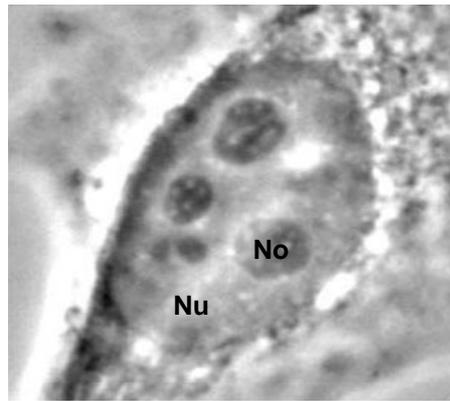


## 2 Einleitung

### 2.1 Zellkern und Zellkernarchitektur

Der Zellkern war die erste intrazelluläre Struktur, die beschrieben wurde. Bereits 1802 wurde der Zellkern durch Franz Bauer entdeckt. Jedoch wurde diese Entdeckung erst durch die Beschreibung von Robert Brown im Jahre 1831 allgemein bekannt (Harris, 1999). Der Zellkern – auch Nukleus genannt – ist ein durch eine doppelte Membran vom Zytoplasma der Zelle abgetrenntes Zellkompartiment (Abbildung 2.1). Er kann als ein Kompartiment zur Speicherung, Weitergabe und Expression des genetischen Materials beschrieben werden (Spector, 1996, Strouboulis und Wolffe, 1996). Hier finden die Prozesse der Replikation, Transkription und RNA-Prozessierung statt. Durch Kernporen in der Kernmembran wird der Transport von Proteinen, RNA und anderen Molekülen zwischen Zellkern und Zytoplasma ermöglicht. Bis heute ist der Zellkern die bekannteste aber am wenigsten verstandene Zellorganelle.

Die Form der funktionellen Organisation des Zellkerns ist ein viel diskutiertes Thema. Dabei liegen die Modelle, die herangezogen wurden, zwischen den extremen Vorstellungen eines starren Kernskeletts in der Form des Zytoskeletts (auch als „nukleäre Matrix“ bezeichnet) mit deutlich abgegrenzten Organellen und der Vorstellung des Zellkerns als ein ungeordneter membranbegrenzter „Sack“ voll DNA und anderer Moleküle. Tatsächlich besteht der Zellkern nicht aus einem starren Gerüst sondern hat eine sehr dynamische Organisationsstruktur, die allerdings einer Ordnung unterliegt. Zum Organisationsprinzip des Zellkerns gehören die Verteilung der chromosomalen DNA, Synthese, Prozessierung, Assemblierung und Transport von Makromolekülen und die Koordination und Regulation dieser Prozesse. Das nukleäre Organisationsschema kann durch Vireninfektionen, die Expression von Onkogenen oder erbliche Krankheiten gestört werden, was zum Ausfall der nukleären Funktionen führen kann. Damit ist die Beziehung zwischen der Struktur und der Funktion des Zellkerns bzw. seiner Substrukturen augenfällig, wofür der Begriff funktionelle Architektur geprägt wurde (Lamond und Earnshaw, 1998). Die Aufklärung des Organisationsprinzips und der Struktur-/Funktionsbeziehungen des Zellkerns in seinen molekularen Details ist eine wichtige Fragestellung der modernen Zellbiologie.



**Abb. 2.1: Aufnahme des Zellkerns einer HEp-2-Zelle mit differentiellem Interferenzkontrast (DIC).** Nu: Nukleus, No: Nukleolus (Bild: Peter Hemmerich).

Der Zellkern in der Interphase des Zellzyklus lässt sich grob in zwei Kompartimente unterteilen: das „Chromatin“ und die „Interchromosomale Domäne“. Das Chromatin-Kompartiment wird von der DNA und den mit ihr assoziierten Proteinen gebildet. Die Chromosomen liegen in ihrer dekondensierten Form in sogenannten Chromosomen-Territorien vor. Dabei nimmt jedes Chromosom einen bestimmten Raum im Zellkern ein, der deutlich von anderen Chromosomen-Territorien abgegrenzt ist (Schardin et al., 1985). Die DNA innerhalb der Territorien ist je nach Zellaktivität organisiert. Für die Transkription ist die Position eines Gens innerhalb des Chromatins wichtig, damit Transkriptionsfaktoren und RNA-Polymerasen Zugang zur DNA haben („Positionseffekt“). Die transkriptionell aktiven Gene befinden sich daher in der Regel an der Peripherie der Chromosomen-Territorien (Kurz et al., 1996, Wansink et al., 1996). Die transkribierte RNA formt sich an der Oberfläche dieser Territorien und wird in der interchromosomalen Domäne weiter prozessiert. Der Raum im Zellkern, der nicht von Chromosomen-Territorien besetzt ist, ist die interchromosomale Domäne. Sie macht ungefähr 60 Prozent des Zellkernvolumens aus. Hier befinden sich Zellkernstrukturen wie zum Beispiel die Nukleoli, Kernkörperchen, Transkriptions-Fabriken, RNA und verschiedene Proteine. Die Trennung zwischen den Kompartimenten ist nicht strikt sondern dynamisch. Die Chromosomenarme bewegen sich ebenso wie die Chromosomen im ganzen.

Organismen mit einem Zellkern werden als Eukaryonten bezeichnet. Der Name leitet sich von dem griechischen Wort für Kern „Karyon“ ab. Die Vorsilbe „eu-“, steht für „echt“. Die Eukaryonten haben sich in der Evolution vor weit mehr als 1,5 Milliarden Jahren aus den zellkernlosen Prokaryonten entwickelt. Zu den Eukaryonten gehören alle mehrzelligen Tiere, Pflanzen und Pilze sowie einige einzellige Vertreter, wie zum Beispiel die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. Mehrere Gründe sprechen für die Entwicklung eines Zellkerns:

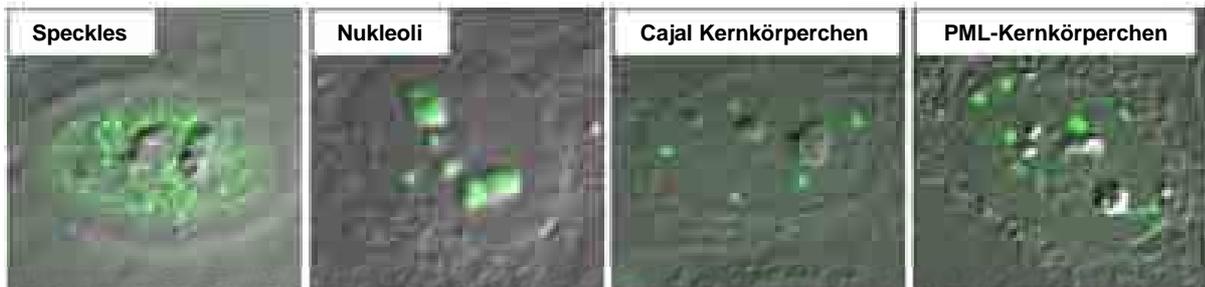
Zum einen ist das genetische Material vor Umwelteinflüssen besser geschützt, was Mutationen des Erbguts verringert. Zum anderen werden die eukaryontischen *messengerRNAs* nach der Transkription einem recht umfangreichen Reifungsprozess unterzogen und erst als reife *messengerRNAs* aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert. Die Zellkernmembran und der nötige Transport schaffen eine räumliche und zeitliche Trennung der beiden Prozesse der Proteinbiosynthese – Transkription und Translation – und ermöglichen so die ungehinderte Modifikation der *messengerRNAs*, bevor die Translation beginnt.

### 2.1.1 Subnukleäre Strukturen

Der Zellkern enthält charakteristische Substrukturen, die mit Hilfe der Elektronen- und Immunfluoreszenzmikroskopie beschrieben werden konnten. Diese Substrukturen haben keine Membranen, sind aber dennoch als Kompartimente anzusehen. Sie enthalten ein spezifisches Set an Proteinen, dessen Zusammensetzung die jeweilige Substruktur definiert. Zu diesen Substrukturen gehört neben den Nukleoli und anderen Domänen eine heterogene Gruppe sogenannter Kernkörperchen (Abbildung 2.2).

Im Jahre 1960 wurde von de Thé et al. die Existenz von Kernkörperchen („*nuclear bodies*“) im Nukleoplasma von Tumorzellen aus Kaninchen beschrieben (de Thé et al., 1960). Damit wurden die auffälligen, runden Strukturen im Interchromatin-Kompartiment von Zellkernen verschiedener normaler und maligner Zellen bezeichnet (de Thé, 1996). Zu diesem Zeitpunkt war eine Unterscheidung zwischen verschiedenen Typen von Kernkörperchen nicht möglich. Ungefähr 30 Jahre später wurden die Kernkörperchen durch die Verwendung von Autoimmunseren „wiederentdeckt“, da humane Autoantikörper gegen wichtige nukleäre Antigene in einigen der Kernkörperchen akkumulieren. Mithilfe dieser Antikörper konnten die Kernkörperchen unterschieden und nach den in ihnen enthaltenen Proteinen definiert werden (Ascoli und Maul, 1991, Brasch und Ochs, 1992).

Die Kernkörperchen sind zwischen 0,1 und 1,5  $\mu\text{m}$  groß und kommen in einer Vielzahl von Tier- und Pflanzenzellen vor (Williams et al., 1983, Boudonck et al., 1998, Moreno Diaz de la Espina et al., 1982, Chaly et al., 1983, Jensen und Brasch, 1985, Lafarga et al., 1991, Raska et al., 1990). Nicht in allen Fällen kann den Kernkörperchen eine eindeutige Funktion zugewiesen werden. Allerdings führt deren Misorganisation zu Krankheitsphänotypen (Spector, 1993, Lamond und Earnshaw, 1998, Misteli, 2001, Matera, 1999). Kernkörperchen



**Abb. 2.2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen verschiedener subnukleärer Strukturen.** Die beschriebenen Kernstrukturen sind mit Hilfe der indirekten Immunfluoreszenz markiert (grün), die Zellen sind mit dem Differentiellen Interferenz-Kontrast (DIC) aufgenommen. (Mikroskopaufnahmen aus Hemmerich und von Mikecz, 2000; verändert)

sind dynamische Strukturen und nehmen unter hyperaktiven oder hypertrophischen Bedingungen, wie sie in Krebsgeweben, viral transformierten Zellen, Hormon-sensitiven Geweben oder Lectin-stimulierten Lymphozyten vorliegen, in ihrer Zahl und/ oder Komplexität zu. Da sich die Kernkörperchen und Domänen innerhalb des Zellkerns bewegen können, können sie Faktoren für bestimmte Funktionen im Zellkern nicht nur anreichern und speichern, sondern auch zu aktiven Orten „transportieren“.

Im folgenden sollen die subnukleären Kompartimente Nucleoli, Speckles und OPT-Domänen sowie die Cajal Kernkörperchen kurz vorgestellt werden. Eine ausführliche Beschreibung der PML-Kernkörperchen folgt im Abschnitt 2.2.

## Der Nucleolus

Der Nucleolus ist die auffälligste subnukleäre Struktur. Pro Zellkern kommt mindestens ein Nucleolus vor; meist sind es einige wenige Nucleoli. Er bildet eine Transkriptions-„Fabrik“ für rRNAs, denn hier werden die 28 S, 18 S und 5,8 S-rRNAs durch die RNA-Polymerase I transkribiert und dann prozessiert. In den Nucleoli finden sich ungefähr 200 verschiedene „*small nucleolar RiboNucleoprotein Particles*“ (snoRNPs), die für das Spleißen von Prä-mRNAs wichtig sind. Neben der rDNA-Transkription und der Bereitstellung von Komponenten für das Spleißosom findet in den Nucleoli die Assemblierung der Prä-Ribosomalen Partikel statt, aus denen im Zytoplasma die Ribosomen zusammengesetzt werden (Scheer und Weisenberger, 1994). Ein Markerprotein des Nucleolus ist Fibrillarin.

Die Bildung der Nucleoli wird auf interessante Weise organisiert, denn ein Nucleolus bildet sich dort, wo sich die rRNA-Gene in Klustern zusammenlagern. Die rRNA-Gene sind in „*Tandem Repeats*“ unter anderem auf den Chromosomen 13, 15, 21 und 22 arrangiert.

„*Tandem repeats*“ sind kurze, identische DNA-Sequenzen, die sich mehrfach wiederholen. Im Fall der rRNA-Gene kommen ungefähr 180 Kopien einer 47 Kilobasen langen DNA-Sequenz vor. Die Regionen der rDNA-Repeats lagern sich zu „*Nucleolus Organizer Regions*“ (NORs) zusammen, die Struktur und Bildung des Nukleolus gleichsam „organisieren“. Der Nukleolus löst in den meisten eukaryontischen Zellen seine Struktur während der Mitose auf und formt sich nach der Mitose an den NORs neu.

### **Speckles**

Speckles sind verglichen mit den Kernkörperchen relativ große subnukleäre Strukturen. Ihre Markerproteine sind SC-35 oder die „Sm“-Proteine. Speckles enthalten eine große Zahl an Spleiß-Faktoren und könnten als „Spleiß-Fabriken“ bezeichnet werden, denn sie dienen der Versorgung und der Assemblierung von Komponenten des Spleißosoms (Misteli, 2000).

### **OPT-Domänen**

Der Name OPT-Domäne setzt sich aus den Namen der enthaltenen Proteine **O**ct1, **P**TF und dem Wort **T**ranskription zusammen. OPT-Domänen sind bis zu 1,5 µm groß. Es kommen sehr wenige oder sogar nur eine einzige im Zellkern vor. Ihre Struktur variiert während des Zellzyklus. Sie formen sich während der G<sub>1</sub>-Phase als relativ große Aggregate und lösen sich in der frühen S-Phase in immer kleiner werdende Aggregate auf. OPT-Domänen sind transkriptionell aktiv und assoziieren bevorzugt mit den Chromosomen 6 und 7. Ihre Funktion könnte die Bildung an Transkriptionsstellen bestimmter Gene und deren damit verbundene Aktivierung sein (Pombo et al., 1998).

### **Cajal-Kernkörperchen**

Die Cajal-Kernkörperchen wurden 1903 von dem Neurozytologen Ramón y Cajal beschrieben, der sie zunächst „*nucleolar ,accessory' bodies*“ nannte (y Cajal, 1903). Da sie unter dem Elektronenmikroskop wie ein Knäuel spiralisierter Fibrillen aussehen, werden sie auch als „*coiled bodies*“ bezeichnet. In einer Zelle sind 1-5 der 0,1-1 µm großen Cajal-Kernkörperchen enthalten. Ihre Zahl ist in schnell wachsenden Zellen besonders hoch (Spector et al., 1992, Brasch und Ochs, 1992). Das Markerprotein der Cajal-Kernkörperchen ist p80-Coilin, ein 80 kD-Protein. Daneben kommen in den Cajal-Kernkörperchen hauptsächlich „*small nuclear RibonucleoProteinParticles*“ (snRNPs), basale Transkriptionsfaktoren, Komponenten der drei RNA-Polymerase-Transkriptionskomplexe und snRNAs vor. Die Cajal-Kernkörperchen sind Orte der Prozessierung von „*small nuclear RNAs*“ (snRNAs) und „*small nucleolar RNAs*“ (snoRNAs) die am Spleißen der