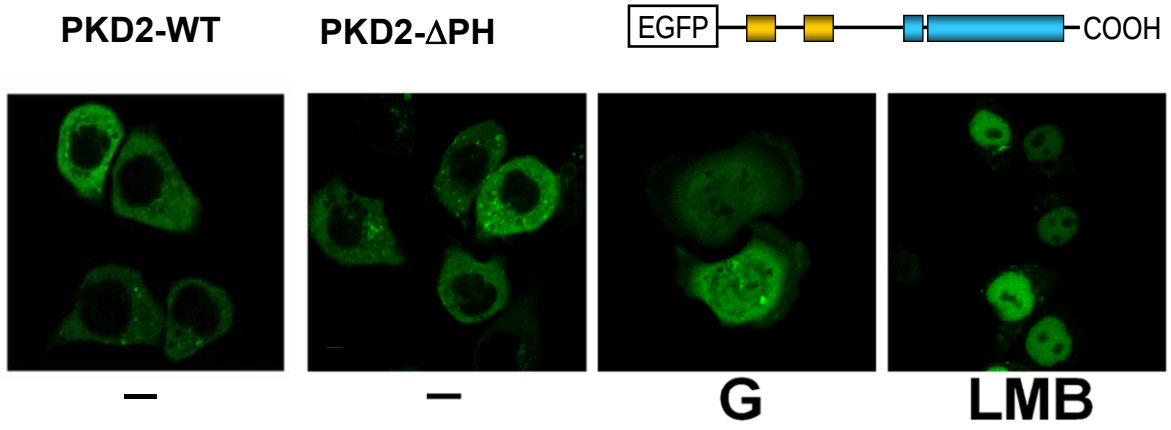

Abb. 20: Subzelluläre Lokalisation der Mutante EGFP-PKD2-ΔPH. Oben: Vergleich der Aminosäurensequenz der PH-Domänen von PKD2 und PKD1. Das putative NLS-Motiv in PKD2 wurde rot markiert. Dieses Motiv ist auch in PKD1 vorhanden. Unten: Nach Transfektion von AGS-B-Zellen mit dieser Mutante EGFP-PKD2-ΔPH wurden die Zellen für 40 min mit 100 nM Gastrin (G) oder für 1 h mit 10 ng/ml Leptomycin B (LMB) inkubiert. Links zum Vergleich: unstimulierte AGS-B-Zellen transfiziert mit EGFP-PKD2-WT (Abbildungen entstanden in Zusammenarbeit mit Julia von Blume).

3.2.4 Einfluss der Kinasedomäne auf die Lokalisation von PKD2

Welche Rolle nun die katalytische Domäne, die mehrere putative nukleäre Exportsignale trägt (siehe Abb. 12), bei der Lokalisation von PKD2 spielt, wurde anhand einer PKD2-Mutante untersucht, in der die gesamte katalytische Domäne deletiert wurde (PKD2-ΔKD). Diese Mutante war bereits ohne Stimulation der Zellen im Zellkern lokalisiert. Das EGFP-PKD2-ΔKD Fusionsprotein hat eine

Masse von ca. 80 kDa und kann somit nur aktiv und nicht über Diffusion in oder aus dem Kern transportiert werden. Die Inkubation mit Gastrin zeigte keine weitere Veränderung der subzellulären Lokalisation von PKD2-ΔKD (Abb. 21). Fehlen der PKD2 also diese NESs in der Kinasedomäne, so wird der kontinuierliche Austausch des PKD2-Proteins zwischen Zellkern und Zytoplasma unterbrochen und PKD2-ΔKD akkumuliert aufgrund des wahrscheinlich beeinträchtigten Exports im Kern.

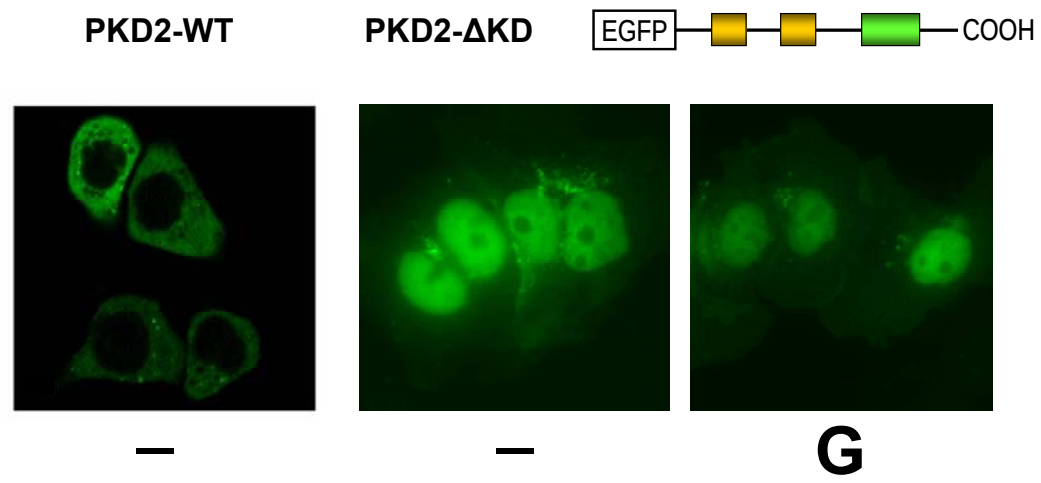

Abb. 21: Subzelluläre Lokalisation der Mutante EGFP-PKD2-ΔKD. Nach Transfektion von AGS-B-Zellen mit dieser Mutante EGFP-PKD2-ΔKD wurden die Zellen für 40 min mit 100 nM Gastrin (G) inkubiert. Links zum Vergleich: unstimulierte AGS-B-Zellen transfiziert mit EGFP-PKD2-WT (Abbildungen entstanden in Zusammenarbeit mit Julia von Blume).

3.2.5 Zusammenfassung: Einfluss der regulatorischen Domäne auf die subzelluläre Lokalisation von PKD2

Die Lokalisation der Proteinkinase D2 wird maßgeblich über die nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) in der C1a-Domäne und über die nukleäre Exportsequenz (NES) C-terminal der C1a-Domäne gesteuert (Abb. 22). Des Weiteren beeinflussen NESs in der Kinasedomäne die subzelluläre Lokalisation von PKD2. Die PH-Domäne hat in PKD2 im Gegensatz zur PH-Domäne in PKD1 keine nukleär lokalisierende Funktion.

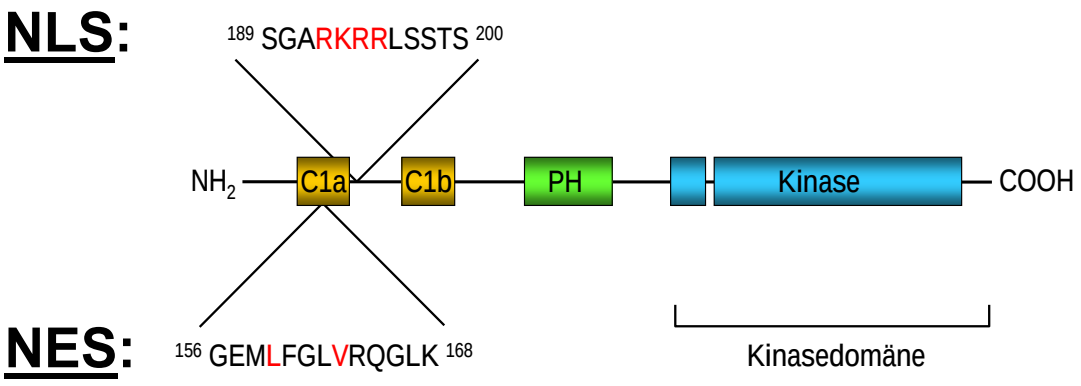

Abb. 22: Schematische Zusammenfassung der funktionellen Lokalisationssignale in der Domänenstruktur von PKD2.

3.3 Bedeutung distinkter Domänen für die katalytische Aktivität von PKD2

Ziel der folgenden Arbeiten war es, die Regulation der katalytischen Aktivität von PKD2 zu untersuchen. Hierbei wurden die Aufgaben einzelner Strukturen in PKD2 mittels Mutagenese von putativen regulatorischen Sequenzen und anschliessender Funktionsanalyse der Kinase analysiert. Zum einen wurde in Autokinaseassays geprüft, in wie weit die Kinase fähig ist, sich selbst zu phosphorylieren. Zum anderen konnte in Substratphosphorylierungsassays die katalytische Aktivität von PKD2 durch die Phosphorylierung des artifiziellen Substrates Histon dargestellt werden.

3.3.1 Einfluss der Zinkfingerdomänen auf die Aktivität von PKD2

Wir konnten bereits zeigen, dass den cysteinreichen Zinkfingerdomänen eine wichtige Rolle bei der Phorbolesterbindung und der subzellulären Lokalisation von PKD2 zukommt. Die C1a-Domäne und ihre C-terminal benachbarten Sequenzen erwiesen sich als Regulatoren des nukleären Transports von PKD2, wohingegen die C1b-Domäne für die Bindung von Phorbolester, dem Surrogat für Diacylglycerol (DAG), und damit wahrscheinlich für die DAG-abhängige Aktivierung von PKD2 verantwortlich ist. Hier soll nun untersucht werden, welche Aufgaben die Zinkfingerdomänen bei der Aktivierung von PKD2 haben und in wie fern die beiden C1-Domänen dabei Unterschiede aufweisen.

Um die regulatorischen Möglichkeiten der C1a/C1b-Domäne genauer zu bestimmen, wurde jeweils die katalytische Aktivität von PKD2-Wildtyp bzw. der

Deletionsmutanten PKD2-ΔC1a/C1b, PKD2-ΔC1a und PKD2-ΔC1b in AGS-B humanen Magenkarzinomzellen in *in vitro*-Kinaseassays unter Verwendung von Histon als Substrat untersucht. Die Aktivität der PKD2-ΔC1a/C1b-Mutante war im Vergleich zum PKD2-Wildtyp geringfügig höher und konnte durch Inkubation der Zellen mit Gastrin in unstimulierten Zellen auf nur ca. 65% der Aktivität des stimulierten Wildtyps angehoben werden. PKD2-ΔC1a zeigte nur einen ca. 20%igen, nicht signifikanten Anstieg in der basalen Kinaseaktivität, was mit der PKD2-ΔC1a/C1b-Mutante vergleichbar war. Wenn die Zellen jedoch mit Gastrin inkubiert wurden, führte das zu einem ähnlich starken Anstieg in der katalytischen Aktivität von PKD2-ΔC1a wie bei PKD2-ΔC1a/C1b und erreichte ca. 60% der Aktivität von stimuliertem PKD2-Wildtyp (Abb. 23). Im Gegensatz dazu befand sich die katalytische Aktivität von PKD2-ΔC1b auf einem sehr niedrigen basalen Level, und eine Inkubation der Zellen mit Gastrin führte, verglichen mit der basalen Aktivität dieser Mutante, nur zu einem 50%igen Anstieg der katalytischen Aktivität. Dieser Aktivitätsanstieg liegt jedoch immer noch unterhalb der Aktivität des unstimulierten PKD2-Wildtyps. Also scheint die C1b-Domäne eine ausschlaggebende Rolle für die katalytische Aktivität von PKD2 zu spielen. Wie in Abb. 9 gezeigt, bindet PKD2-ΔC1b keinen Phorbolester. Wenn jedoch die Zellen mit Gastrin inkubiert wurden, war diese Mutante immer noch an den kritischen Aminosäureresten Serin 706 und Serin 710 im Aktivierungsloop phosphoryliert, ebenso wie die PKD2-ΔC1a-Mutante (Abb. 24). Daher ist die Phosphorylierung von PKD2 durch PKCs an diesen Aminosäureresten nicht ausreichend, um eine maximale katalytische Aktivität von PKD2 zu vermitteln, wenn die Lipid-bindende C1b-Domäne fehlt.

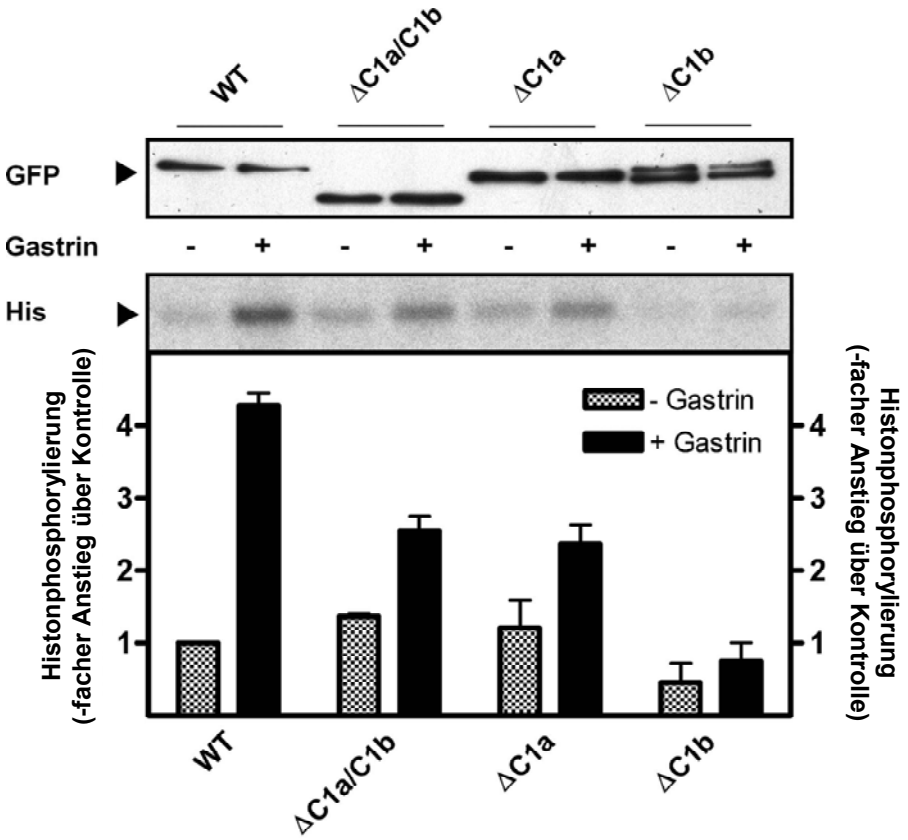

Abb. 23: Effekt der C1a/C1b-Domäne auf die katalytische Aktivität von PKD2 in AGS-B-Zellen. Oben: Die gleichmäßige Expression der transfizierten EGFP-PKD2-Konstrukte wurde mittels anti-GFP-Western Blot (GFP) nachgewiesen. Unten: Die katalytische Aktivität der transfizierten Konstrukte EGFP-PKD2-WT, -ΔC1a/C1b, -ΔC1a und -ΔC1b wurde durch einen Histonphosphorylierungsassay (His) bestimmt. Die transfizierten AGS-B-Zellen wurden unbehandelt belassen (-) oder für 15 min mit 100 nM Gastrin inkubiert (+). Die Histonphosphorylierung wurde mittels Densitometrie quantifiziert. Die Daten wurden graphisch als -facher Anstieg bezüglich Kontrolle (unstimulierter EGFP-PKD2-WT) dargestellt und sind die Mittelwerte ± SE von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

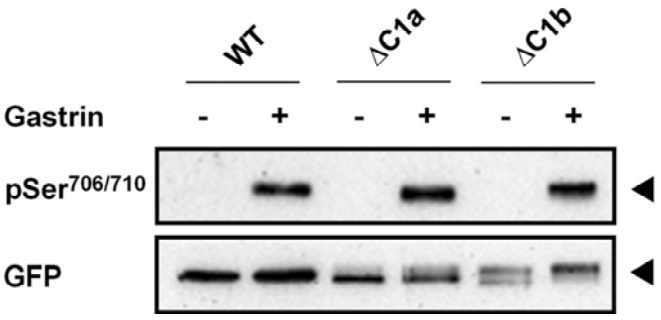

Abb. 24: Rolle der Zinkfingerdomänen bei der Phosphorylierung der katalytischen Schleife von PKD2 in AGS-B-Zellen. AGS-B-Zellen wurden mit den Konstrukten in EGFP-PKD2-WT, -ΔC1a und -ΔC1b transfiziert und unbehandelt belassen (-) oder für 15 min mit 100 nM Gastrin inkubiert (+). Es wurden Western Blots-Analysen mit einem Antikörper gegen $pSer^{706/710}$ ($pSer^{706/710}$) und mit dem anti-GFP-Antikörper (GFP) durchgeführt.

Daraus wird ersichtlich, dass sich die C1a- und C1b-Domäne auch in ihren regulatorischen Eigenschaften auf die katalytische Aktivität von PKD2 grundsätzlich unterscheiden. Die PKD2-ΔC1a/C1b-Mutante und im Besonderen die kleineren Deletionen der C1a- und der C1b-Domäne zeigen, dass keine dieser Deletionsmutanten eine inhibitorische Rolle bei der Regulation der Aktivität der PKD2 spielt, wie es für PKD1 gezeigt wurde (Iglesias *et al*., 1999).
Im Gegensatz dazu scheint die Lipid-bindende C1b-Domäne für die Aktivierung von PKD2 ausschlaggebend zu sein und kann deshalb als aktivierende Regulationsdomäne der katalytischen Aktivität von PKD2 angesehen werden.

3.3.2 Rolle der Pleckstrin-Homologiedomäne bei der Aktivierung von PKD2

Die regulatorische Domäne von PKD2 umfaßt die Zinkfingerdomänen und die Pleckstrin-Homologie- (PH-) Domäne. Den Zinkfingerdomänen wurden bereits vielfältige Aufgaben zugesprochen, jedoch ist die Funktion der PH-Domäne in PKD2 noch nicht geklärt. Daher wurde die katalytische Aktvität einer PKD2-Mutante untersucht, der die PH-Domäne fehlt (PKD2-ΔPH; siehe Abb. 7).
Die Deletion der PH-Domäne in PKD2 verursachte einen erheblichen Anstieg in der katalytischen Aktivität von PKD2 sowohl bezüglich der Autokinaseaktivität als auch im Substratphosphorylierungsassay mit Histon als artifiziellem Substrat für PKD2. Die katalytische Aktivität von PKD2-ΔPH steigt in HEK293-Zellen im Autokinaseassay auf das Vierfache des PKD2-Wildtyps an (Abb. 26, links).
Die Deletionsmutante PKD2-ΔPH ist bereits basal konstitutiv aktiv, und ihre katalytische Aktivität kann durch eine Inkubation mit Gastrin in AGS-B-Zellen nicht mehr erhöht werden (Abb. 27, unten). Jedoch zeigte die PKD2-ΔPH, obwohl ihre katalytische Aktivität von exogener Stimulation unabhängig ist, dass sie trotzdem bei einer Stimulation der Zellen in der katalytischen Schleife von PKC phosphoryliert wird (Abb. 27, oben).
Daraus ergibt sich für die PH-Domäne eine Aufgabe als inhibitorischer Regulator der katalytischen Aktivität von PKD2.

3.3.3 Aktivität-bestimmende Aminosäuren in der Kinasedomäne von PKD2

Um die Annahme zu unterstützen, dass die Phosphorylierung an den Serinen 706 und 710 die Aktivierung der Kinase bestimmt (Sturany *et al*., 2002), wurde die

katalytische Aktivität einer PKD2-$S^{706/710}$E-Mutante untersucht, in der diese beiden Serine gegen Glutamat ausgetauscht wurden, was eine Transphosphorylierung durch PKCs an diesen Stellen nachahmt (Mihailovic *et al.*, 2004; Abb. 25). Diese PKD2-$S^{706/710}$E-Mutante ist mit einer vierfachen katalytischen Aktivität gegenüber dem Wildtyp von PKD2 maximal aktiv sowohl im Autophosphorylierungsassay als auch im Histonassay in HEK293-Zellen (Abb. 26). Ihre katalytische Aktivität konnte in AGS-B-Zellen auch durch eine Behandlung mit Gastrin nicht mehr weiter gesteigert werden (Abb. 27). Diese PKD2-$S^{706/710}$E-Mutante stellt eine konstitutiv aktive PKD2-Mutante dar.

Die katalytische Aktivität der PKD2 ist erwartungsgemäß stark vom DFG-Motiv in der Kinasedomäne abhängig (siehe Abschnitt 1.4). Wenn in diesem Motiv das Aspartat zu Alanin mutiert wird (PKD2-D^{695}A, Abb. 25), kommt es zur Hemmung der katalytischen Aktivität von PKD2, sowohl im Autokinaseassay als auch im Histonassay (Abb. 26). Auch eine Inkubation mit Gastrin veränderte nichts an der katalytischen Inaktivität von PKD2-D^{695}A (Abb. 27, unten). Jedoch kann in dieser Mutante nach einer Behandlung der Zellen mit Gastrin immer noch die PKC-abhängige Phosphorylierung an Serin 706 und 710 in der katalytischen Schleife nachgewiesen werden (Abb. 27, oben).

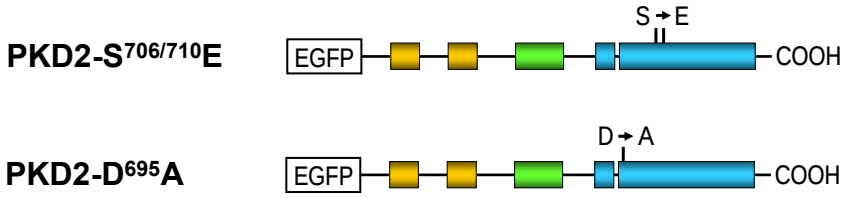

Abb. 25: Schematische Darstellung der PKD2-Mutanten EGFP-PKD2-S$^{706/710}$E und -D^{695}A.

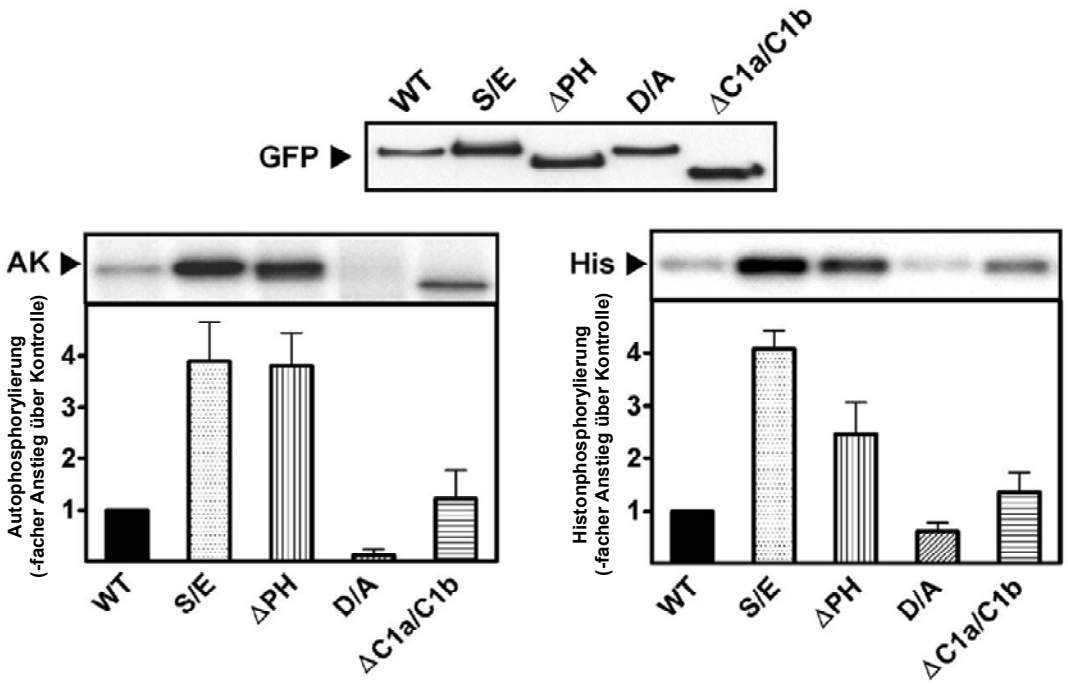

Abb. 26: Effekt der verschiedenen Domänen in PKD2 auf ihre katalytische Aktivität in HEK293-Zellen. HEK293-Zellen wurden mit den Konstrukten EGFP-PKD2-WT, -S$^{706/710}$E, -ΔPH, -D^{695}A und -ΔC1a/C1b transfiziert. Oben: Die gleichmäßige Expression der transfizierten EGFP-PKD2-Konstrukte wurde mittels anti-GFP-Western Blot (GFP) nachgewiesen. Unten: Die katalytische Aktivität der transfizierten Konstrukte EGFP-PKD2-WT, -S$^{706/710}$E, -ΔPH, -D^{695}A und -ΔC1a/C1b wurde durch Autophosphorylierungsassays (AK, links) und Histonphosphorylierungs-assays (His, rechts) in unbehandelten HEK293-Zellen bestimmt. Die Auto- und Histonphosphorylierung wurde mittels Densitometrie quantifiziert. Die Daten wurden graphisch als -facher Anstieg bezüglich Kontrolle (EGFP-PKD2-WT) dargestellt und sind die Mittelwerte ± SE von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

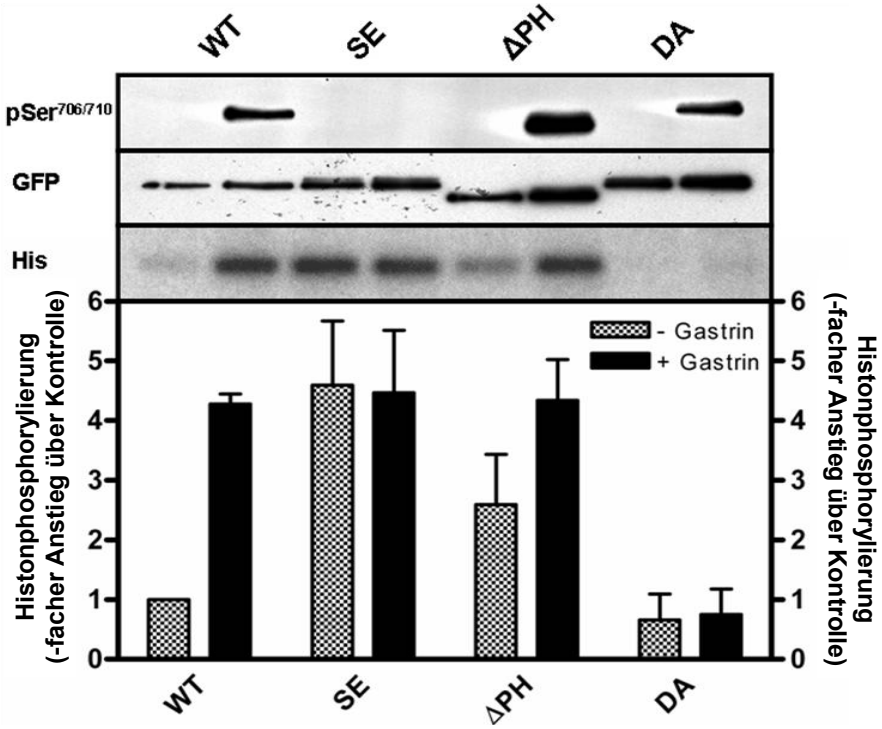

Abb. 27: Rolle der PKD2-Domänen in der katalytischen Aktivität von PKD2 in AGS-B-Zellen. Die Konstrukte EGFP-PKD2-WT, -$S^{706/710}$E, -ΔPH und -D^{695}A in AGS-B-Zellen transfiziert und unbehandelt belassen (-) oder mit 100 nM Gastrin für 15 min inkubiert worden. Oben: Mittels Western Blot-Analysen mit einem Antikörper gegen $pSer^{706/710}$ ($pSer^{706/710}$) wurde die Phosphorylierung der katalytischen Schleife bestimmt und einem anti-GFP-Antikörper (GFP) wurde die gleichmäßige Expression der EGFP-PKD2-Konstrukte nachgewiesen. Unten: Die katalytische Aktivität der transfizierten Konstrukte EGFP-PKD2-WT, -$S^{706/710}$E, -ΔPH und -D^{695}A wurde durch einen Histonphosphorylierungsassay (His) bestimmt. Die transfizierten AGS-B-Zellen wurden unbehandelt belassen (-, grauer Balken) oder für 15 min mit 100 nM Gastrin inkubiert (+, schwarzer Balken). Die Histonphosphorylierung wurde mittels Densitometrie quantifiziert. Die Daten wurden graphisch als -facher Anstieg bezüglich Kontrolle (unbehandelter EGFP-PKD2-WT) dargestellt und sind die Mittelwerte ± SE von mindestens drei unabhängigen Experimenten.

3.4 Einfluss der katalytischen Aktivität auf die subzelluläre Lokalisation von PKD2

Eine Mutation des NES-Motivs L^{159}/V^{163} in der C1a-Domäne von PKD2 führte dazu, dass bereits in unbehandelten Zellen diese PKD2-Mutante zum Teil im Kern lokalisiert ist (Abb. 28; siehe Abschnitt 3.2.2.2). Dies bedeutet, dass die PKD2-L^{159}/V^{163}A-Mutante, anstatt ständigem Austausch zwischen Zytoplasma und Kern wie beim PKD2-Wildtyp, zwar noch in den Kern gelangen kann, aber ein Großteil der Mutante nicht mehr ins Zytoplasma zurücktransportiert wird, da die NES zerstört ist. Damit wurde bewiesen, dass diese Exportsequenz in PKD2 funktionell wirksam ist. Diese funktionelle PKD2-NES-Mutante wurde mit der maximal aktiven PKD2-$S^{706/710}$E-Mutante kombiniert (Abb. 28, oben), von der bekannt ist, dass sie auch durch den Kern shuttelt und stimuliert im Kern verbleibt (Schunter, 2005). Diese neue Mutante PKD2-L^{159}/V^{163}A-$S^{706/710}$E war bereits in unbehandelten AGS-

B-Zellen massiv im Kern vorzufinden (Abb. 28, unten). D.h., die Kombination der NES-Mutation mit der maximal aktiven PKD2-Mutante führte zur weitgehenden nukleären Retention der Mutante. Auch die katalytisch inaktive PKD2-ΔC1b-Mutante (siehe Abb. 23), die durch den Kern shuttelt und bei einem Gastrinstimulus nicht nukleär akkumuliert, zeigt, dass für die Retention von PKD2 im Kern die katalytische Aktivität notwendig ist (siehe Abb. 19).

Durch das Zusammenwirken der regulatorischen Domäne mit der Kinasedomäne in PKD2 wird die katalytische Aktivität und die subzelluläre Lokalisation von PKD2 bestimmt. Somit reguliert die Aktivität von PKD2 zumindest teilweise ihre subzelluläre Lokalisation. Da auf diese Weise voll aktive PKD2 im Kern vorliegt, könnte die Kinase dort interessante nukleäre Targets besitzen.

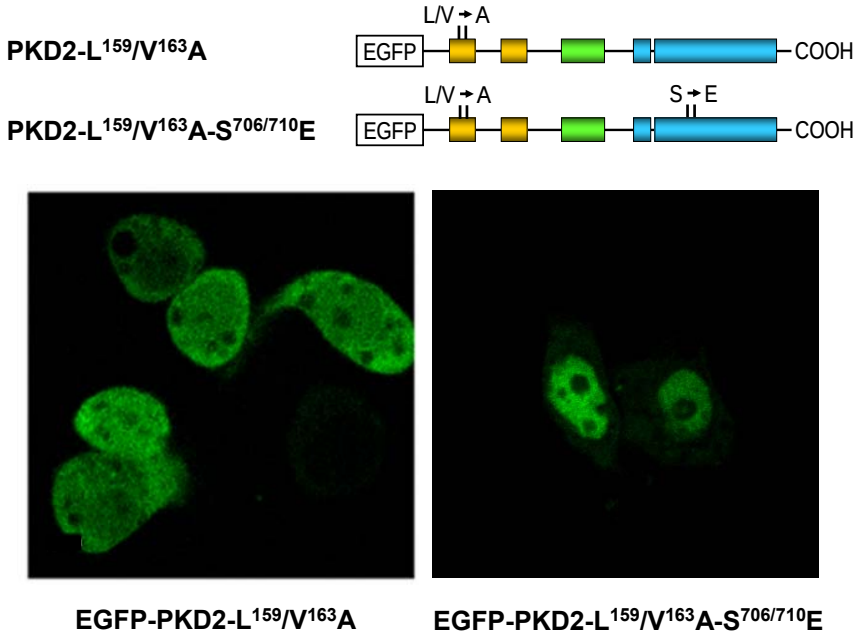

Abb. 28: Subzelluläre Lokalisation von EGFP-PKD2-L^{159}/V^{163}A und EGFP-PKD2-L^{159}/V^{163}A-S$^{706/710}$E in unbehandelten AGS-B-Zellen.

4 Diskussion

PKD2 ist ein neues Mitglied der PKD-Familie von Serin-Threonin-Proteinkinasen, das durch pharmakologische Reagenzien wie PDBu und über G-Protein gekoppelte Rezeptoren durch einen PKC-abhängigen Mechanismus aktiviert wird (Sturany *et al.*, 2001, 2002). Wie die anderen PKD-Familienmitglieder enthält PKD2 eine regulatorische Domäne an ihrem Aminoterminus, die sich aus zwei cysteinreichen C1-Domänen, C1a und C1b, und einer Pleckstrin-Homologie (PH)-Domäne zusammensetzt. Regulatorische Domänen bestimmen die basale Aktivität von Proteinkinasen und tragen zur Regulation ihrer subzellulären Lokalisation bei (Oancea *et al.*, 2003; Rykx *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2003).

Das primäre Ziel dieser Arbeit war es, die regulatorische Domäne von PKD2 strukturell und funktionell zu charakterisieren. Dabei konzentrierten wir uns darauf, die jeweiligen Aufgaben ihrer einzelnen Subdomänen bei der Phorbolesterbindung, der subzellulären Lokalisation und der Aktivierung von PKD2 zu bestimmen. Hierfür ermittelten wir mit Computer-gestützten Sequenzanalysen verschiedene Aminosäuresequenzen in PKD2, die regulatorisch auf die Funktion der Kinase wirken könnten. Die vielversprechendsten Sequenzen wurden von uns durch Deletionsmutationen bzw. Punktmutationen verändert. Die spezifischen Eigenschaften dieser PKD2-Mutanten wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* biochemisch und mikroskopisch in HEK293 oder AGS-B humanen Magenkarzinomzellen untersucht. Dabei wurde ein besonderes Augenmerk auf eine CCK_B-Rezeptorstimulation bzw. des daraus resultierenden DAG-Anstiegs in der Zelle gerichtet.

Für PKD2 war bekannt, dass es einen Rezeptor für Phorbolester/Diacylglycerol darstellt (Sturany *et al.*, 2001). Welche strukturellen Elemente von PKD2 diese Phorbolester-Bindung bestimmen, war bisher aber noch nicht geklärt. Phorbolester als Analog zu Diacylglycerol spielen eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Proteinkinasen und sind Tumorpromotoren (Kishimoto *et al.*, 1980; Slaga *et al.*, 1989). Die cysteinreichen Zinkfingerdomänen spielen eine sehr wichtige Rolle bei der Bindung von Diacylglycerol bzw. Phorbolestern und damit auch in der Regulation von PKD2. Wir konnten zeigen, dass die C1a/C1b-Domäne

für die Phorbolesterbindung an PKD2 verantwortlich ist. Im Einzelnen unterscheiden sich die C1a- und die C1b-Domäne von PKD2 grundlegend in ihrer Fähigkeit, die spezifische Bindung von Phorbolester an die Kinase zu vermitteln. Die C1a-Domäne bindet nur einen Teil, die C1b-Domäne von PKD2 dagegen ist für den Großteil der Bindung von Phorbolester verantwortlich. Deshalb sind die cysteinreichen Domänen und im Besonderen die C1b-Domäne essentiell für die Phorbolesterbindung an das Enzym. Diese Daten stimmen weitgehend mit den Erkenntnissen über PKD1 überein (Iglesias *et al.*, 1998a). Jedoch führt in PKD1 die Deletion der gesamten C1a/C1b-Domäne oder jeweils des C1a- oder des C1b-Motivs zu einer maximalen Aktivierung des Enzyms. Daher wird die Zinkfingerdomäne in PKD1 auch als ein inhibitorischer Regulator der PKD1-Aktivität bezeichnet (Iglesias und Rozengurt, 1999). Werden dagegen bei PKD2 beide cysteinreichen Domänen deletiert, kommt es nur zu einem kaum sichtbaren Anstieg in der basalen katalytischen Aktivität von PKD2. Dies bedeutet, dass in PKD2 die Zinkfingerdomänen keine wesentliche inhibitorische Rolle wie in PKD1 erfüllen. Die katalytische Aktivität dieser PKD2-ΔC1a/C1b-Mutante läßt sich noch stimulieren, wenn die Zellen mit Gastrin behandelt werden. Die Deletion nur der C1a-Domäne in PKD2 (PKD2-ΔC1a) verhält sich wie die gesamte Zinkfingerdeletion von PKD2 und zeigt damit auch keine negativ-regulatorischen Eigenschaften, die der vergleichbaren Domäne in PKD1 zugesprochen werden. Noch viel auffälliger ist jedoch, dass die Deletion der C1b-Domäne (PKD2-ΔC1b) einen kompletten Verlust der katalytischen Kinaseaktivität mit sich bringt. Sogar, wenn die Zellen mit Gastrin inkubiert werden und trotz der Tatsache, dass diese Mutante an Serin 706 und Serin 710 in der katalytischen Schleife phosphoryliert wird, bleibt die PKD2-ΔC1b-Mutante inaktiv. Obwohl eine Sequenzhomologie von 78% zwischen den C1a/C1b-Subdomänen von PKD1 und PKD2 besteht, verhält sich PKD2 hier gegensätzlich. Die C1b-Domäne in PKD2 ist ein positiver Regulator der katalytischen Aktivität, weil die Bindung von Lipiden an diese Domäne für die Aktivierung von PKD2 nötig ist, sogar, wenn PKCs die kritischen Serinreste in der katalytischen Schleife phosphorylieren.

Verglichen mit den cysteinreichen Domänen wirken Pleckstrin-Homologie-Domänen in Proteinen nicht nur als Lipidbinder, sondern erfüllen auch autoregulatorische Funktionen (Cozier *et al.*, 2004). So wurde für PKD1 postuliert,

dass die Autoinhibition der Kinaseaktivität durch die PH-Domäne bei einer PKCε-abhängigen Phosphorylierung der Serine 744 und 748 in der katalytischen Schleife von PKD1 wieder aufgelöst wird (Waldron *et al.*, 2003). Die PH-Domäne in PKD2 hat im Gegensatz zu ihren cysteinreichen Domänen keinen Einfluss auf die Bindung von Phorbolester an das Protein. Jedoch wirkt die PH-Domäne inhibitorisch auf die Kinase und reguliert so die katalytische Aktivität von PKD2. Damit spielt bei PKD2 die PH-Domäne in der Regulation der katalytischen Aktivität, im Gegensatz zur C1a/C1b-Domäne von PKD2, eine ähnlich autoinhibitorische Rolle wie die PH-Domäne in PKD1 (Iglesias und Rozengurt, 1998b).

Regulatorische Domänen können auch die subzelluläre Lokalisation eines Proteins modulieren. Die vorgelegten Daten zeigen, dass PKD2 sich in ähnlichen Kompartimenten, wie PKD1 und PKD3 befindet, z.B. an der Plasmamembran und im Golgi (Maeda *et al.*, 2001; Hausser *et al.*, 2002), aber auch im Kern (Rey *et al.*, 2001a, 2001b). 2003 wurde für PKD2 postuliert, dass ihre Aktivierung keine Translokation des Proteins vom Zytoplasma in den Kern induziert (Rey *et al.*, 2003). Unsere Fluoreszenzmikroskopiedaten in AGS-B-Zellen deuten allerdings darauf hin, dass PKD2 sich ständig zwischen dem Zytoplasma und dem Kern bewegt. Außerdem führt die Aktivierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren durch Gastrin zu einer beträchtlichen nukleären Akkumulation von PKD2. Dieses Ergebnis schließt aber nicht die Tatsache aus, dass die präzise Lokalisation der Mitglieder der PKD-Familie zumindest zum Teil zelltypspezifisch sein könnte.
Die subzelluläre Verteilung der PKD2-ΔC1a/C1b-Mutante war hauptsächlich zytoplasmatisch und somit ähnlich der von PKD2-Wildtyp in unstimulierten AGS-B-Zellen. Bei der *in silico* durchgeführten Suche nach nukleären Lokalisationssignalen in der PKD2-Sequenz wurde in der C1a/C1b-Domäne eine potentielle bipartite NLS am C-Terminus der C1a-Domäne und eine pat4 NLS, ^{192}RKRR^{195}, in der darauf folgenden Linkerregion zwischen der C1a- und C1b-Domäne gefunden. Die Mutation der pat4 NLS (PKD2-K^{193}A/R^{194}G) bewies, dass der Lysinrest 193 und der Argininrest 194 essentiell für die effiziente nukleäre Lokalisation von PKD2 sind und diese putative pat4 NLS *in vivo* funktionell wirksam ist. Fluoreszenzmikroskopaufnahmen einer PKD2, in der die C1a-Domäne deletiert wurde, zeigten überraschenderweise, dass die C1a-Domäne

eine funktionelle NES enthält, da diese Mutante nicht mehr aus dem Zellkern exportiert wurde. Hierbei konnten wir zeigen, dass der Leucinrest 159 und der Valinrest 163 in der C1a-Domäne sehr wichtig für den nukleären Export von PKD2 sind. Die putative bipartite NLS am C-Terminus der C1a-Subdomäne scheint dagegen funktionell nicht relevant zu sein und die NES „L^{159}/V^{163}“ ist das vorherrschende funktionelle Lokalisationssignal in dieser Sequenz. Sowohl das NES-Motiv als auch die bipartite/pat4 NLS-Motive sind hochkonserviert in den Isoformen PKD1, 2 und 3, was vermuten läßt, dass diese Domänen eine ähnliche Rolle in allen Mitgliedern der PKD-Familie spielen. Es wurde berichtet, dass die C1a-Domäne von PKD1 nicht mit dem nukleären Import zusammenhängt, aber ihre Deletionsmutante zu einem kleinen Teil im Kern akkumuliert (Rey *et al.*, 2001a). Jedoch war die genaue Rolle der C1a-Domäne in PKD1 für den nukleozytoplasmatischen Transport noch nicht klar, und die Sequenz, die deletiert wurde, um diese Mutante herzustellen, umfaßte die C1a-Domäne einschließlich der C-terminalen Linkerregion mit der pat4 NLS (Rey *et al.*, 2001a). Somit könnte der Grund für die unterschiedliche Interpretation der Funktion der Zinkfingerdomänen in Lokalisationsstudien von PKD1 und PKD2 darin liegen, dass in den Deletionsmutanten von PKD1 die C1a- bzw. die C1b-Domäne jeweils C-terminal sehr umfangreich deletiert wurden, und dadurch C-terminale Lokalisationssequenzen außerhalb der cysteinreichen Domänen verloren gingen (Iglesias und Rozengurt, 1999; siehe Abb. 8).

Die PKD2-ΔC1b-Mutante zeigte in ihrer subzellulären Lokalisation, im Gegensatz zu PKD1 (Rey *et al.*, 2001a), eine bemerkenswerte nukleäre Akkumulation, wenn die Zellen mit Leptomycin B behandelt wurden und damit der Crm1-abhängige nukleäre Export blockiert wurde. Eine Behandlung mit Gastrin konnte jedoch keine Kernlokalisation dieser PKD2-Mutante auslösen. Das beweist, dass immer noch ein kontinuierlicher Austausch von PKD2-ΔC1b zwischen dem Zytoplasma und dem Kern stattfinden kann. Demzufolge ist die Unfähigkeit der PKD2-ΔC1b, Gastrin-induziert im Kern zu akkumulieren, wahrscheinlich davon abhängig, dass diese Mutante durch eine Gastrinbehandlung der Zellen nicht aktiviert werden kann, da das nach Gastrinstimulation produzierte DAG von der Mutante ohne die fehlende C1b-Domäne nicht gebunden werden kann. Ähnliche Ergebnisse in der subzellulären Lokalisation zeigte die ebenfalls katalytisch inaktive PKD2-D^{695}A-Mutante (Schunter, 2005). Dies deutet darauf hin, dass der Verlust der

katalytischen Aktivität von PKD2, ob nun durch die Deletion der C1b-Domäne oder durch die Mutation des katalytisch wichtigen DFG-Motivs, über eine Akkumulation von PKD2 im Zellkern bestimmt.

Im Bezug auf die Pleckstrin-Homologie-Domäne konnten wir feststellen, dass die konstitutiv aktive PKD2-ΔPH im Vergleich zu PKD2-Wildtyp keine auffälligen Unterschiede in ihrer subzellulären Verteilung in AGS-B-Zellen aufweist. Die LMB-Daten zeigen, dass auch diese katalytisch aktive PKD2-ΔPH-Mutante sich in unstimulierten AGS-B-Zellen kontinuierlich zwischen Kern und Zytoplasma bewegt. Das gibt Grund zu der Vermutung, dass die katalytische Aktivität allein nicht ausreicht, um die Translokation von PKD2 zu verschiedenen subzellulären Kompartimenten auszulösen. Eine Behandlung der AGS-B-Zellen mit Gastrin ermöglicht dagegen die Lokalisation und damit die Retention von PKD2-ΔPH im Kern. Das könnte bedeuten, dass der Stimulus durch Gastrin eine weitere Modifikation in PKD2 auslösen kann, die den Verbleib im Kern regelt. Interessanterweise gab es keine nukleäre Akkumulation von PKD2-ΔPH in unbehandelten AGS-B-Zellen, was zeigt, dass die PH-Domäne von PKD2, obwohl sie das putative NLS-Motiv ^{413}RKRH^{416} trägt, offensichtlich keinen Einfluss auf die Bewegung von PKD2 zwischen Kern und Zytoplasma hat. Daher vermittelt diese Domäne keinen nukleären Import. Und im Gegensatz zu PKD1 spielt die PH-Domäne von PKD2 auch keine Rolle beim nukleären Export der Kinase. In der subzellulären Lokalisation von PKD1 wird der PH-Domäne eine zentrale Rolle für den nukleären Export des Proteins zugeschrieben, da die PKD1-PH-Deletionsmutante unfähig ist, den Kern wieder zu verlassen (Rey *et al.*, 2001a). Dieser funktionelle Unterschied zwischen den PH-Domänen von PKD1 und PKD2 in der Lokalisation könnte daher rühren, dass die Sequenz der PH-Domäne von PKD1 N-terminal valinreich ist, was - wie leucinreiche Sequenzen - eine NES darstellen kann (siehe Abschnitt 1.6.2). In der PH-Domäne von PKD2 finden sich solche valinreiche Sequenzen nicht (siehe Abb. 20).

Die Aufgaben der Kinasedomäne in PKD2 werden über das DFG-Motiv und die katalytische Schleife vermittelt, die beide in Kinasen für die katalytische Aktivität verantwortlich sind. Wird das DFG-Motiv in PKD2 durch eine Punktmutation zerstört, kann das Enzym den Kofaktor Magnesium nicht mehr komplexieren, und

die Kinase wird damit katalytisch inaktiv. Diese inaktive PKD2-D^{695}A-Mutante verbleibt auch bei einer Gastrin-Behandlung der AGS-B-Zellen nicht im Zellkern, jedoch wird auch diese Mutante zwischen Kern und Zytoplasma ausgetauscht (Schunter, 2005). Eine Mutation in der katalytischen Schleife von PKD2, die die Phosphorylierung der beiden Serine 706 und 710 nachahmt, führt zur maximalen katalytischen Aktivierung der Kinase. Wie oben erwähnt, löst die PKC-abhängige Phosphorylierung der analogen Serine in PKD1 die Autoinhibition durch die PH-Domäne auf und ermöglicht die maximale Aktivierung des Enzyms (Waldron *et al.*, 2003), was wahrscheinlich mit einer Konformationsänderung der Kinase einhergeht. Diese konstitutiv aktive PKD2-$S^{706/710}$E-Mutante zeigt ebenso wie die aktive PKD2-ΔPH-Mutante, dass ihre Aktivität allein nicht ausreicht, um im Kern retiniert zu werden. Erst eine zusätzliche, durch die Stimulation mit Gastrin vermittelte Modifikation macht den Verbleib der Kinase im Kern möglich. Diese Modifikation ist bislang unklar und Gegenstand aktueller Untersuchungen.

Obwohl die Mitglieder der PKD-Familie untereinander die gleichen strukturellen Voraussetzungen besitzen, weisen sie doch auffällige Unterschiede in ihrer Aktivierung und ihrer bevorzugten subzellulären Lokalisation in den Kompartimenten auf. Diese offensichtliche unterschiedliche Kompartimentalisierung könnte von den verschiedenen Zelltypen abhängig sein, wobei möglicherweise auch andere, übergeordnete Regulatoren an der Lokalisation beteiligt sind (Zugaza *et al.*, 1996; Matthews *et al.*, 2000a).
So findet sich PKD2 in der subzellulären Lokalisation in Lymphozyten an der Plasmamembran und im Zytoplasma, jedoch nicht im Zellkern wieder (persönliche Mitteilung von Dr. D. Cantrell, Dundee, UK).
Es ist denkbar, dass die biologische Funktion der Kernlokalisation von stimulierter PKD2 in epithelialen Tumorzellen wie den AGS-B Magenkarzinomzellen präferentiell die Aktivierung nukleärer Targets ist. In anderen Zellen wie den Lymphozyten hingegen könnte es überwiegend Plasmamembrantargets für PKD2 geben.
Nukleäre Targets für PKD2 in epithelialen Tumoren könnten Faktoren sein, die die Transkription regulieren. Für PKD1 wurde HDAC7 als nukleäres Zielprotein gezeigt, das von PKD1 phosphoryliert wird, daraufhin den Kern verläßt und damit die Transkription Mef-regulierter Gene wie des potenten Transkriptionsfaktors

Nur77 ermöglicht (Dequiedt *et al*., 2005). Die Überexpression von Nur77 führt in T-Zellen zur negativen Selektion und damit zur Apoptose in diesen Zellen (Calnan *et al.*, 1995).

Rozengurt *et al.* entwickelten ein statisch-sequentielles Modell, das die Hierachie der Aktivierung und der subzellulären Lokalisation von PKD1 beschreibt (Rozengurt *et al.*, 2005). Dabei befindet sich inaktive PKD1 zum Großteil im Zytoplasma der Zellen. Wird in den Zellen DAG produziert, transloziert PKD1 an die Plasmamembran und wird dort von Mitgliedern der nPKC-Familie an den Serinen 744 und 748 phosphoryliert und aktiviert, was die Autoinhibiton durch die PH-Domäne löst und die katalytische Schleife von PKD1 in einer aktiven Konformation stabilisiert. Die aktivierte PKD1 dissoziiert von der Plasmamembran und transloziert in hohem Maße in den Kern, wo sie vorübergehend akkumuliert, bevor sie über ihre PH-Domäne wieder exportiert wird. Dabei wird die sequenzielle Abfolge der Lokalisation von PKD1 in der Zelle und ihre erhöhte Importrate in den Kern als Folge ihrer Aktivierung an der Plasmamembran betrachtet.

Wir schlagen auf Grund der hier genannten Daten ein dynamisches Modell der Aktivierung und Lokalisation von PKD2 vor (Abb. 29): In unstimulierten Zellen wird zytosolisch vorliegende PKD2 über ihre C-terminal der C1a-Domäne liegende pat4 NLS (^{192}RKRR^{195}) aktiv durch den Kernporenkomplex in den Kern transportiert. Von dort wird sie über die Bindung des Exportfaktors Crm1 an die NES (L^{159}/V^{163}) in ihrer C1a-Domäne wieder über den Kernporenkomplex ins Zytoplasma exportiert. Dadurch befindet sich die inaktive PKD2 in einem kontinuierlichen Austausch zwischen Kern und Zytoplasma, wobei die Exportrate die Rate des nukleären Imports übertrifft. Der katalytisch inaktive Zustand von PKD2 wird dabei durch die autoinhibitorische Wirkung der PH-Domäne aufrechterhalten. Wird in den Zellen durch Gastrin die Produktion von DAG an der Plasmamembran stimuliert, kommt es dort zu einer Ansammlung von PKD2. Die C1b-Domäne ist in PKD2 der Hauptbinder für Phorbolester, dem Surrogat für DAG. Demzufolge bindet PKD2 über ihre C1b-Domäne an der Plasmamembran an das membranverankerte DAG. Zusätzlich wird PKD2 von PKCα, PKCε oder PKCη an den Serinen 706 und 710 phosphoryliert und die katalytische Schleife von PKD2 in einer aktiven Konformation stabilisiert. Diese phosphorylierte und aktivierte PKD2

wird, ebenso wie inaktive PKD2, über die pat4 NLS der Zinkfinger in den Kern importiert. Dort angekommen wird jedoch ihr Crm1-abhängiger Export aus dem Kern stark verlangsamt, wobei eine zusätzliche, Gastrin-abhängige Modifikation der aktiven Kinase eine Rolle spielt. Dadurch akkumuliert die durch Gastrin aktivierte PKD2 vorübergehend im Kern.

Beim Vergleich mit dem statischen PKD1-Modell wird klar, dass immer ein kontinuierlicher Austausch von PKD2 zwischen Zytoplasma und Kern besteht. Dabei wird der Kernimport von PKD2 nicht von ihrer Aktivität bestimmt, sondern findet unabhängig von ihrem Aktivitätszustand statt und wird über das pat4 NLS-Signal in den Zinkfingerdomänen vermittelt. Die Aktivität von PKD2 ist vielmehr nötig, um die Kinase durch Verlangsamung ihres Exports im Kern zu retinieren und dort die Interaktion mit putativen Substraten zu ermöglichen. Wir gehen von einem dynamischen Prozess der PKD2-Lokalisation aus, dessen Kinetik durch Phosphorylierungsvorgänge und entsprechend der in den jeweiligen Kompartimenten vorhandenen Kofaktoren verlangsamt oder beschleunigt wird und dadurch eine lokale Akkumulation in einzelnen Zellkompartimenten bedingt.

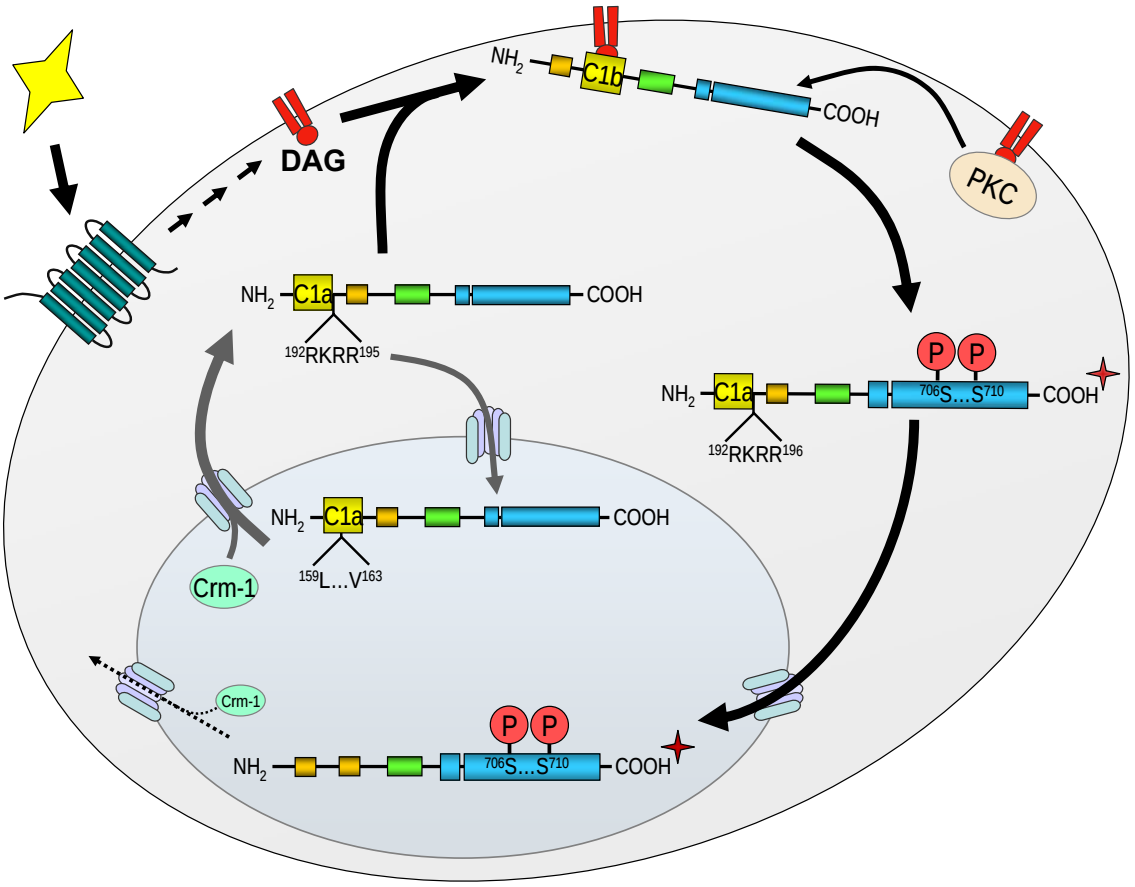

Abb. 29: Subzelluläre Lokalisation und Aktivierung von PKD2 über ihre Domänen. PKD2 befindet sich im kontinuierlichen nukleozytoplasmatischen Austausch vermittelt über seine NLS und NES (graue Pfeile). Nach einem Stimulus kommt es zur DAG-Produktion an der Plasmamembran. PKD2 bindet über ihre C1b-Domäne an DAG und wird von PKC in der katalytischen Schleife phosphoryliert und aktiviert (*). Aktivierte PKD2 translozíert wie inaktive PKD2 über die pat4 NLS in den Zellkern. Der Crm1-abhängige Kernexport von aktivierter PKD2 jedoch wird verlangsamt und die aktivierte PKD2 reichert sich im Kern an.

Dieses Konzept wird auch von neuesten Erkenntnissen über die Lokalisation von STAT („signal transducers and activators of transcription“) Transkriptionsfaktoren gestützt. STATs befinden sich in der Zelle ebenfalls im kontinuierlichen nukleozytoplasmatischen Austausch und werden bei einer Stimulation mit Cytokinen eher im Kern retiniert, als dass sich ihre nukleäre Importrate erhöht (Meyer und Vinkemeier, 2004). Ähnliche Daten wurden auch vor kurzem zu Smads, intrazellulären Effektoren des TGF-β-Signalwegs, veröffentlicht (Nicolas *et al.*, 2004). Von Smad2 ist bekannt, dass über TGF-β eine nukleäre Akkumulation des Proteins durch die Reduktion der Kernexportrate induziert werden kann, ohne dabei die nukleäre Importrate von Smad2 zu verändern (Schmierer und Hill, 2005).

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen der regulatorischen Domäne von PKD2 somit, dass es Ähnlichkeiten aber auch große Unterschiede zu PKD1 gibt, obwohl eine große Sequenzhomologie zwischen den beiden Isoformen besteht. Die vorgelegten Daten demonstrieren, dass die C1a/C1b-Domäne in PKD2 komplexe regulatorische Fähigkeiten besitzt: Die C1b-Domäne ist der Hauptrezeptor für Phorbolester und spielt eine positive Rolle in der Regulation der katalytischen Aktivität, wohingegen die C1a-Domäne und die Linkerregion zwischen C1a und C1b den nukleozytoplasmatischen Transport des Enzyms regulieren. Die Vermutung liegt nahe, dass die Substratspezifität und Aktivität einer Kinase wahrscheinlich sowohl von der Affinität ihrer regulatorischen Domäne zu den vorhandenen Kofaktoren abhängt, welche die Kinase in die Nähe des Substrates bringen, als auch von der Lokalisation der Kinase in den einzelnen Zellkompartimenten. Die Fähigkeit, die spezifische subzelluläre Lokalisation von PKD2 zu definieren, könnte es ermöglichen, weitere Einsicht in die Kompartiment-spezifischen Signalmöglichkeiten dieses Enzyms zu gewinnen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die strukturelle und funktionelle Rolle der regulatorischen Domäne von PKD2 untersucht, im Bezug auf ihre Bindung von Phorbolester, ihre subzelluläre Lokalisation und die Kontrolle ihrer katalytischen Aktivität. Die vorgelegten Daten zeigen, dass es manche Ähnlichkeiten aber auch auffällige Unterschiede zwischen PKD2 und den anderen Mitgliedern der PKD-Familie gibt. So konnte nachgewiesen werden, dass die PH-Domäne in PKD2 ein inhibitorischer Regulator der Enzymaktivität ist, was vergleichbar mit der PH-Domäne in PKD1 ist. Jedoch spielt im Gegensatz zu PKD1 die PH-Domäne von PKD2 keine Rolle beim nukleären Export der Kinase. Ebenso verschieden zu PKD1 stellt sich die C1a/C1b-Domäne von PKD2 mit ihren komplexen regulatorischen Fähigkeiten dar. Diese Domäne hat keine inhibitorische sondern eine positiv regulatorische Wirkung auf die katalytische Aktivität von PKD2. Im Besonderen wird das C1b-Motiv für die Bindung von Phorbolester benötigt, wie auch für die basale und GPCR-stimulierte Kinaseaktivität von PKD2. In lebenden Zellen wurde gezeigt, dass „enhanced green fluorescent protein“ (EGFP)-markierte PKD2 kontinuierlich zwischen dem Zytoplasma und dem Kern epithelialer Tumorzellen ausgetauscht wird. Die Aktivierung des CCK_B/Gastrin-Rezeptors ruft eine nukleäre Akkumulation der aktivierten PKD2 in den AGS-B Magenkarzinomzellen hervor. Mutationsanalysen der regulatorischen Domäne zeigen ein funktionelles nukleäres Lokalisationssignal (NES) in der C1a-Domäne und eine funktionelle nukleäre Lokalisationssequenz (NLS) in der Linkerregion zwischen der C1a- und der C1b-Domäne von PKD2. Somit gibt es eine ausgeklügelte Regulation der Aktivität und des nukleozytoplasmatischen Austauschs von PKD2 durch ihre cysteinreichen Domänen.

Zusammengenommen ergeben diese Daten ein dynamisches Modell der PKD2-Lokalisation und -Aktivierung in Abhängigkeit von ihrer regulatorischen Domäne. Der nukleozytoplasmatische Transport von PKD2 findet kontinuierlich über genau definierte Lokalisationssequenzen in der regulatorischen Domäne statt und wird im Kern verlangsamt, wenn die Kinase durch Gastrin aktiviert wird. Je nachdem, welche Kofaktoren vorliegen, lokalisiert die Kinase durch die Affinität ihrer regulatorischen Subdomänen in einzelnen Kompartimenten, indem die Transportkinetik dort verlangsamt wird. Dadurch kann die Kinase in die Nähe ihrer

Zielproteine gebracht werden. Demgegenüber steht das statische Modell der vorbestimmten, sequenziellen Lokalisation von PKD1 als Folge ihrer Aktivierung an der Plasmamembran.

Durch die von uns vorgeschlagene dynamische Lokalisation könnten die verschiedenen PKD-Isoformen je nach Zellkontext unterschiedliche biologische Funktionen erfüllen. Dass PKD2 besonders hoch in Tumorzellen exprimiert wird, könnte z.B. drauf hinweisen, dass PKD2 in diesen Zellen Tumor-spezifische Signalwege vermittelt.

Die Identifizierung Kompartiment-spezifischer Kofaktoren und Substrate von PKD2 ist eine spannende Herausforderung für die Zukunft. Da die katalytische Aktivität allein scheinbar nicht ausreicht, um die nukleäre Akkumulation von PKD2 auszulösen, ist auch die Frage interessant, welche weitere Modifikation der Gastrin-Stimulus in PKD2 auslösen kann, die die Kernlokalisation verursacht.

6 Literaturverzeichnis

Alessi DR, James SR, Downes CP, Holmes AB, Gaffney PR, Reese CB, Cohen P. 1997. Characterization of a 3-phosphoinositide-dependent protein kinase which phosphorylates and activates protein kinase Balpha. *Curr Biol*. **7**:261-269

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment research tool. *J Mol Biol*. **215**:403-410

Areces LB, Kazanietz MG, Blumberg PM. 1994. Close similarity of baculovirus-expressed n-chimaerin and protein kinase C alpha as phorbol ester receptors. *J Biol Chem.* **269**:19553-8

Ausubel FM. 1994. Current protocols in molecular biology. 3 Vols. *John Wiley & Sons, Inc. USA.*

Baron CL und Malhorta V. 2002. Role of Diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membran. *Science.* **295**:325-328

Bowden ET, Barth M, Thomas D, Glazer RI und Mueller SC. 1999. An invasion related complex of cortactin, paxillin and PKCmu associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation. *Oncogene*. **18**:4440-9

Brandlin I, Hubner S, Eiseler T, Martinez-Moya M, Horschinek A, Hausser A, Link G, Rupp S, Storz P, Pfizenmaier K, Johannes FJ. 2002. Protein kinase C (PKC)eta-mediated PKC mu activation modulates ERK and JNK signal pathways. *J Biol Chem*. **277**:6490-6

Brose N, Betz A und Wegmeyer H. 2004. Divergent and convergent signaling by the diacylglycerol second messenger pathway in mammals. *Curr. Opin. Neurobiol.* **14**:328-340

Bullock WO, Fernandez JM und Short JM. 1987. XL-1-blue: A high efficiency plasmid transforming recA E. coli strain with ß-galactosidase selection. *Bio-Techniques*. **5**:376

Calnan BJ, Szychowski S, Chan FK, Cado D, Winoto A. 1995. A role for the orphan steroid receptor Nur77 in apoptosis accompanying antigen-induced negative selection. *Immunity*. **3**:273–282

Carnegie GK, Smith FD, McConnachie G, Langeberg LK, Scott JC. 2004. AKAP-Lbc nucleates a protein kinase D activation scaffold. *Mol. Cell*. **15**:889-899

Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U und Nishizuka Y. 1982. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem*. **257**:7847-7851

Cozier GE, Carlton J, Bouyoucef D, Cullen PJ. 2004. Membrane targeting by pleckstrin homology domains. *Curr Top Microbiol Immunol*. **282**:49-88

Dequiedt F, Van Lint J, Lecomte E, Van Duppen V, Seufferlein T, Vandenheede JR, Wattiez R, Kettmann R. 2005. Phosphorylation of histone deacetylase 7 by protein kinase D mediates T cell receptor-induced Nur77 expression and apoptosis. *J Ex Med*. **201**:793–804

Endo K, Oki E, Biedermann V, Kojima H, Yoshida K, Johannes FJ, Kufe D, Datta R. 2000. Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C [micro] by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1-beta – Darabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents. *J Biol Chem*. **275**:18476-18481

Falasca M, Logan SK, Lehto P, Baccante P, Lemon MA und Schlessinger J. 1998. Activation of Phospholipase Cγby PI 3-kinase-induced PH domain mediated membrane targeting. *EMBO J.* **17**:414-422

Görlich D und Mattaj IW. 1996. Nucleocytoplasmic transport. *Science*. **271**:1513-1518

Görlich D und Kutay U. 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol*. **15**:607-660

Hanks SK and Hunter T: Protein kinases 6. 1995. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J*. **9**:576-596

Hanks SK. 2003. Genomic analysis of the eukaryotic protein kinase superfamily: a perspective. *Genome Biol.* **4**:111

Hausser A, Link G, Bamberg L, Burzlaff A, Lutz S, Pfizenmaier K, Johannes FJ. 2002. Structural requirements for localization and activation of protein kinase C mu (PKC mu) at the Golgi compartment. *J Cell Biol.* **156**:65-74

Hausser A, Storz P, Martens S, Link G, Toker A, Pfizenmaier K. 2005. Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and activating phosphatidylinositol-4 kinase IIIbeta at the Golgi complex. *Nat Cell Biol*. **7**:851-3

Haworth RS, Cuello F, Herron TJ, Franzen G, Kentish JC, Gautel M, Avkiran M. 2004. Protein Kinase D Is a Novel Mediator of Cardiac Troponin I Phosphorylation and Regulates Myofilament Function. *Circ Res*. **95**:1091-1099

Hayashi A, Seki N, Hattori A, Kozuma S und Saito T. 1999. PKCnu, a novel member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKCμ. *Biochim Biophys Acta*. **1450**: 99-106

Höcker M, Henihan RJ, Rosewicz S, Riecken E-O, Zhang Z, Koh TJ, Wang TC. 1997. Gastrin and phorbol 12-myristate 13-acetate regulate the human histidine decarboxylase promoter through Raf-dependent activation of extracellular signal-regulated kinase-related signaling pathways in gastric cancer cells. *J Biol Chem*. **272**:27015-27024

Hoshi N, Langeberg LK, Scott JD. 2005. Distinct enzyme combinations in AKAP signalling complexes permit functional diversity. *Nat Cell Biol*. **7**:1066-73

Hunter T. 2000. Signaling – 2000 and beyond. *Cell*. **100**:113-127

Hurd C, Waldron RT, Rozengurt E. 2002. Protein kinase D complexes with C-Jun N-terminal kinase via activation loop phosphorylation and phosphorylates the C-Jun N-terminus. *Oncogene* **21**:2154-2160

Iglesias T, Matthews S und Rozengurt E. 1998a. Dissimilar phorbol ester binding properties of the individual cysteine-rich motifs of protein kinase D. *FEBS Letters*. **437**:19-23

Iglesias T und Rozengurt E. 1998b. Protein kinase D activation by mutations within its pleckstrin homology domain. *J Biol Chem*. **273**:410-416

Iglesias T, Waldron RT, Rozengurt E. 1998c. Identification of *in vivo* phosphorylation sites required for protein kinase D activation. *J Biol Chem* **273**:27662-27667

Iglesias T und Rozengurt E. 1999. Protein kinase D activation by deletion of its cysteinerich motifs. *FEBS Letters*. **454**:53-56

Iglesias T, Cabrera-Poch N, Mitchell MP, Naven TJ, Rozengurt E, Schiavo G. 2000. Identification and cloning of Kidins220, a novel neuronal substrate of protein kinase D. *J Biol Chem*. **275**:40048-45006

Ivaska J, Vuoriluoto K, Huovinen T, Izawa I, Inagaki M, Parker PJ. 2005. PKCepsilon-mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. *EMBO J*. **24**:3834-45

Jaggi M, Rao PS, Smith DJ, Hemstreet GP, Balaji KC. 2003. Protein kinase C μ is down-regulated in androgenindependent prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. **307**:254–60

Jaggi M, Rao PS, Smith DJ, Wheelock MJ, Johnson KR, Hemstreet GP, Balaji KC. 2005. E-Cadherin Phosphorylation by Protein Kinase D1/Protein Kinase CM is Associated with Altered Cellular Aggregation and Motility in Prostate Cancer. *Cancer Res.* **65**:483–92

Jamora C, Yamanouye N, Van Lint J, Laudenslager J, Vandenheede JR, Faulkner DJ und Malhotra V. 1999. Gbetagamma-mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D. *Cell*. **98**:59-68

Johannes FJ, Prestle J, Eis S, Oberhagemann P und Pfizenmaier K. 1994. PKCμ is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J Biol Chem*. **269**: 6140-6148

Johannes FJ, Horn J, Link G, Haas E, Siemienski K, Wajant H, Pfizenmaier K. 1998. Protein kinase Cmu downregulation of tumor-necrosis-factor-induced apoptosis correlates with enhanced expression of nuclear-factor-kappaB dependent protective genes. *Eur J Biochem.* **257**:47-54

Johnson JE, Giorgione J und Newton AC. 2000. The C1 and C2 domains of protein kinase C are independent membrane targeting modules, with specifity for phosphatidylserine conferred by the C1 domain. *Biochemistry.* **39**:11360-11369

Johnson LN, Lowe ED, Noble MEM und Owen DJ. 1998. The structural basis for substrate recognition and control by protein kinases. *FEBS Letters*. **430**:1-11

Kaufmann R, Schafberg H, Rudroff C, Henklein P und Nowak G. 1997. Choleocystokinin B-type receptor signalling is involved in human pancreatic cancer cell growth. *Neuropeptides*. **31**:573-583

Kazanietz MG, Lewin NE, Bruns JD, Blumberg PM. 1995. Characterization of the cysteine-rich region of the Caenorhabditis elegans protein Unc-13 as a high affinity phorbol ester receptor. Analysis of ligand binding interactions, lipid cofactor requirements, and inhibitor sensitivity. *J Biol Chem*. **270**:10777-83

Kazanietz MG. 2002. Novel "nonkinase" phorbol ester receptors: the C1 domain connection. *Mol Pharmacol*. **61**:759-67

Kudo N, Wolff B, Sekimoto T, Schreiner EP, Yoneda Y, Yanagida M, Horinouchi S, Yoshida M. 1998. Leptomycin B inhibition of signalmediated nuclear export by direct binding to CRM1. *Exp Cell Res*. **242**:540-547

La Cour T, Kiemer L, Mølgaard A, Gupta R, Skriver K, Brunak S. 2004. Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel*. **17**:527-36

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**:680-5

Lei EP und Silver PA. 2002. Protein and RNA export from the nucleus. *Dev Cell*. **2**:261-272

Lemmon MA und Ferguson KM. 2000. Signal-dependent membrane targeting by pleckstrin homology (PH) domains. *Biochem J.* **350**:1–18

Liljedahl M, Maeda Y, Colanzi A, Ayala I, Van Lint J und Malhotra V. 2001. Protein Kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-golgi network. *Cell*. **104**:409-420

Liscovitch M und Cantley LC. 1994. Lipid second messengers. *Cell* **77**: 329-34

Lorenzo PS, Beheshti M, Pettit GR, Stone JC, Blumberg PM. 2000. The guanine nucleotide exchange factor RasGRP is a high -affinity target for diacylglycerol and phorbol esters. *Mol Pharmacol*. **57**:840-6

Macara IG. 2001. Transport into and out of the nucleus. *Microbiol Mol Biol Rev.* **65**:570-594

Maeda Y, Beznoussenko GV, Van Lint J, Mironov AA, Malhotra V. 2001. Recruitment of protein kinase D to the trans-Golgi network via the first cysteine-rich domain. *EMBO J.* **20**:5982-5990

Manning G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S. 2002. The protein kinase complement of the human genome. *Science.* **298**:1912-1916

Mattaj IW und Englmeier L. 1998. Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. *Annu Rev Biochem*. **67**:265-306

Matthews SA, Rozengurt E, Cantrell D. 1999. Characterization of serine 916 as an *in vivo* autophosphorylation site for protein kinase D/protein kinase Cμ. *J Biol Chem*. **274**:26543-9

Matthews SA, Iglesias T, Rozengurt E, Cantrell D. 2000a. Spatial and temporal regulation of protein kinase D (PKD). *EMBO J* **19**:2935-2945

Matthews SA, Rozengurt E, Cantrell D. 2000. Protein kinase D: a selective target for antigen receptors and a downstream target for protein kinase C in lymphocytes. *J Exp Med.* **191**:2075-2082

Mellor H und Parker PJ. 1998. The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J.* **332**:281-292

Meyer T und Vinkemeier U. 2004. Nucleocytoplasmic shuttling of STAT transkription factors. *Eur. J. Biochem*. **271**:4606–4612

Mihailovic T, Marx M, Auer A, Van Lint J, Schmid M, Weber C, Seufferlein T. 2004. Protein kinase D2 mediates activation of nuclear factor κB by Bcr-Abl in Bcr-Abl$^+$ human myeloid leukemia cells. *Cancer Res*. **64**:8939-8944

Mischak H, Goodnight JA, Kolch W, Martiny-Baron G, Schaechtle C, Kazanietz MG, Blumberg PM, Pierce JH und Mushinski JF. 1993. Overexpression of protein kinase C ẟand ε, in NIH 3T3 cells induces opposite effects of growth, morphology, anchorage dependence, and tumorgenicity. *J Biol Chem*. **268**: 6090-6096

Mullis KB und Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Meth Enzymol*. **155**: 335-350

Musacchio A, Gibson T, Rice P, Thompson J und Saraste M. 1993. The PH domain: a common piece in the structural patchwork of signalling proteins. *TIBS*. **18**:343-8

Nakai K und Horton P. 1999. PSORT: a program for detecting the sorting signals of proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci.* **24**:34-35

Newton AC. 1995. Protein kinase C. Seeing two domains. *Curr Biol*. **5**:973-6

Newton AC. 1997. Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol.* **9**:161-167

Newton AC und Johnson JE. 1998. Protein kinase C: a paradigm for regulation of protein function by two membrane-targeting modules. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1376**:155-172

Nicolás FJ, De Bosscher K, Schmierer B, Hill CS. 2004. Analysis of Smad nucleocytoplasmic shuttling in living cells. *J Cell Science.* **117**:4113-4125

Nishi K, Yoshida M, Fujiwara D, Nishikawa M, Horinouchi S, Beppu T. 1994. Leptomycin B targets a regulatory cascade of Crm1, a fission yeast nuclear protein, involved in control of higher order chromosome structure and gene expression. *J Biol Chem*. **269**:6320-6324

Nishizuka Y. 1992. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science.* **258**:607-614

Oancea E, Bezzerides VJ, Greka A, Clapham DE. 2003. Mechanism of persistent protein kinase D1 translocation and activation. *Dev Cell.* **4**:561-574

Pante N und Kann M. 2002. Nuclear pore complex is able to transport macromolecules with diameters of about 39 nm. *Mol Biol Cell*. **13**:425-434

Parker PJ und Murray-Rust J. 2004. PKC at a glance. *J Cell Sci.* **117**: 131-132

Perletti GP, Folini, M, Lin, H, Mischak H, Piccinini F und Tashjian Jr AH. 1996. Overexpression of protein kinase C epsilon is oncogenic in rat colonic epithelial cells. *Oncogene*. **12**:847-854

Prestle J, Pfizenmaier K, Brenner J und Johannes FJ. 1996. Protein kinase C mu is located at the Golgi compartment. *J Cell Biol.* **134**:1401-10

Prigozhina NL und Waterman-Storer CM. 2004. Protein kinase D-mediated anterograde membrane trafficking is required for fibroblast motility. *Curr Biol*. **14**:88-98

Pullen N, Dennis PB, Andjelkovic M, Dufner A, Kozma SC, Hemmings BA, Thomas G. 1998. Phosphorylation and activation of $p70^{S6k}$ by PDK1. *Science*. **279**:707-10

Rennecke J, Rehberger PA, Furstenberger G, Johannes FJ, Stohr M, Marks F, Richter KH. 1999. Protein-kinase-Cmu expression correlates with enhanced keratinocyte proliferation in normal and neoplastic mouse epidermis and in cell culture. *Int J Cancer*. **80**:98-103

Rey O und Rozengurt E. 2001. Protein kinase D interacts with Golgi via its cysteine-rich domain. *Biochem Biophys Res Commun*. **287**:21-6

Rey O, Sinnett-Smith J, Zhukova E, Rozengurt E. 2001a. Regulated nucleocytoplasmic transport of protein kinase D in response to G proteincoupled receptor activation. *J Biol Chem.* **276**:49228-49235

Rey O, Young SH, Cantrell D, Rozengurt E. 2001b. Rapid protein kinase D translocation in response to G protein-coupled receptor activation. Dependence on protein kinase C. *J Biol Chem.* **276**:32616-32626

Rey O, Zhukova E, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. 2003. Vasopressin-induced intracellular redistribution of protein kinase D in intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol.* **196**:483-492

Rout MP und Aitchison JD. 2001. The nuclear pore complex as a transport machine. *J Biol Chem.* **276**:16593-16596

Rozengurt E, Rey O, Waldron RT. 2005. Protein kinase D signaling. *J Biol Chem*. **280**:3205-8

Rykx A, De Kimpe L, Mikhalap S, Vantus T, Seufferlein T, Vandenheede JR, Van Lint J. 2003. Protein kinase D: a family affair. *FEBS Letters*. **546**:81-86

Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. **2nd ed**. Cold Spring Harbor, NY

Schenk PW und Snaar-Jagalska BE. 1999. Signal perception and transduction: the role of protein kinases. *Biochim Biophys Acta*. **1449**:1-24

Schmierer B und Hill CS. 2005. Kinetic Analysis of Smad Nucleocytoplasmic Shuttling reveals a mechanism for Transforming Growth Factor β-dependent nuclear accumulation of Smads. *Mol Cell Biol*. **25**:9845-9858

Schunter M. 2005. Subzelluläre Lokalisation der Proteinkinase D2 in AGS-B Magenkarzinomzellen. Med Dissertation, Universität Ulm

Seufferlein T, Withers D, Broad S, Herget T, Walsh JH, Rozengurt E. 1995. The human CCKB/Gastrin receptor transfected into Rat1 fibroblasts mediates activation of MAP kinase, p74raf-1 kinase, and mitogenesis. *Cell Growth & Diff*. **6**:383-393

Shindo M, Irie K, Masuda A, Ohigashi H, Shirai Y, Miyasaka K, Saito N. 2003. Synthesis and phorbol ester binding of the cysteine-rich domains of diacylglycerol kinase (DGK) isozymes. DGKgamma and DGKbeta are new targets of tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem*. **278**:18448-54

Slaga TJ. 1983. Overview of tumor promotion in animals. *Environ Health Perspect*. **50**:3-14

Storz P und Toker A. 2003. Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappaB activation and survival pathway. *EMBO J*. **22**:109-20

Sturany S, Van Lint J, Muller F, Wilda M, Hameister H, Hocker M, Brey A, Gern U, Vandenheede J, Gress T, Adler G, Seufferlein T. 2001. Molecular cloning and characterization of the human protein kinase D2. A novel member of the protein kinase D family of serine threonine kinases. *J Biol Chem*. **276**:3310-3318

Sturany S, Van Lint J, Gilchrist A, Vandenheede JR, Adler G, Seufferlein T. 2002 Mechanism of activation of protein kinase D2 (PKD2) by the CCK(B)/gastrin receptor. *J Biol Chem.* **277**:29431-29436

Taylor SJ, Chae HZ, Rhee SG, Exton JH. 1991. Activation of the beta 1 isozyme of phospholipase C by alpha subunits of the G_q class of G proteins. *Nature* **350**:516-8

Taylor SS, Haste NM, Ghosh G. 2005. PKR and eIF2alpha: integration of kinase dimerization, activation, and substrate docking. *Cell*. **122**:823-5

Valverde, A.M., Sinnett-Smith, J., Van Lint, J. und Rozengurt, E. 1994. Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a distinct target for dacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain. *Proc Natl Acad Sci USA*. **91**:8572-8576

Van Lint J, Sinnett-Smith J und Rozengurt, E. 1995. Expression and characterization of PKD, a phorbol ester and diacylglycerol-stimulated serine protein kinase. *J Biol Chem*. **270**:1455-1461

Van Lint J, Rykx A, Maeda Y, Vantus T, Sturany S, Malhotra V, Vandenheede JR, Seufferlein T. 2002. Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move. *Trends Cell Biol*. **12**:193-200

Varmus und Weinberg. 1993. *Genes and the Biology of Cancer*. Scientific American Library.

Vasu SK und Forbes DJ. 2001. Nuclear pores and nuclear assembly. Curr *Opin Cell Biol*. **13**:363-375

Vega RB, Harrison BC, Meadows E, Roberts CR, Papst PJ, Olson EN, McKinsey TA. 2004. Protein Kinases C and D Mediate Agonist-Dependent Cardiac Hypertrophy through Nuclear Export of Histone Deacetylase 5. *Mol Cell Biol*. **24**:8374–8385

Vertommen D, Rider M, Ni Y, Waelkens E, Merlevede W, Vandenheede JR, Van Lint J. 2000. Regulation of protein kinase D by multisite phosphorylation. *J Biol Chem*. **275**: 19567-19576

Waldron RT, Iglesias T.und Rozengurt E. 1999. The pleckstrin homology domain of protein kinase D interacts preferentially with the eta isoform of protein kinase C. *J Biol Chem*. **274***:* 9224-9230

Waldron RT, Rozengurt E. 2003. Protein kinase C phosphorylates protein kinase D activation loop Ser744 and Ser748 and releases autoinhibition by the pleckstrin homology domain. *J Biol Chem.* **278**:154-163

Wang QJ, Fang TW, Yang D, Lewin NE, Van Lint J, Marquez VE, Blumberg PM. 2003. Ligand structure-activity requirements and phospholipid dependence for the binding of phorbol esters to protein kinase D. *Mol. Pharmacol*. **64**:1342–1348

Wang Y, Waldron RT, Dhaka A, Patel A, Riley MM, Rozengurt E, Schiavo G. 2002. The RAS effector RIN1 directly competes with RAF and is regulated by 14-3-3 proteins. *Mol Cell Biol.* **22**:916-926

Weis K. 2002. Nucleocytoplasmic transport: cargo trafficking across the border. *Curr Opin Cell Biol*. **14**:328-335

Weis K. 2003. Regulating Access to the Genome: Nucleocytoplasmic Transport throughout the Cell Cycle. *Cell*. **112**:441–51

Wen W, Meinkoth JL, Tsien RY, Taylor SS. 1995. Identification of a signal for rapid export of proteins from the nucleus. *Cell*. **82**:463-473

Woods AJ, White DP, Caswell PT, Norman JC. 2004. PKD1/PKCμ promotes αvβ3 integrin recycling and delivery to nascent focal adhesions. *EMBO J*. **23**:2531-2543

Xu L und Massague J. 2004. Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers. *Nat Rev Mol Cell Biol*. **5**:209-219

Yassin RR. 1999. Signaling pathways mediating gastrin's growth-promoting effects. *Peptides*. **20**:885-898

Yeaman C, Ayala MI, Wright J, Bard F, Bossard C, Ang A, Mweda Y, Seufferlein T, Mellman I, Nelson JW, Malhotra V. 2004. Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from Golgi-network. *Nature Cell Biology.* **6**:106-112

Zhukova E, Sinnett-Smith J, Rozengurt E. 2001. Protein kinase D potentiates DNA synthesis and cell proliferation induced by bombesin, vasopressin or phorbol esters in Swiss3T3 cells. *J Biol Chem.* **276**:40298-40305

Zugaza JL, Sinnett-Smith J, Van Lint J, and Rozengurt E. 1996. Protein kinase D (PKD) activation in intact cells through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway. *EMBO J*. **15**:6220-6230

Danksagung

Mein Dank geht an Prof. Adler für die Möglichkeit der Durchführung meiner Promotion in der Abteilung Innere Medizin I des Universitätsklinikums Ulm.

Ich danke Prof. Thomas Seufferlein für das interessante Promotionsthema und die wissenschaftliche Begeisterung, die diese Arbeit erst möglich gemacht haben.

Mein besonderer Dank gilt Julia von Blume für die sehr gute Zusammenarbeit, ihre tatkräftige Unterstützung am LSM510 und ihre stetige Bereitschaft für fachliche Diskussionen.

Ich danke auch Frank Dolp vom Institut für Lasermikroskopie für seine technische Unterstützung am LSM510.

Des Weiteren geht mein Dank auch an Prof. Bachem, dessen Time-Lapse-Mikroskop mir zur Verfügung stand, und Dr. Wilhelm Schneiderhan, der mir die Technik dieses Gerätes näher brachte.

Ich möchte auch meinen Dank an Iris Rueß aussprechen, die mit ihrem ausgeprägten Organisationstalent und ihrer guten Laune vieles möglich machte.

Last but not least gilt natürlich mein herzlicher Dank für die sehr gute Zusammenarbeit dem Laborteam (in alphabetischer Reihenfolge): Dipl.-Biol. Milena Armacki, Dr. Andreas Brey, Dipl.-Biol. Tobias Busch, MTLA Ulrike Mayr-Beyrle und Dr. Marc Porzner.