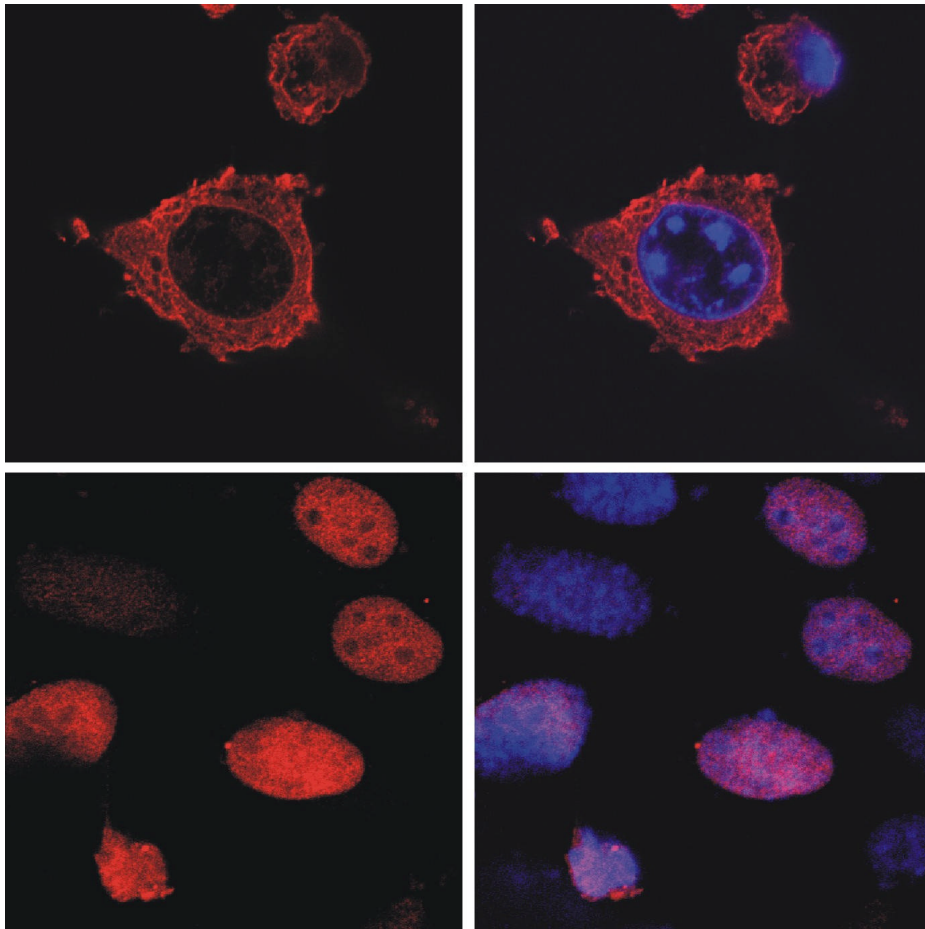


Eleonore Rohloff

# Herstellung und Charakterisierung eines zellkernspezifischen Inhibitors der Proteinkinase C



am Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin eingereichte  
Dissertation zur Erlangung des Grades Doktor der Naturwissenschaften

Berlin, 2003

*Gutachter:*

**Prof. Dr. Ferdinand Hucho**

Freie Universität Berlin  
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
Institut für Chemie / Biochemie  
Thielallee 63, 14195 Berlin

**PD Dr. Mathias Ziegler**

Freie Universität Berlin  
Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie  
Institut für Chemie / Biochemie  
Thielallee 63, 14195 Berlin

Datum der Disputation: 18.06.2003

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>V</b>
<b>Kurzfassung</b>	<b>1</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>3</b>
<hr/>	
<b>1.1 Die Familie der Proteinkinase C</b>	<b>3</b>
Struktur der Proteinkinase C	5
Regulation und Aktivierung der Proteinkinase C	8
Lokalisation und Translokation der Proteinkinase C	10
<b>1.2 Die nukleäre Proteinkinase C</b>	<b>11</b>
Regulation der PKC im Zellkern	12
Funktionen der nukleären Proteinkinase C	13
<b>1.3. Zell-permeable Peptide und Proteine</b>	<b>15</b>
Glaskapillaren-Mikroinjektion	16
HIV-1 Tat	16
Penetratin	17
VP22	18
<b>1.4. Apoptose</b>	<b>19</b>
Morphologie	19
Caspasen	21
Die Bcl-2 Familie	25
Nukleäre Effekte während der Apoptose	25
<b>2. ZIELSETZUNG</b>	<b>28</b>
<hr/>	
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>29</b>
<hr/>	
Das „Trojanische Pferd“ (TP), ein zellkernspezifischer Inhibitor der PKC?	29
Herstellung von TP	29
TP hemmt die PKC in vitro sehr effektiv	33
TP transloziert nicht in die Zellkerne	34

Das „virulente Trojanische Pferd“ (vTP), ein zellkernspezifischer Inhibitor der PKC	36
Herstellung von vTP	36
Translokation von vTP in die Zellkerne der NIH 3T3-, Neuro2a- und U937- Zellen	38
Expression von vTP in präparativem Maßstab	40
vTP führt zum Zelltod der NIH 3T3-Zellen	44
NIH 3T3-Zellen sterben durch Apoptose	46
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>49</b>
<hr/>	
Herstellung eines zellkernspezifischen Inhibitors der PKC	49
Hemmung der PKC	50
Apoptotische Wirkung des vTP	51
Zusammenfassung	53
<b>5. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>54</b>
<hr/>	
<b>5.1. Material</b>	<b>54</b>
<b>5.2. Methoden</b>	<b>58</b>
Molekularbiologische Methoden	58
Proteinchemische Methoden	61
Zellbiologische Methoden	67
Apoptose	69
<b>6. LITERATUR</b>	<b>70</b>
<hr/>	
<b>Danksagung</b>	<b>77</b>
<b>Lebenslauf</b>	<b>78</b>
<b>Publikationen</b>	<b>79</b>

# Abkürzungsverzeichnis

aPKC	atypische Proteinkinase C
cPKC	konventionelle (oder klassische) Proteinkinase C
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenolindol2HCl
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
kDa	Kilo-Dalton
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization
nPKC	neue Proteinkinase C
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (Synonym TPA)
PS	Phosphatidylserin
PKC	Proteinkinase C
PKCI	PKC-Inhibitor (hier: Pseudosubstratsequenz der cPKCs)
TPA	Tetradecanoyl-Phorbol-Acetat (siehe PMA)
TP	"Trojanisches Pferd", PKCI-NLS-Penetratin-Fusionspeptid
vTP	"virulentes Trojanisches Pferd", VP22-PKCI-Fusionsprotein