

Eva-Maria Dreizler

Dr. sc. hum.

Translokation von Aktin/Cofilin-Komplexen in den Zellkern: ein anti-apoptotischer Mechanismus?

Geboren am 12.05.1967 in Ludwigshafen am Rhein

Reifeprüfung am 04.06.1986 in Ludwigshafen am Rhein

Studiengang der Fachrichtung Biologie vom WS 1986/1987 bis WS 1992/1993

Vordiplom am 05.10.1988 an der Universität Heidelberg

Diplom am 19.04.1993 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Immunologie

Doktorvater: Herr Prof. Dr. med. S.C. Meuer

In T-Lymphozyten spielt das Aktin-depolymerisierende Protein Cofilin bei der Signalübertragung der Kostimulation eine Rolle. Während dieses Protein in ruhenden Zellen konstitutiv phosphoryliert im Zytoplasma vorliegt, wird es nach Stimulierung der T-Zellen über akzessorische Rezeptoren durch eine Dephosphorylierungsreaktion aktiviert und wandert in den Kern. Da Cofilin nach seiner Aktivierung an F-Aktin binden und dieses depolymerisieren kann und desweiteren monomeres Aktin zusammen mit Cofilin im Kern akkumuliert, wird angenommen, daß Cofilin in T-Zellen neben einer Aktin-depolymerisierenden Funktion auch eine Transport-Funktion von G-Aktin in den Nukleus ausübt.

In einigen autonom proliferierenden Lymphom-Zell-Linien liegt Cofilin hauptsächlich in seiner dephosphorylierten Form vor und wird spontan in den Kern verlagert. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß in der T-Lymphom-Linie Jurkat die konstitutive Dephosphorylierung und Kernverlagerung nicht durch eine somatische Mutation in der Sequenz von Cofilin hervorgerufen wird. Vielmehr sind diese auf eine permanente, aber reversible Aktivierung einer Typ 1 und/oder Typ 2A-Serinphosphatase zurückzuführen. So blockierte die Inhibition dieser Serin-Phosphatasen durch Okadaic acid die Kerntranslokation von Cofilin und Aktin und führte zu einer Akkumulierung beider Proteine im Zytoplasma. Diese Befunde unterstützen die Hypothese einer Aktin-Transport-Funktion von Cofilin in den Kern. Da monomeres Aktin DNase I bindet und inaktiviert, daher also der Apoptose entgegenwirkt, wird Cofilin als einem möglichen G-Aktin-Transport-Molekül auch eine anti-apoptotische Funktion zugeschrieben. Diese Hypothese konnte durch Inhibitionsversuche mit Okadaic acid unterstützt werden, bei denen die Verhinderung der Cofilindephosphorylierung und Kernverlagerung der Aktin/Cofilin-Komplexe mit Apoptose der malignen Jurkat-Zellen einherging.

Auch die Transfektion eines zur Cofilinbindung unfähigen β -Aktin-Konstrukts in Lymphom-Zellen lieferte Hinweise auf eine anti-apoptotische Funktion von Cofilin. So führte diese

Mutante in den exprimierenden Zellen zu starken morphologischen Veränderungen, die durch einen segmentierten Kern und eine Akkumulierung von endogenem wie exogenem Aktin im Zytoplasma gekennzeichnet waren. Dabei spricht das Auftreten der aberranten Kerne nur in T-Lymphom-Linien, nicht aber in der B-Lymphom-Linie SKW, für ein T-Zell-spezifisches Phänomen. Da die Bläschenbildung des Kerns ein typisches Merkmal apoptotischer Zellen ist, werden die lappigen Kerne möglicherweise durch Apoptose ausgelöst. Dagegen sind die Aktincluster eher das direkte Ergebnis einer behinderten Depolymerisierung des transformierten Aktins durch Cofilin und andere Aktinbindungsproteine.

Um die noch weitgehend unbekanntenen molekularen Bestandteile des Cofilin-Signalwegs zu identifizieren, wurden mit Hilfe des Zwei-Hybriden Systems Interaktionspartner von Cofilin gesucht. Dabei erwies sich Cofilin jedoch als ungünstiges Köderprotein, da zwar Aktin, jedoch keine anderen interagierenden Proteine aus einer Genbank isoliert werden konnten. Dies liegt wahrscheinlich in der fehlenden Phosphorylierung des Moleküls in Hefezellen oder in einer falschen Faltung des GAL4-Bd-Cofilin-Hybrids begründet.

Um die problematische Anwendbarkeit von Cofilin bei dieser Methodik zu umgehen und trotzdem Cofilin-regulierende Enzyme aufzuspüren, kam daher die katalytische Untereinheit einer Serinphosphatase des Typs 1 im Zwei-Hybriden System zur Anwendung. Oben genannte Ergebnisse sowie Ko-Immunopräzipitationsstudien weisen darauf hin, daß eine PP1 an der Dephosphorylierung von Cofilin beteiligt ist. Bei der Suche von PP1 α 2-interagierenden Proteinen in einer humanen Plazenta-Genbank konnten zwei neue Interaktionspartner dieser Phosphatase entdeckt werden. Bei dem einen Klon handelte es sich um ein bisher noch unbekanntes Protein, von dem mehrere Spleiß-Varianten gefunden werden konnten. Der andere Interaktionspartner erwies sich als humanes GADD34, einem 73.5 kDa schweren Polypeptid, das bei Streß-bedingter Wachstumshemmung und bei verschiedenen Formen von DNA-Schädigung induzierbar ist. Da GADD34 zu γ 134.5, einem viralen Regulator der Apoptose, große Homologie aufweist und in Zellen, die mit Apoptose-auslösenden Substanzen behandelt wurden, verstärkt exprimiert wird, wird GADD34 ebenfalls eine Rolle bei dem Vorgang des programmierten Zelltods zugewiesen. Die Bindung von GADD34 an eine Cofilin-regulierende Phosphatase sowie seine Apoptose-induzierenden Eigenschaften lassen vermuten, daß dieses Protein auch in den Cofilin-Signalweg involviert ist.