

# Kurzfassung

Um ein besseres Verständnis der Funktion der Proteinkinase C (PKC) im Zellkern zu erhalten und um die Funktion der nukleären PKC von der der zytosolischen PKC zu differenzieren, sollte im Rahmen dieser Arbeit ein zellkernspezifischer Inhibitor der Proteinkinase C hergestellt und charakterisiert werden. Es wurden dabei zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt: Zum einen wurde die inhibierende Pseudosubstratsequenz der konventionellen PKCs (PKCI) mit Penetratin und dem nukleären Lokalisationssignal (NLS) gekoppelt, wodurch der Inhibitor in die Zelle und in den Zellkern eindringen soll. Zum anderen wurde die Pseudosubstratsequenz mit dem Herpes Simplex Virusprotein VP22 verknüpft, wodurch eine schnelle und spezifische Translokation in den Zellkern gewährleistet werden soll.

Die Wirkung des PKCI-NLS-Penetratin-Fusionspeptids (TP) auf die Proteinkinase C wurde *in vitro* durch einen PKC-Aktivitätstest überprüft. Dieser Test ergab, dass TP die PKC im nicht stimulierten Zustand zu 84% und im stimulierten Zustand zu 97% hemmte. Ein ähnliches Ergebnis wurde mit dem kommerziell erhältlichen Pseudosubstrat erreicht. Es konnte jedoch keine Translokation in den Zellkern festgestellt werden.

Im Gegensatz dazu translozierte aber das VP22-PKCI-Fusionsprotein (vTP) schnell und spezifisch in die Zellkerne. vTP verhält sich dabei wie ein „virulentes Trojanisches Pferd“, durch das die inhibierende Pseudosubstratsequenz mit Hilfe des VP22 in den Zellkern eindringen kann und dort auf die Proteinkinase C inhibierend wirkt. Diese zellkernspezifische Inhibition unterscheidet sich von den herkömmlichen PKC-Inhibitoren, die sowohl die zytosolische, die Plasmamembran-assoziierte als auch die nukleäre PKC hemmen. Es konnte gezeigt werden, dass 3 bis 4 Tage nach der Transfektion viele NIH 3T3-Zellen starben. Da die Anzahl der toten Zellen im Vergleich zu pVP22-transfizierten Zellen hoch signifikant verschieden war (verifiziert mit dem Kruskal-Wallis- und dem Mann-Whitney-Test), schließen wir daraus, dass der Zelltod auf die Anwesenheit des PKC-Inhibitors zurückzuführen ist. Mit Hilfe des *Cell Death Detection* ELISA konnten wir zeigen, dass diese Zellen apoptotisch starben. Die nukleäre PKC scheint damit essentiell für das Überleben der Zellen zu sein.

## Abstract

In order to obtain fundamental insight in the function of protein kinase C (PKC) in the cell nucleus and in order to distinguish the role of the nuclear PKC from cytosolic PKC, a cell-nucleus specific inhibitor of protein kinase C has been prepared and characterized in this work. Two different approaches have been used: On the one hand, the inhibiting pseudosubstrate sequence of conventional PKCs (PKCI) was coupled to penetratin and a nuclear localization signal (NLS), thereby enabling translocation of the construct to the cell and its nucleus. On the other hand, the pseudosubstrate sequence has been coupled to the herpes simplex virion protein VP22 which provides an efficient and specific translocation to the cell nucleus.

The impact of the PKCI-NLS-penetratin fusion peptides (TP) on protein kinase C was verified *in vitro* by a PKC activity assay. This test showed that TP inhibits PKC by 84% in a not stimulated state and by 97% in a stimulated state. Similar results were obtained by a commercially available pseudosubstrate. However, no translocation to the cell nucleus was observed with these constructs.

In contrast to this, the VP22-PKCI fusion protein (vTP) translocated fast and efficiently to cell nuclei. vTP acts like a „virulent Trojan Horse“ insomuch that the inhibitor of PKC penetrates into the cell and subsequently into the cell nucleus where it inhibits PKC. This cell nucleus-specific inhibition is different from conventional PKC inhibitors which act on cytosolic, plasma membrane-associated as well as nuclear PKC. It could be shown that most NIH 3T3 cells have died after 3 to 4 days after transfection. Since the number of dead cells was significantly higher than after transfection with pVP22 (as verified by the Kruskal-Wallis-test and Mann-Whitney-test), we conclude that cell death is due to the presence of the PKC inhibitor. By means of a *Cell Death Detection* ELISA, it was possible to show that these cells die by apoptosis. Therefore, nuclear PKC seems to be essential for the survival of these cells.