

4. Diskussion

Herstellung eines zellkernspezifischen Inhibitors der PKC

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ein zellkernspezifischer Inhibitor der Proteinkinase C hergestellt und charakterisiert werden. Dabei wurden zwei Ansätze verfolgt: Der zellkernspezifische Transport der inhibierenden Pseudosubstratsequenz der cPKCs (PKCI) sollte zum einen mit Hilfe von Penetratin, gekoppelt an ein NLS (TP-Fusionspeptide), und zum anderen mit Hilfe des Herpes Simplex Virusproteins VP22 (vTP) erfolgen.

Es konnten verschiedene PKCI-NLS-Penetratin-Fusionspeptide hergestellt werden, die alle in die Zelle, jedoch nicht in den Zellkern translozierten. Dies könnte daran liegen, dass das TP eine Konformation einnimmt, in der das NLS nicht frei zugänglich vorliegt. Somit kann mit den PKCI-NLS-Penetratin-Fusionspeptiden keine zellkernspezifische Hemmung der PKC erreicht werden.

Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass vTP nach seiner Expression spezifisch in die Zellkerne vieler umliegender Zellen transloziert. Diese Zellkerntranslokation von vTP konnte sowohl in den adhären Zellen NIH 3T3 und Neuro2a als auch in den Suspensionszelllinie U937 beobachtet werden. Die Anzahl der transfizierten Zellen und die der vTP-enthaltenen Zellkerne entspricht der von Elliott und O'Hare [1997] berichteten Verteilung.

Dieses Ergebnis wird unterstützt durch die Beobachtungen, dass Fusionsproteine wie VP22-p53 [Phelan et al., 1998; Roy et al., 2002; Wills et al., 2001] und VP22-Thymidinkinase [Dilber et al., 1999] ihre Fähigkeit beibehalten, sich interzellulär auszubreiten und sich in den Zellkernen anzureichern. Im Gegensatz dazu stehen jedoch Fusionsproteine wie VP22-EGFP (VP22-*enhanced green fluorescent protein*) [Lai et al., 2000] und VP22-GFP [Derer et al., 1999; Fang et al., 1998], die sowohl im Zellkern als auch vor allem im Zytoplasma vorkommen. Für diese Fusionsproteine konnte durch die intrinsische GFP-Fluoreszenz weder ein interzellulärer Transport noch eine nukleäre Akkumulation beobachtet werden. Elliott und O'Hare [1999] lösten diesen Widerspruch: Es war unmöglich, den interzellulären Transport durch intrinsische GFP-Fluoreszenz zu bestimmen, da die transportierte Proteinmenge zu niedrig war, um sie durch intrinsische GFP-Fluoreszenz zu detektieren, oder da die GFP-Fluoreszenz auf Grund der geringen Menge zu schnell ausgebleicht wurde. Verwendeten Elliott und

O'Hare jedoch Antikörper gegen GFP, die viel empfindlicher sind als die intrinsische GFP-Fluoreszenz, war es ihnen möglich, sowohl den interzellulären Transport als auch die nukleäre Akkumulation von VP22-GFP nachzuweisen [Elliott and O'Hare, 1999; Brewis et al., 2000].

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurde nie ein Zwischenstadium beobachtet, d.h. eine Lokalisation der Fusionsproteine nur im Zytoplasma oder sowohl im Zytoplasma als auch im Kern der Empfängerzelle. Daraus lässt sich folgern, dass der Transport von vTP nach seinem Eintritt in die Empfängerzelle sehr schnell in den Zellkern erfolgt, so dass eine inhibitorische Wirkung auf die zytosolische PKC sehr unwahrscheinlich ist.

Weiterhin ist interessant, dass vTP im Zellkern nicht diffus verteilt zu sein scheint, wie auf den Abbildungen 21E/ G und N/ P besonders gut zu sehen ist. Die Regionen der Nukleoli bleiben ausgespart, was sehr gut mit den Ergebnissen von Beckmann et al. [1994] übereinstimmt: In NG-108-15-Zellen war die PKC α im Zellkern lokalisiert, mit Ausnahme der Nukleoli. Somit ist vTP in den gleichen Kernregionen lokalisiert wie PKC α .

Hemmung der Proteinkinase C

Innerhalb dieser Arbeit gelang es nicht, ausreichend vTP- bzw. VP22-Protein zu isolieren, um durch einen *in vitro* PKC-Aktivitätstest die inhibitorische Wirkung von vTP auf die PKC zu überprüfen. Dazu sind weitere Expressionsversuche notwendig. So könnte z.B. eine Änderung der Temperatur von 37°C auf 30 bis 20°C während des Bakterienwachstums dazu führen, dass vTP bzw. VP22 sich als lösliche Proteine im Überstand anreichern, so dass die Isolierung nicht unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt werden muss. Vielleicht würde auch der Wechsel zu einem anderen Bakterienstamm zu einer ausreichenden Proteinausbeute führen.

Da aber gezeigt werden konnte, dass bei den VP22-p53- [Roy et al., 2002; Wills et al., 2001], VP22-Thymidinkinase- [Dilber et al., 1999] und VP22-GFP- [Elliott and O'Hare, 1999; Brewis et al., 2000] Fusionsproteinen die Aktivität sowohl von VP22 als auch von p53, der Thymidinkinase bzw. GFP erhalten blieb, schließen wir daraus, dass auch die inhibitorische Wirkung der Pseudosubstratsequenz in vTP auf die

Proteinkinase C erhalten geblieben sein sollte. Dies wird auch durch die Experimente mit TP nahegelegt.

Ein PKC-Aktivitätstest konnte mit dem Fusionsprotein TP durchgeführt werden. Die sehr effektive Inhibition der PKC durch TP ist auf eine kompetitive Hemmung zurückzuführen. Das Enzym kann bei einer kompetitiven Hemmung sowohl das Substrat als auch den Inhibitor binden. Somit vermindert der Inhibitor die Katalysegeschwindigkeit, indem er den Anteil der Enzymmoleküle mit gebundenem Substrat verringert. Bemerkenswert ist, dass die Inhibitoren selbst bei einem großen Überschuss die PKC so wirksam hemmen können. Das konnten auch House und Kemp 1987 für die Wirkung des Pseudosubstrats zeigen. Dieses Ergebnis könnte sich jedoch auch auf vTP übertragen. Da der PKC-Inhibitor, der an das VP22 gekoppelt wurde, der gleiche ist, der mit Penetratin und NLS verknüpft wurde, müsste auch er die PKC hemmen.

Apoptotische Wirkung des vTP

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Transfektion die Anwesenheit von vTP zum Tod von NIH 3T3-Zellen führt. Jedoch könnte dieser Zelltod auch durch VP22 verursacht werden. In unseren Experimenten hatten VP22 und Superfect in der Tat einen kleinen apoptotischen Effekt, allerdings war die Induktion der Apoptose durch vTP im Vergleich zu VP22 signifikant höher. In den Experimenten von Wills et al. [2001], in denen rekombinante Adenoviren verwendet wurden, die VP22-GFP-Fusionsproteine oder GFP allein exprimierten, konnte bei den infizierten Zellen keine Apoptose nachgewiesen werden. Desgleichen wurde auch in anderen VP22-EGFP- und VP22-GFP-Studien von keinem apoptotischen Effekt berichtet [Lai et al., 2000; Derer et al., 1999; Fang et al., 1998; Elliott and O'Hare, 1999]. Daraus kann gefolgert werden, dass VP22 nicht der Grund für die beobachtete Toxizität sein kann, sondern dass nach Transfektion mit pvTP die NIH 3T3-Zellen durch die Anwesenheit des PKC-Inhibitors im Zellkern apoptotisch sterben.

Mit der Identifizierung der verschiedenen PKC-Isoformen wurden ihre individuellen Rollen in der Regulation der Apoptose in verschiedenen Systemen untersucht. Diese Untersuchungen können unterteilt werden: Zum einen gibt es Studien, bei denen erst Apoptose durch verschiedene Stimuli induziert wird und anschließend die

Expressionsniveaus oder Lokalisationen der PKC bestimmt werden, und zum anderen existieren Studien, bei denen zuerst die PKC inhibiert und dann das Ergebnis der PKC-Inhibition, z.B. Apoptose, untersucht wird. In beiden Fällen gibt es Berichte, die PKC α [Ruvolo et al., 1998], β I [Jiang et al., 2002], β II [Evans et al., 1995], ϵ and ι [Leverrier et al., 2002] mit dem Überleben und anti-apoptotischen Effekten assoziieren, während PKC θ and δ pro-apoptotisch wirken [Brodie and Blumberg, 2003; Leverrier et al., 2002]. Andererseits gibt es jedoch auch Studien, die genau das Gegenteil zeigen (pro-apoptotisch: PKC α [Shimizu et al., 1998; Leverrier et al., 2002], ϵ [Leverrier et al., 2002]; anti-apoptotisch: PKC δ [Pongracz et al., 1995]). Andere Untersuchungen sind in sich widersprüchlich. So wird z.B. in HL60-Zellen Apoptose durch den PKC-Inhibitor 7-Hydroxystaurosporin (UCN-01) induziert. Die PKC α -Aktivität war zunächst 1 Stunde lang inhibiert, erhöhte sich aber anschließend, was 3 Stunden nach der UCN-01-Behandlung zum apoptotischen Zelltod führte [Shao et al., 1997]. Ebenso wurde die PKC β I-Aktivität zum einen durch die UCN-01-Inhibition gehemmt, zum anderen lag während der Apoptose PKC β I proteolytisch aktiviert vor [Shao et al., 1997]. Im frühen Apoptosestadium der T-Zellen, induziert durch Cytokinentzug oder Fas-Ligation, translozierte PKC δ in den Zellkern [Scheel-Toellner et al., 1999]. IFN- β , ein Cytokin, das die T-Zell-Apoptose hemmt, wurde nach der nukleären Translokation von PKC δ dazugegeben. Dies führte zu einer reversen Translokation der PKC δ vom Kern zum Zytosol und damit zu keinem apoptotischen Zelltod [Scheel-Toellner et al., 1999].

Diese Beispiele zeigen, dass das Verständnis der PKC im Zusammenhang mit Apoptose noch am Anfang ist. Es ist notwendig, mehr Details über Wechselwirkungen, Signalbahnen und zeitliche Abläufe zu erhalten. Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Organell-spezifische Inhibitor der PKC stellt somit ein wertvolles Werkzeug dar, um die Rolle der nukleären PKC in der Apoptose und anderen zellulären Prozessen zu untersuchen. So könnte z.B. untersucht werden, welche Caspasen aktiviert in den Zellkernen lokalisiert sind, in denen vTP angereichert vorliegt, oder welche Wirkung vTP auf die Zellen ausübt, wenn seine Pseudosubstratsequenz so verändert wurde, dass sie nicht mehr inhibierend wirkt.

Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, einen zellkernspezifischen Inhibitor der Proteinkinase C herzustellen und zu charakterisieren, um mehr Informationen über die Funktionen der nukleären PKC zu erhalten. Es wurden dabei zwei unterschiedliche Wege verfolgt: Zum einen wurde die inhibierende Pseudosubstratsequenz der cPKCs mit Penetratin und dem nukleären Lokalisationssignal, NLS, gekoppelt und zum anderen wurde die Pseudosubstratsequenz mit dem Herpes Simplex Virusprotein VP22 verknüpft. Obwohl das PKCI-NLS-Penetratin-Fusionspeptid TP die Proteinkinase C in vitro sehr effektiv inhibieren konnte, war jedoch keine spezifische Translokation dieser Penetratin-Fusionspeptide in den Zellkern möglich. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass das VP22-PKCI-Fusionsprotein vTP nach seiner Expression in wenigen Zellen in die Zellkerne der umliegenden Zellen translozierte. Drei bis vier Tage nach Transfektion der NIH 3T3-Zellen mit vTP starb eine signifikant hohe Anzahl von Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass diese Zellen apoptotisch sterben.

Die zellkernspezifische Inhibition unterscheidet sich von den herkömmlichen PKC-Inhibitoren, die sowohl die zytosolische als auch die Plasmamembran-assoziierte und die nukleäre PKC hemmen. Außerdem kann der beobachtete Effekt der Inhibition im Zellkern auf die konventionellen PKC-Isoformen eingegrenzt werden, da nur auf diese die Pseudosubstratsequenz inhibierend wirkt.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein zellkernspezifischer Inhibitor der Proteinkinase C hergestellt werden, der den apoptotischen Zelltod induziert. Somit scheinen die nukleären cPKCs essentiell für das Überleben dieser Zellen zu sein.