

1 Einleitung

Während die Prokaryontenzelle keine Kompartimentierung aufweist, besitzen die Zellen der Eukaryonten eine Reihe von Organellen als Membran-umschlossene Bereiche mit spezifischen Funktionen.

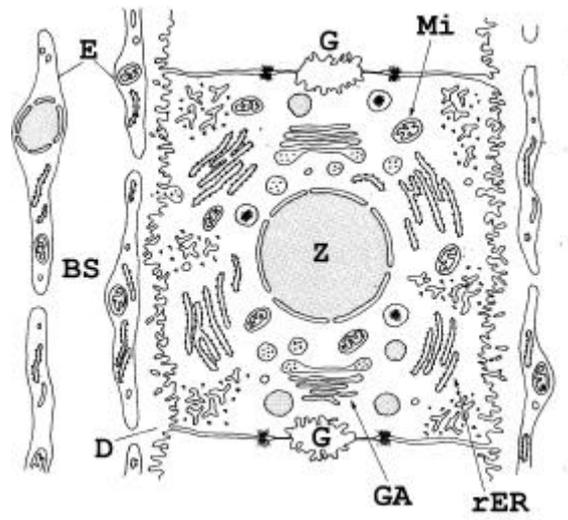


Abb. 1: Schema eines Hepatocyten und seiner Umgebung (modifiziert nach [1])

Z: Zellkern (Nucleus); GA: Golgi-Apparat; Mi: Mitochondrien; rER: rauhes ER; G: Gallenkanal zwischen zwei Hepatocyten; E: Endothelzellen der Blutsinusoiden ohne Basallamina; BS, Blutsinusoiden; D: Disse-Raum zwischen Hepatocyt und Endothel. Die Anordnung der intrazellulären Kompartimente (in sehr verminderter Zahl) entspricht in etwa der Situation in vivo.

Die Strukturierung in Cytosol (Cytoplasma), Zellkern (Nucleus), Plasmamembran und Zellorganellen (s. Abb. 1) wie Endoplasmatisches Retikulum (ER), Mitochondrien (Mi), Lysosomen, Chloroplasten und Golgi-Apparat (GA), hat entscheidende Vorteile. So kann der Ablauf toxischer Radikalreaktionen, wie sie in der Atmungskette (Mitochondrien) und der Photosynthese (Chloroplasten) stattfinden, nicht zur irreversiblen Schädigung der Zelle führen. Desweiteren sind proteolytische Reaktionen in den Lysosomen der Zelle möglich, ohne diese in ihrer Gesamtfunktion zu beeinträchtigen. Zusätzlich läßt die Kompartimentierung die Speicherung, Konzentrierung und kontrollierte Ausschüttung von Inhaltsstoffen zu, wie sie z.B. bei der Ausschüttung von Neurotransmittern an der synaptischen Spalte von Nervenenden zu beobachten ist. Letztendlich macht ein gerichteter vesikulärer Stofftransport von Membranrezeptoren, -proteinen und Lipiden die Polarisierung von eukaryontischen Zellen und Zellverbänden erst möglich.

Von entscheidender Bedeutung für die Aufrechterhaltung der spezifischen Funktion und Zusammensetzung der verschiedenen Organellen ist, daß die dazu nötigen Enzyme, Proteine und Lipide gezielt an ihren Bestimmungsort transportiert werden. Während cytoplasmatische Proteine an freien Polysomen synthetisiert werden und sich im gesammeltem Cytoplasma verteilen, werden die Proteine der Zellorganellen (mit Ausnahme von Mitochondrien und Chloroplasten) wie auch die Sekretproteine an Membran-gebundenen Ribosomen synthetisiert. Bei der Synthese werden die naszierenden Peptide durch die Membran des ER transportiert. Das ER ist ein stark verzweigtes tubuläres Membransystem, das zwei Subdomänen ausbildet: in Verbindung mit den Ribosomen, die an das ER gebund sind, entsteht die erste Subdomäne, die als rauhes ER bezeichnet wird. Die am rauhen ER neu synthetisierten Proteine werden im Lumen der Organelle modifiziert und gefaltet [2], um anschließend von dem glatten ER, der zweiten Subdomäne des ER, das keine Ribosomen bindet und an der Biosynthese von Membranlipiden beteiligt ist [3], über Vesikel zum Intermediärkompartiment, einem nur z.T. charakterisierten tubulo-vesikulärem Kompartiment, transportiert zu werden.

Von dort erreichen sie dann das cis-Golgi-Netzwerk (s. Abb. 2).

Auf der cis-Seite des GA fusionieren die vom Intermediärkompartiment kommenden Vesikel mit der Membran, und die transportierten Membranproteine und löslichen Proteine werden einer weiteren stufenweisen Glykosylierung, Sulfatierung oder Phosphorylierung unterworfen. Die dazu notwendigen Enzyme sind entsprechend den aufeinanderfolgenden Reaktionsschritten in den verschiedenen Zisternen angeordnet. Für eine sequentielle Modifizierung der Proteine gibt es prinzipiell zwei Möglichkeiten:

1. Die Proteine werden von einer Zisterne zur nächsten in Vesikeln transportiert und die Enzyme verbleiben an ihrem Platz (Transportmodell),
oder
2. die Proteine verbleiben in der ursprünglichen Zisterne und die modifizierenden Enzyme werden durch Vesikel zu einer sich auf der cis-Seite befindlichen Zisterne transportiert. Dabei reift das cis-Golgi-Netzwerk (CGN) zur ersten Zisterne des Stapels [4,5]. Auf diese Weise verbleiben die Proteine in der ursprünglichen Zisterne, die aber funktionell zur nächsten Zisterne des Stapels heranreift (Reifungs- oder Maturationsmodell). Das Verbleiben von großen Proteinstrukturen wie z.B. von Kollagenfasern oder von Zellwandkomponenten bei Algen in den Zisternen, wie auch der Nachweis von retrograden Transportvesikeln, die Glykosylierungsenzyme transportieren, unterstützen das Reifungsmodell, obgleich seine unbedingte Gültigkeit bisher nicht bewiesen ist.

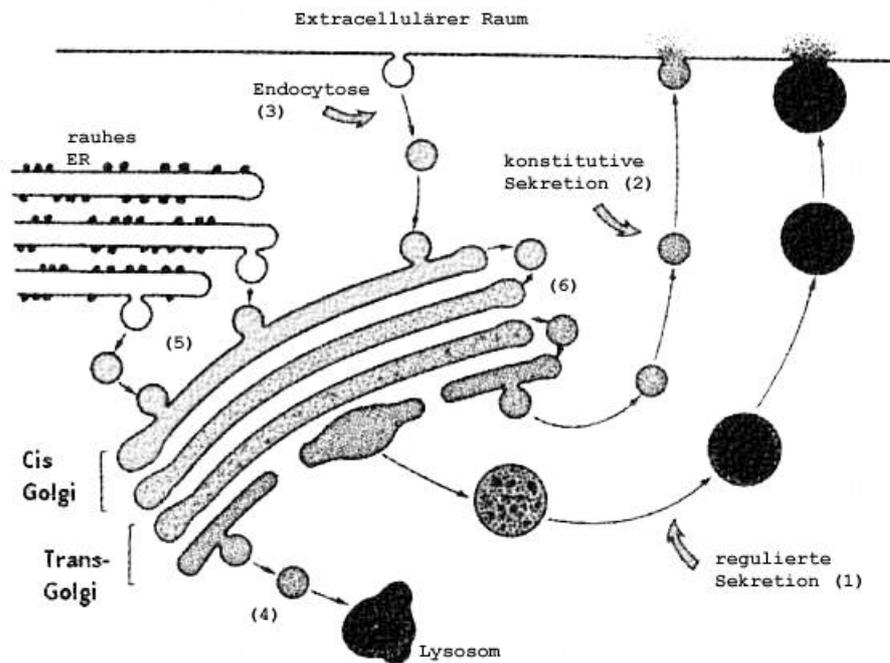


Abb. 2: Der GA modifiziert nach [6].

Der GA stellt ein morphologisch komplexes System dar, das im zentralen Bereichen aus gestapelten, flachen Zisternen, den Dictyosomen, besteht und das im Eingangs- und Ausgangsbereich von röhrenförmigen Netzwerken gesäumt wird. Diese werden als cis- (CGN) sowie trans-Golgi-Netzwerk (TGN) [7] bezeichnet.

Einige der Transportprozesse der eukaryotischen Zelle, an denen der GA beteiligt ist, sind unter anderem die regulierte Sekretion (1), die konstitutive Sekretion (2), die Endocytose (3), die Reifung von Lysosomen (4), der ER-Golgi-Transport (5) sowie der intra-Golgi-Transport (6).

Nachdem die Proteine den Golgi passiert haben, werden sie im trans-Golgi-Netzwerk (TGN) sortiert und in spezifische Vesikel verpackt, die sie zu den Endosomen oder zur Plasmamembran transportieren (anterograde Transport). Um die Homöostase der Membrankompartimente aufrechtzuerhalten, müssen vesikuläre Proteine und Lipide sowie endocytierte Proteine in der gegenläufigen Richtung transportiert werden (retrograde Transport). Im Folgenden soll auf die anterograden Transportprozesse die am Golgiapparat ihren Ursprung haben, näher eingegangen werden.

1.1 Der Vesikeltransport

Prinzipiell lassen sich zwei Mechanismen des Vesikeltransportes unterscheiden. In jeder Zelle werden kontinuierlich bestimmte Proteine produziert, die über ER, Golgi und TGN zur Plasmamembran transportiert werden, um entweder in diese eingebaut oder sekretiert zu werden. Ein zweiter wichtiger anterograder Transportweg, der ebenfalls kontinuierlich abläuft, führt vom TGN zu den Endosomen und Lysosomen. Da diese Transportprozesse nicht spezifisch von äußeren Faktoren reguliert werden, spricht man von einem **konstitutiven Transport**. In endokrinen und exokrinen Zellen werden am TGN zusätzlich Sekretgranula gebildet, die nur bei einer spezifischen, Rezeptor-abhängigen Stimulierung der Zelle mit der Plasmamembran verschmelzen und ihren Inhalt freisetzen. In diesem Fall wird von einem **regulierten Transportweg** gesprochen. Für weitere Ausführungen zum regulierten Transport sei auf die Übersichtsarbeiten [8,9] und [10] hingewiesen.

1.2 Die Bildung konstitutiver Transportvesikel am trans-Golgi Netzwerk (TGN)

Der überwiegende Teil der neusynthetisierten Proteine von konstitutiv sekretierenden Zellen (z.B. Fibroblasten und Epithelzellen) wird am TGN mindestens in zwei, möglicherweise aber auch in eine größere Zahl von heterogenen Vesikelpopulationen verpackt:

- Clathrin-umhüllte Vesikel (CCVs), die lysosomale Proteine zu den Endosomen/lysosomen transportieren, und
- Vesikel mit anderen Hüllproteinen, die Membran- und/oder Sekretproteine zur Plasmamembran transportieren [8].

1.2.1 Clathrin umhüllte Vesikel

Der konstitutive Transport löslicher Proteine zu den späten Endosomen und von dort zu den Lysosomen erfolgt direkt vom TGN mittels CCVs. Um dies zu gewährleisten, werden die lysosomalen Proteine vermutlich schon im cis-Golgi mit Mannose-6-Phosphat modifiziert [11]. Diese Modifizierung wird im TGN durch Mannose-6-Phosphat-Rezeptoren (MPRs) [12,13] erkannt, und die entsprechenden Proteine an den Rezeptor gebunden. Von den zwei bisher bekannten MPRs ist der Kationen-abhängige MPR nachweislich am Transport zum Endosom beteiligt [14,15]. Der cytoplasmatische Bereich des MPR interagiert dann mit dem Golgi-Adaptorproteinkomplex AP-1, der sich aus den Untereinheiten γ -Adaptin, β' -Adaptin, AP47 und AP19 zusammensetzt [16,17]. Bevor AP-1 jedoch an die Golgimembran und an den Bindungsrezeptor [18] binden kann, muß es durch ARF modifiziert werden [19,20].

Ist AP-1 erst an der Donormembran gebunden, rekrutiert es cytosolisches Clathrin an die TGN-Membran. Die dabei entstehende Clathrin-Vesikelhülle (Clathrin-Coat) besteht aus Clathrin-Triskelion-Komplexen, die ihrerseits aus drei schweren Clathrin-Untereinheiten mit ca. 190 kD und drei leichten Clathrin-Untereinheiten mit ca. 35 kD aufgebaut sind [15]. Die Ausbildung der Clathrin-Hülle ist vermutlich eine Voraussetzung für die Abschnürung von CCVs von der Golgimembran.

In neuronalen Zellen ist darüber hinaus ein weiterer Clathrin-bindender Adapterkomplex identifiziert worden [21]. Dieser als AP-3 bezeichnete Komplex wurde am GA nachgewiesen [22] und scheint für den Transport von Membranproteinen zu den Lysosomen [23] verantwortlich zu sein (vergl. Übersichtsarbeit [24]).

1.2.2 Konstitutive exocytotische/sekretorische Vesikel

Mit großer Wahrscheinlichkeit werden die unterschiedlichen Proteinklassen bei der konstitutiven Exocytose in separaten Vesikeln transportiert. Dies konnte u.a. an Leberzellen, die nur über die konstitutive Sekretion verfügen, gezeigt werden [25]. Durch Immunsorption ließen sich Vesikel, die Membranproteine enthielten, von solchen trennen, die Sekretproteine transportierten [25]. Eine detaillierte Analyse von den in vitro am Golgi gebildeten Vesikeln - mit Hilfe der Immun-Elektronenmikroskopie - zeigte, daß in Hepatomzellen neben AP1-markierten Vesikeln, die Mannose-6-phosphat-Rezeptoren und lysosomale Proteine transportieren, drei weitere Vesikeltypen unterschieden werden können. Der Nachweis der letzteren erfolgte indirekt, da Vesikel entweder mit Antikörpern gegen Transferrin, Asialoglykoprotein-Rezeptor oder Heparansulfat-Proteoglykanen (HSPGs) markiert werden konnten, eine Doppelmarkierung aber mit statistischen Verfahren ausgeschlossen werden konnte [26].

Weder Clathrin noch Coatomer (COP I) sind als Hüllproteine an der konstitutiven Exocytose vom TGN zur Plasmamembran beteiligt. Ladinsky et al. konnten aber elektronenmikroskopisch in nichtpolarisierten NRK-Zellen einen sogenannten „lace-like Coat“ an den Knospungen von TGN-Membranen nachweisen, der möglicherweise die konstitutive Vesikelbildung bewirkt [27]. Die daraus resultierenden Vesikel [28], die sich sowohl von CCVs als auch von COPI-umhüllten Vesikeln unterscheiden [29], enthalten neben p200, das als nichtmuskuläres Myosin II wiedererkannt wurde [30,31] auch TGN38 [32], welches möglicherweise als Dimer die Aufgabe des Transportrezeptors übernimmt [15,33]. Biochemische Experimente machen wahrscheinlich, daß noch weitere Proteine an der Bildung dieser konstitutiven exocytischen Vesikel beteiligt sind. Bisher konnten eine 62 kD große Serin/Threonin-Kinase (p62) assoziiert an Rab6 und andere kleine GTPasen und eine ca. 100 kD große katalytische Untereinheit einer PI3-Kinase [32] identifiziert

werden. Eine weitere Komponente des lace-like Coats könnte AP47 darstellen, das mit TGN38 in vitro interagiert [22].

Die Tatsache, daß Antikörper gegen die cytoplasmatische Domäne von TGN38 oder p200 den Transport zur Plasmamembran inhibieren, kann als Nachweis dafür gewertet werden, daß die genannten Proteine für den beschriebenen Transportweg essentiell sind [32].

„p230“ [34,35] das am TGN gebunden ist und auch an „coated buds“ wie auch Vesikeln nachgewiesen wurde [35], könnte an der konstitutiven Exocytose einer anderen Vesikelpopulation beteiligt sein. Andere Hüllproteine, wie z.B. Myosin II, könnten den Vesikeltransport in der Zelle vermitteln [36].

1.2.3 Apikal- und basolateral-gerichteter, konstitutiver Vesikeltransport

Die Mechanismen zur Bildung von post-Golgi Vesikeln am TGN, die konstitutiv sekretierende Proteine oder Membranproteine enthalten, sind bisher nur ansatzweise verstanden worden ([37], s. Kap. 1.2.2). Es wurde angenommen, daß in nicht polarisierten Zellen alle Proteine, die keine Sortierungsmotive aufweisen (s. Kap. 1.3), in konstitutive Transportvesikel verpackt und automatisch zur Plasmamembran transportiert werden [7,8].

Nach neueren Untersuchungen scheint es aber auch in nichtpolarisierten Zellen, wie Fibroblasten, Vesikelpopulationen zu geben, die eine „basolaterale“- bzw. „apikale“ Adressierung aufweisen [38].

In polarisierten Zellen (z.B. Epithelzellen) ist es dagegen zwingend notwendig, daß Membranproteine und sekretorische Proteine für den Transport in basolateral- oder apikal-gerichtete Vesikel sortiert werden. Im Fall von MDCK-Zellen konnte nach Infektion mit Viren gezeigt werden, daß die Sortierung von viralen Proteinen im TGN stattfindet und ihr Transport direkt zur basolateralen (VSV G-Protein) oder zur apikalen Zellmembran (Influenza Hemagglutinin) erfolgt [39-42].

In Hepatocyten werden die apikal- und basolateral-gerichteten Proteine bereits im TGN in verschiedene Vesikelpopulationen sortiert. Für den Transport von Membran- und Sekretproteinen zur sinusoidalen (basolateralen) Plasmamembran sind sogar zwei unterschiedliche Vesikelpopulationen [25] nachgewiesen worden.

In Hepatocyten wird der überwiegende Teil der apikal-gerichteten Proteine zunächst zur basolateralen Membran transportiert und von dort durch Transzytose zur apikalen Membran

weitergeleitet [43,44]. Einige Zelllinien benutzen für den Transport zur apikalen Membran offenbar sowohl den transzytotischen als auch den direkten Transportweg [15].

1.3 Mechanismen der Sortierung von transportierten Proteinen

Für die Sortierung eines durch Vesikel zu transportierenden Proteins ergeben sich drei prinzipielle Möglichkeiten [45]:

- das Protein verbleibt in der Donororganelle, wenn ein Retentionssignal vorliegt (Sortierung durch Retention),
- das Protein wird in Transportvesikeln konzentriert, sofern es ein spezielles Sortierungssignal aufweist (Sortierung durch Selektion),
- das Protein diffundiert entsprechend seiner Umgebungskonzentration in die Transportvesikel, wenn weder das eine noch das andere Signal vorhanden ist (Verteilung entsprechend dem „bulk flow“ Modell).

1.3.1 Sortierung durch Retention

Ein spezieller Typ von Sortierungssignalen stellen Retentionssignale dar, die festlegen, ob ein Protein in einem Membrankompartiment verbleibt oder zum nächsten weiterwandert. Ein Retentionssignal - wie z.B. die C-terminale KDEL-Sequenz - kann auch die Rückführung von Proteinen aus dem Golgi in das ER bewirken, wenn es von entsprechenden Rezeptoren erkannt wird. Andere ER-residente Membranproteine weisen an ihrem cytoplasmatischen Ende Peptidmotive der Art KKXX oder XXRR auf. Das Chaperon Calnexin z.B. ist C-terminal durch das Peptidmotiv RKPRRE markiert [1].

1.3.2 Sortierung durch Selektion

Bei der bereits oben erwähnten **basolateralen Sortierung** in polarisierten und unpolarisierten Zellen konnte nachgewiesen werden, daß es sich dabei um einen spezifischen Signal-abhängigen Prozeß handelt, für den spezifische Signale in der cytoplasmatischen Domäne der Membranproteine verantwortlich sind. Zwei dieser Signale wurden bisher identifiziert: ein Tyrosin-basiertes Signal und ein Di-Leucin-Motiv (auch Leucin-Isoleucin-Motiv) [46,15]. Experimentelle Beobachtungen ergaben, daß nach der Entfernung der basolateralen Zielsteuerungsmotive Proteine immer zur apikalen Membran transportiert werden und führte zu der Annahme, daß die apikale Sortierung von Proteinen nicht durch Sortierungssignale gesteuert werde [15]. Tatsächlich erhärten sich Hinweise darauf, daß die **apikale Sortierung** durch Glykosylierungssignale auf dem Transportprotein [47-49]

und Glycosphingolipid-anreichernde Mikrodomänen auf der Vesikeldonormembran gesteuert wird [50,51].

1.3.2.1 Tyrosin-haltige Sortierungsmotive

Tyrosin-haltige Peptide sind u.a. an der Sortierung in die CCV beteiligt. Neuere Untersuchungen deuten an, daß die Art und Sequenz der das Tyrosin umgebenden Aminosäuren einen direkten Einfluß auf die Affinität zu den hier beteiligten Adaptorkomplexen hat [52].

Der Tyrosinrest könnte zur Ausbildung eines „ β -turns“ benötigt werden, der bei der Endocytose erkannt wird, aber möglicherweise auch der anterograden Sortierung dient [10]. Als Beispiel für ein derartiges Sortierungssignal ist das Motiv YKYSKV in der cytoplasmatischen Domäne des Chlorid-unabhängigen Mannose-6-Phosphat-Rezeptors identifiziert worden, das für die Sortierung zum Endosom verantwortlich ist [53]. Das Tyrosinmotiv GYXXZ (Z=hydrophobe Aminosäure) sorgt dafür, daß lysosomale Membranproteine zuerst zur Plasmamembran transportiert werden und dann durch Endocytose die frühen Endosomen erreichen [54].

Auch für die Sortierung in konstitutive sekretorische Vesikel am TGN scheint eine auf Tyrosin basierende Sortierungssequenz verantwortlich zu sein [15,46,52]. Eine Zusammenstellung über bisher bekannte Tyrosinmotive liefert z.B. [53].

1.3.2.2 Di-Leucin Motive

Di-Leucin-Motive sind nicht so häufig anzutreffen wie die auf Tyrosin basierenden Signalmotive, konnten aber in verschiedenen Proteinen wie MPRs, der γ -Kette des Antigen Rezeptors der T-Zellen oder CD4 nachgewiesen werden. Ihre Beteiligung an den Vesikeltransportprozessen ist mittlerweile abgesichert [15,46]. Ein Dileucin-Sortierungssignal ist z.B. die topogene Peptidsequenz LLFYVF [15], die für den Transport von Proteinen zu den Endosomen mitverantwortlich ist. Der Rezeptor, der mit dem Di-Leucin-Motiv an der Vesikel-bildenden Donormembran in Wechselwirkung tritt, ist bisher unbekannt [55].

1.3.2.1 Glykosylierungssignale und Sphingolipid-artige Sortierungssignale

Für den Transport vom GA zur apikalen Zelloberfläche ist in polarisierten Zellen ein C-terminaler Glykophosphatidyl-Inositol-Anker (GPI-Anker) verantwortlich [45,56-58]. Die Sortierung der GPI-modifizierten Proteine zur apikalen Zellmembran erfolgt wahrscheinlich durch deren Einschluß in Sphingolipid-haltige Mikrodomänen [10]. Diese Detergenz-unlöslichen Mikrodomänen, die auch als „rafts“ bezeichnet werden, enthalten im Fall von MDCK-Zellen neben Glycosphingolipiden Cholesterol und die zu sortierenden Membranproteine und integrale Membranproteine der exocytischen Vesikel [50]. Eines dieser integralen Membranproteine ist VIP36; es zeigt in seiner Primärstruktur eine Homologie zu Pflanzenlektinen aus Leguminosen [50]. Es wird vermutet, das

das Protein an die Zuckerreste von Glykosphingolipiden oder GPI-Ankern bindet, und so die Verbindung zwischen dem zu transportierenden Protein und der Vesikelhülle herstellt [50].

1.3.2.2 Weitere Sortierungssignale

Bei den bisher identifizierten Sortiersignalen handelt es sich oft um diskrete Peptidomänen mit 4 bis 25 Aminosäuren oder konformationsabhängige Epitope. Proteine können auch mehrere Sortiersignale enthalten, so daß jedes schwach bindende Epitop zu einer Gesamtwirkung beiträgt, die zum korrekten Transport führt [45].

Als weitere Sortierungssignale des Vesikeltransportes vom Golgi zu Endosomen oder Lysosomen kommen folgende Sequenzen in Frage:

1. ein luminales Asn-gebundenes **Mannose-6-phosphat** (s. Kap. 1.2.1)
2. ein **luminales Propeptid** am aminoterminalen Ende des transportierten Proteins, das durch die Endoproteinase Furin abgespalten wird [59-62]

1.4 Effektoren des Vesikeltransportes

Effektoren des Vesikeltransportes können bei der Bildung der Vesikel an der Donormembran, bei deren Transport oder bei der Fusion mit der Rezeptormembran eingreifen [15]. Als potentielle Effektoren sind besonders die GTP-bindenden Proteine und die Phospholipide sowie die löslichen Phosphoinositide zu nennen.

1.4.1 GTP-bindende Proteine (G-Proteine)

Da GTP-bindende Proteine in ihrer GTP-bindenden und GDP-bindenden Form zwei gegensätzliche Konformationen mit unterschiedlicher Enzymaktivität ausbilden, fungieren sie im Zellstoffwechsel quasi als molekulare Schalter. Diese Eigenschaft läßt die G-Proteine auch als Effektoren des Vesikeltransportes geeignet erscheinen. Zu den G-Proteinen, die einen Effekt auf die Vesikeltransportprozesse haben können, zählen:

- a. heterotrimere G-Proteine [63].
- b. verschiedene kleine GTPasen der ras Superfamilie inklusive ARF/Sar, Rab (Ypt) und Rho (mit Rho, Rac und CDC42) sowie
- c. Dynamine.

1.4.1.1 Heterotrimere G-Proteine

Heterotrimere G-Proteine sind vor allem für ihre Lokalisation an der Plasmamembran bekannt, wo sie für die Signalübertragung zwischen den „heptahelikalen“ Membranrezeptoren und ihren Effektoren (Ionenkanäle, Phospholipase C β 1 und Adenylcyclase) verantwortlich sind. Sie wurden

aber auch auf intrazellulären Membranen wie der Golgimembran [64] nachgewiesen, wo sie den exocytischen und endozytischen Vesikeltransport regulieren. Beweise für die Beteiligung der heterotrimeren G-Proteine am Vesikeltransport sind überwiegend indirekt und basieren auf den Effekten, die Substanzen wie AlF_4^- , $GTP\gamma S$, Pertussis- und Cholera-Toxin oder Mastoparan verursachen. Der erste funktionelle Hinweis, daß die $G\alpha$ -Untereinheiten der heterotrimeren G-Proteine einen Einfluß auf den Vesikeltransport haben, konnte durch die Hemmung des intra-Golgitransportes durch AlF_4^- , das heterotrimere aber nicht kleine GTPasen aktiviert, erbracht werden [65]. Desweiteren wird für $G\alpha$ auch eine Beteiligung am Budding von reguliert und konstitutiv sekretierten Vesikeln des TGN [15,66] angenommen. Der einzige direkte Nachweis der Beteiligung von G-Proteinen am Vesikeltransport konnte durch die Überexpression von $G\alpha_{i3}$ erreicht werden, daß den konstitutiven Transport von HSPG verminderte [64].

Für die Bildung der „lace-like“-Vesikel existieren Befunde, daß die Bindung von p200 an die Golgimembran durch heterotrimere G-Proteine reguliert wird [67].

Die Beobachtung, daß heterotrimere G-Proteine mit ARF interagieren, läßt ebenfalls auf deren Beteiligung an der Kontrolle der Vesikelbildung schließen [68,69].

1.4.1.2 GTPasen der Ras-Superfamilie

ARF wird für die Knospung sekretorischer Vesikel des konstitutiven Transports am TGN benötigt, die wahrscheinlich eine Vesikelhülle haben, die der des beschriebenen „lace-like“ Coat entsprechen könnte. So ist ARF an der Sortierung von Wachstumshormonen, HSPG und Sekretogranin in sekretorische Vesikel am TGN beteiligt [70].

ARF könnte diese Prozesse über die Aktivierung von Phosphatidylcholin-spezifischer Phospholipase D (PLD1) [70-72] oder durch Bindung von Adapterkomplexen an die konstitutiv-sekretorischen Vesikelknospen kontrollieren, wie es im Fall des AP-1 Adapterkomplexes nachgewiesen werden konnte [73].

Rho GTPasen wurden bisher nicht am GA nachgewiesen. Die Beobachtung, daß sowohl ARF1 als auch Rho die gleiche Isoform der Golgi-assoziierten Phospholipase D aktivieren [74], deutet aber auf eine regulatorische Funktion am GA hin [15].

Rab-Proteine (Ras-ähnliche GTP-bindende Proteine) sind GTPasen, die über C-terminal gebundene Isoprenoid- (Geranyl-Geranyl) und Fettsäureketten an Lipidmembranen binden. Nach einer Hypothese katalysieren Rab-Proteine die Wechselwirkung von v-SNAREs auf der Vesikeloberfläche und t-SNAREs auf der Ziel(target)membran, die der Exocytose vorausgeht [75]. Eine andere Hypothese macht die Rab-Proteine für die räumliche und zeitliche Koordinierung aller Prozesse verantwortlich, die bei der Bewegung und Fusion von Transportvesikeln in eukaryontischen Zellen ablaufen [76].

Von den bisher mehr als 30 identifizierten Rab GTPasen sind lediglich Rab6, Rab8 und Rab12 am GA nachgewiesen worden [77]. Rab6 ist im Bereich vom medialen Golgi bis zum TGN lokalisierbar, wogegen Rab8 zwischen TGN, post-Golgi-Vesikeln und Plasmamembran verteilt ist [15].

1.4.1.3 Dynamin

Dynamin ist an der Vesikelabschnürung der CCVs von der Plasmamembran beteiligt [78]. Da in Hefe das Dynamin-analoge Protein Vps1p identifiziert wurde, das für den Transport vom Golgi zum prävasculären Kompartiment essentiell ist [79,80], sollte Dynamin auch an der Bildung von CCVs am TGN beteiligt sein. Tatsächlich konnte 1998 mit Hilfe von Dynamin 2-Antikörpern die Bildung von CCVs wie auch die von konstitutiv-sekretorischen Vesikeln am GA *in vitro* inhibiert werden [81].

1.4.2 Phospholipide und lösliche Phosphoinositide

Phosphoinositide werden durch Lipidkinasen aus dem Membranlipid Phosphatidylinositol (PtIns) gebildet. Sie können abhängig vom Phosphorylierungsgrad des Inositolringes die Rekrutierung oder Aktivierung von Proteinen steuern, die für die verschiedenen Stationen des Vesikeltransportes essentiell sind [77,82].

In letzter Zeit wird die Bedeutung der Phosphoinositide für den Vesikeltransport immer deutlicher [82]. Ein erster Nachweis der Beteiligung von Phosphoinositiden am Vesikeltransport stammt aus Untersuchungen an Hefe, in denen gezeigt werden konnte, daß das für den post-Golgi Vesikeltransport essentielle Sec14 Gen [77] ein Phosphatidylinositol-Transfer-Protein generiert [83]. Dies konnte in einem *in-vitro*-Vesikelbiogenese-assay unter Verwendung von PC12-Zellen [84] bestätigt werden. In der gleichen Zelllinie gelang auch der Nachweis, daß sich der stimulierende Effekt von P1TP und PLD auf die konstitutive Exocytose durch das Phosphoinositid-bindende Antibiotikum Genitacin blockieren läßt [85].

Die Wirkung von Phosphoinositiden auf den Vesikeltransport könnte beim „budding“ ansetzen. Dafür spricht, daß Phospholipase D als „downstream“-Effektor von ARF1, durch PIP2 reguliert wird [86]. Das Produkt der PLD, Phosphatidsäure wird für den Vesikeltransport vom ER zum GA benötigt [87] und stimuliert die Bildung sekretorischer Vesikel am TGN von endocrinen Zellen [72].

Auch Dynamin (s. Kap. 1.4.1.3) bindet PIP2 mit Hilfe seiner PH-Domäne.

Bereits die wenigen Beispiele machen deutlich, daß die Synthese spezieller Lipide großen Einfluß auf den Vesikeltransport hat.

1.5 Die Phosphorylierung von Proteinen als ubiquitärer Regulationsmechanismus

Proteine sind für eine Vielzahl der dynamischen Lebensfunktionen wie Bewegung, Differenzierung, Entwicklung und Stoffwechselkontrolle verantwortlich. Diese Prozesse werden auf molekularer Ebene durch die reversible Knüpfung und Auflösung von kovalenten chemischen Bindungen gesteuert. Die dafür verantwortlichen Proteine (Enzyme) modifizieren dazu neben niedermolekularen Substanzen auch hochmolekulare Biomoleküle wie Polysaccharide, Strukturproteine und andere Enzyme durch Glykosylierung, Phosphorylierung, Acylierung, Alkylierung, Halogenierung, Hydroxylierung oder Einführung einer Lipidgruppe.

1.5.1 Proteinkinasen und Proteinphosphatasen

Die Aktivität vieler Enzyme, Membrankanäle und anderer Zielproteine wird durch Phosphorylierung an Serin- /Threonin- oder an Tyrosin-Resten reguliert. Die Phosphorylierung von Serin oder Threonin durch eine Vielzahl von Proteinkinasen stellt die häufigste reversible Modifikation von Proteinen dar. Unter physiologischen Bedingungen wird sowohl die Phosphorylierung durch Kinasen als auch die Dephosphorylierung durch Phosphatasen reguliert. Bei der Abwesenheit von Phosphatasen sind Phosphoproteine stabil.

Die Phosphorylierung ist aus strukturellen, thermodynamischen und kinetischen Gründen besonders geeignet, um die Aktivität von Enzymen zu kontrollieren: eine Phosphorylgruppe erzeugt zwei zusätzliche negative Ladungen in einem modifizierten Protein. Die tetraedrische Geometrie dieser Gruppe bildet bis zu drei stark gerichtete Wasserstoffbrücken aus. Die Änderung der freien Energie ist bei der Phosphorylierung sehr groß, wobei die Kinetik der Phosphorylierung und Desphosphorylierung an den Zeitbedarf physiologischer Prozesse angepaßt werden kann.

Darüberhinaus setzt ein durch Phosphorylierung aktiviertes Enzym in kürzester Frist zahlreiche Substratmoleküle um und verstärkt auf diese Weise z. B. die zelluläre Signaltransduktion.

Während die Serin/ Threoninkinasen das endständige γ -Phosphat des ATP auf Serin- und Threoninreste übertragen und dabei besonders stabile Phosphorsäure-alkylester bilden, wird durch Tyrosinkinasen die phenolische Hydroxylgruppe von Tyrosinen in einen chemisch weniger stabilen Phosphorsäure-arylester umgewandelt.

Es gibt eine Vielzahl von Proteinkinasen, daher sollen als Beispiele nur einige der ubiquitären Kinasen genannt werden, wie die cAMP-abhängigen Proteinkinasen (PKAs) [88], die cGMP-abhängigen Proteinkinasen (PKG), die Caseinkinasen (CKs), die für die regulatorische Kette des Myosinkomplexes spezifische "myosin light chain kinase" (MLCKs), die Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs), die durch Diacylglycerol (DAG) und z.T. durch Calcium aktivierbaren Proteinkinase C (PKC) Isoformen [89-91], Proteinkinase D (PKD), die MAPK-aktivierten Proteinkinasen (MAPKAPKs), die MAP-Kinase-Kinasen (MEKs), die

Ca²⁺/Calmodulin-abhängigen Proteinkinasen (CaMKs) [92] und Rezeptorgebundene Serin/Threonin Kinasedomänen [93]. Zu den Tyrosinkinasen gehören beispielsweise die Onkogene src, abl und erbB, Rezeptor-Tyrosin-Kinasen wie der EGF-Rezeptor und der Insulin-Rezeptor, die Proteinkinase B (PKB, Akt) oder die Protein-Tyrosinkinase Pyk2. Die Proteinkinasen können selbst als Akzeptoren von Phosphatgruppen an Threonin- oder Tyrosinresten fungieren. Sie werden mitunter erst durch die Phosphorylierung an sogenannten Aktivierungsloops aktiviert [94].

Proteinphosphatasen heben die Wirkung der Kinasen auf, indem sie die Phosphatesterbindung hydrolysieren, wodurch das ursprüngliche Protein mit der freien OH-Gruppe wieder hergestellt und Orthophosphat gebildet wird. Wie bei den Proteinkinasen ist auch in dieser Enzymgruppe die Unterscheidung in Serin/Threonin- und Tyrosin-Phosphatasen möglich.

Zu den Serin/Threonin Phosphatasen gehört z.B. Proteinphosphatase 2A (PP2A), die in den meisten Säugetiergeweben exprimiert wird. Sie ist an der Regulation von grundlegenden zellulären Prozessen, wie Zellwachstum und –transformation, beteiligt [95]. Auch die Serin/Threonin Phosphatasen PP1 und PP2c, sowie die Ca²⁺/CaM-abhängige Phosphatase PP2B (Calcineurin (CN))[92], gehören zu dieser Klasse [96]. Zu den Tyrosin-Phosphatasen gehören Vertreter wie die Protein-Tyrosin- phosphatase SH-PTP2 [97].

Die Spezifität von Proteinkinasen und –phosphatasen ist von bestimmten Peptidsequenzen abhängig, die das Enzym auf seinem Substrat erkennt. Multifunktionelle Proteinkinasen erkennen z.B. mehrere verwandte Aminosäuresequenzen und modifizieren viele verschiedene Zielproteine. Gerichtete Proteinkinasen erkennen dagegen nur eine bestimmte Sequenz und phosphorylieren nur ein einziges oder einige eng verwandte Proteine. Durch Vergleich der Substratpeptide konnten "consensus" – Sequenzen ermittelt werden, die für die einzelnen Enzyme charakteristisch sind. Von besonderer Bedeutung für die Regulation der Vesikelbildung sollten Membran-gebundene Kinasen, wie die PKC sein, die durch Lipide spezifisch aktiviert werden.

1.5.2 Proteinkinase C (PKC)

PKC wurde zuerst 1977 als proteolytisch aktivierbare, jedoch unspezifische Histon-Kinase [98] in vielen Geweben [99] nachgewiesen. Später konnte gezeigt werden, daß es sich um ein Ca²⁺-aktivierbares, Phospholipid-abhängiges Enzym handelt [99-101]. Weitere Vertreter der Protein-Kinase-C-Familie (PKC) wurden von Yasutomi Nishizuka in Fraktionen der Hydroxyapatit-Chromatographie von Rinderhirnextrakten [98] durch Stimulierung mit Ca²⁺ [100], Phospholipid (hauptsächlich Phosphatidylserin (PS)) [102] und DAG nachgewiesen [101,103]. Bis zum heutigen Tag wurden 25 Isoformen nicht nur in Säugetieren sondern beispielsweise auch in *C. elegans* und sogar in *Drosophila* mit theoretischen Molekulargewichten von etwa 67 bis 84 kD [101]

nachgewiesen. PKC-ähnliche Enzyme konnten darüberhinaus auch in Hefen identifiziert werden (vgl. Tab. 2).

Allen Isoenzymen (vgl. Tab. 1) ist gemeinsam, daß sie Serin- oder Threoninreste in den Konsensussequenzen $K/R_{1-3}X_{0-2}S/TX_{0-2}R/K_{1-3}$ oder $S/TX_{0-2}R/K_{1-3}$ oder $R/K_{1-3}X_{0-2}S/T$ [88] phosphorylieren.

Tab. 1: PKC-Isoformen in Säugetier-Geweben nach Nishizuka [104]

	Subspezies	AA	In vitro Aktivatoren, # ⁴	In vivo Aktivatoren	Expressionsmuster	MW (kD), # ²
cPKC	α	672	Ca ²⁺ , DAG, PS, FFAs ^{#3} , LysoPC, + Cholesterolsulfat [105], Bryostatin-1 [106]	Bryostatin-1 [107] 12(S)-HETE [108]	ubiquitär	76,8
	βI	671	dito	HNE [109]	z.B. Leber, Lunge, Herz, Niere und Milz # ¹	76,8
	βII	671	dito	HNE [109], PG [110].	ubiquitär	76,9
	γ	697	dito + Bryostatin-1 [106]		nur Gehirn	78,4
nPKC	δ	673	DAG, PS+ HNE [109], Bryostatin-1 [106]		ubiquitär	77,5
	ε	737	DAG, PS, FFAs, PIP3 + 14-3-3 zeta [111], CS [105], Bryostatin-1 [106]	Insulin [112], CS [105]	Gehirn und andere Gewebe	83,5
	η(L)	683	DAG, PS, FFAs, Cholesterolsulfat		Haut, Lunge, Herz,	77,9 # ⁵
	θ	707	?		Muskeln, T-Zellen ect.	81,5 # ⁵
	μ	912	?		NRK Zellen	
aPKC	ζ	592	PS, FFAs, PIP3 + Ceramid # ⁶	Ceramid # ⁶	ubiquitär	67,7
	λ	587	?		ubiquitär	67,2 # ⁵

#¹: nach [113]

#²: theoretische Molekulargewichte ermittelt aus cDNA ohne Berücksichtigung einer Prozessierung [113]

#³: cis ungesättigte Fettsäuren

#⁴: Die Aktivatoren wurden in in vitro Experimenten mit Kälberthymushiston H1 und "bovine myelin basic protein" als Phosphataktzeptor ermittelt [113].

#⁵: [88]

#⁶: [114]

Ein Vergleich der bisher nachgewiesenen 11 humanen Isoformen zeigt das Vorliegen einer relativ stark konservierten C-terminalen katalytischen Domäne und einer variablen N-terminalen regulatorischen Domäne (vgl. Abb. 3).

Die katalytische Domäne beinhaltet die ATP-Bindungsregion (C3-Domäne) und die Substratbindungsregion (C4-Domäne).

Die variable regulatorische Untereinheit enthält stets eine Pseudosubstratregion, mit autoinhibitorischer Funktion [115] und eine Cystein-reiche Region C1 (C1), die ein oder zwei Zinkfinger-Motive enthält.

Die Pseudosubstratsequenz innerhalb der Pseudosubstratregion, -RFARKGALRQKNVHEVKN-, beinhaltet viele positiv geladene Aminosäureseitenketten und variiert nur sehr geringfügig zwischen den einzelnen PKC-Isoformen. Durch Wechselwirkung der Pseudosubstratsequenz mit der Substratbindungsregion C4, werden die PKC-Isoformen solange gehemmt, bis das Enzym durch Cofaktoren aktiviert wird und eine Konformationsänderungen zur Aufhebung dieser Wechselwirkung führt.

In Abhängigkeit von ihrer Primärstruktur bindet die Cystein-reiche Region C1 DAG, Phorbolster sowie Phospholipide und ist für die Phospholipid-abhängige Phorbolster Bindung unbedingt erforderlich [116].

Die Variabilität der regulatorischen Domänen von PKC-Isoformen führt zu unterschiedlicher Substratspezifität und Aktivierbarkeit der Enzyme [117] und ist letztendlich für deren Einteilung in die konventionellen oder klassischen Isoformen (α , β I, β II und γ), die neuen Isoformen (δ , ϵ , eta und θ) und die atypischen Isoformen (ζ , μ und ι) verantwortlich.

Bei den konventionellen Isoformen (cPKCs) enthält die regulatorische Domäne noch zusätzlich die Ca^{2+} -bindende Region C2 und wird dadurch durch Ca^{2+} aktivierbar.

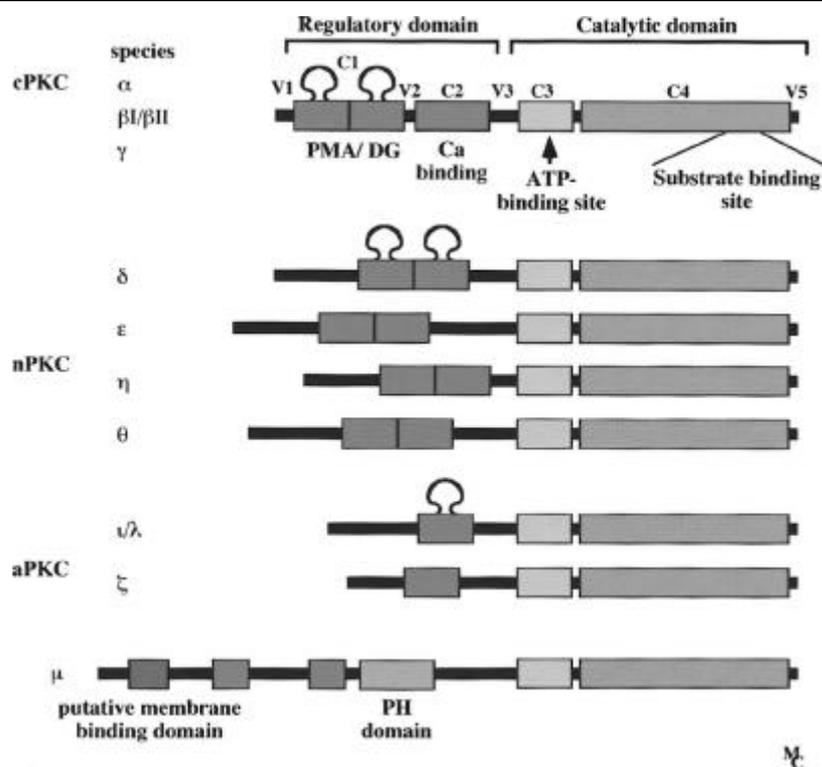


Abb. 3: Domänenstruktur von PKC-Isoformen nach [118]

Die Abbildung zeigt ein Schema der Domänenorganisation der PKC-Superfamilie. Regionen, die von PKC-Isoform zu PKC-Isoform ähnlich sind, werden durch die Bezeichnung C1-C4 und Kästen repräsentiert. Bereiche, die keinerlei Homologie aufweisen, werden als variable Bereiche V1-V5 bezeichnet und durch dicke schwarze Balken gekennzeichnet.

Tab. 2: Zusammenstellung von PKC-Isoformen, deren cDNA-Sequenzen bekannt sind und deren Expression nachgewiesen wurde. Stand der Datenbank Swissprot vom 18.10.1999 [119].

Bezeichnung	Swissprot	Organismus
CALCIUM-DEPENDENT PROTEIN KINASE C (APL I).	KPC1	Aplysia californica
CALCIUM-INDEPENDENT PROTEIN KINASE C (APL II)	KPC2	Aplysia californica
PROTEIN KINASE C (DPKC98F)	KPC3	Drosophila melanogaster
PROTEIN KINASE C	KPC1	Lytechinus pictus
PROTEIN KINASE C, ALPHA TYPE (PKC-ALPHA)	KPCA	Homo sapiens, Bos taurus, Oryctolagus cuniculus, Rattus norvegicus
PROTEIN KINASE C, BETA-I TYPE (PKC-BETA-1).	KPC1	Homo sapiens, Oryctolagus cuniculus, Rattus norvegicus
PROTEIN KINASE C, BETA-II TYPE (PKC-BETA-2)	KPC2	Bos taurus, Homo sapiens, Mus musculus, Rattus norvegicus, Oryctolagus cuniculus
PROTEIN KINASE C, BRAIN ISOZYME (DPKC53E(BR)).	KPC1	Drosophila melanogaster
PROTEIN KINASE C, DELTA TYPE (NPKC-DELTA)	KPCD	Homo sapiens, Mus musculus, Rattus norvegicus
PROTEIN KINASE C, EPSILON TYPE (NPKC-EPSILON)	KPCE	Homo sapiens, Mus musculus, Oryctolagus cuniculus, Rattus norvegicus
PROTEIN KINASE C, ETA TYPE (NPKC-ETA)	KPCL	Homo sapiens, Mus musculus, Rattus norvegicus
PROTEIN KINASE C, EYE ISOZYME (DPKC53E(EY), PROTEIN INAC, PHOTORECEPTOR-SPECIFIC PKC, EYE-PKC)	KPC2	Drosophila melanogaster
PROTEIN KINASE C, GAMMA TYPE (PKC-GAMMA)	KPCG	Homo sapiens, Mus musculus, Rattus norvegicus, Oryctolagus cuniculus, Bos taurus
PROTEIN KINASE C, IOTA TYPE (NPKC-IOTA)	KPCI	Homo sapiens
PROTEIN KINASE C, IOTA TYPE (NPKC-IOTA, PROTEIN KINASE C LAMBDA)	KPCI	Mus musculus
PROTEIN KINASE C, MU TYPE (NPKC-MU)	KPCM	Homo sapiens
PROTEIN KINASE C, THETA TYPE (NPKC-THETA)	KPCT	Homo sapiens, Mus musculus
PROTEIN KINASE C, ZETA TYPE (NPKC-ZETA)	KPCZ	Homo sapiens, Mus musculus, Oryctolagus cuniculus, Rattus norvegicus
PROTEIN KINASE C-LIKE	KPC1	Cochliobolus heterostrophus, Aspergillus niger, Neurospora crassa, Trichoderma reesei (Hypocrea jecorina)
PROTEIN KINASE C-LIKE 1 (PKC 1).	KPC1	Candida albicans, Saccharomyces cerevisiae
PROTEIN KINASE C-LIKE 1 (PKC).	KPC1	Caenorhabditis elegans
PROTEIN KINASE C-LIKE 1 (PROTEIN-KINASE C-RELATED KINASE 1, PROTEIN KINASE C-LIKE PKN, SERINE-THREONINE PROTEINE KINASE N)	PKL1	Mus musculus, Rattus norvegicus, Homo sapiens
PROTEIN KINASE C-LIKE 2 (PKC1B)	KPC2	Caenorhabditis elegans
PROTEIN KINASE C-LIKE 2 (PROTEIN-KINASE C-RELATED KINASE 2)	PKL2	Homo sapiens
PROTEIN KINASE C-LIKE 2 (PROTEIN-KINASE C-RELATED KINASE 2, PROTEASE-ACTIVATED KINASE 2, PAK-2, FRAGMENT)	PKL2	Rattus norvegicus

Bei den neuen PKC-Isoformen (nPKCs) fehlt die C2-Domäne, so daß kein Calcium gebunden wird [118]. Im Fall der atypischen PKC-Isoformen (aPKCs) ist zusätzlich die C1-Domäne auf ein Zinkfinger-Motiv verkürzt, so daß auch keine Phorbolsterbindung mehr möglich ist [120]. Aktivierende Cofaktoren der cPKCs sind Ca^{2+} , DAG, PS, sowie der Tumorpromoter Phorbolster, aber auch HNE, 12(S)-HETE, Cholesterolsulfat [105] und Bryostatin-1 [106]. Die nPKCs lassen

sich durch die Cofaktoren DAG, HNE, Insulin, Cholesterolsulfat und Phorbolster aktivieren. Bei den aPKCs erfolgt die Aktivierung durch Lipide wie PIP2, PIP3 und Ceramid.

1.5.2.1 Konventionelle Isoformen der PKC (cPKCs)

Die cPKCs (α , β I, β II und γ) sind ubiquitär und wurden beim Screening einer Vielzahl von cDNA-Banken [101] nachgewiesen.

Die Aktivierung der cPKCs ist mit der Translokation der Enzyme aus der löslichen Zellfraktion in die unlösliche, partikuläre Zellfraktion verbunden [121]. Da die partikuläre Fraktion vor allem Membranen enthält, scheint die Membranbindung für die Aktivierung essentiell zu sein.

Gegenwärtig wird folgender Aktivierungsmechanismus diskutiert:

cPKCs sind in ihrer cytosolischen Form inaktiv. Durch Ca^{2+} -Bindung transloziert das Enzym zur Plasmamembran und wird dort durch Bindung an den „second messenger“ DAG und an negativ geladene Phospholipide aktiviert [104,122]. Dabei soll sich eine quarternäre Struktur mit DAG, Phospholipid und Ca^{2+} ausbilden, die den aktiven Enzymkomplex der PKC darstellt [99,123]. Die subzelluläre Translokation der PKC nach Bindung ihrer Aktivatoren ist ein schnell verlaufender Prozeß [90,124], der mit einer Dissoziation der Pseudosubstrat-Region von der Substrat-Bindungsdomäne verbunden ist. Die nun frei zugängliche NH_2 -terminale Region des Enzyms tritt mit weiteren sauren Phospholipiden in der Plasmamembran in Wechselwirkung und verstärkt dadurch die Bindung des Enzyms an die Membran [124]. Einen schematischen Überblick zeigt Abb. 4.

Am Beispiel der PKC β II wurde von Newton et al. die Reifung und Translokation des Enzyms *in vitro* und *in vivo* untersucht [125]:

PKC β II wird demnach als inaktiver Precursor synthetisiert und ist in diesem Zustand an Membranen gebunden. Eine vermutete PKC-Kinase erkennt das unreife Protein und phosphoryliert es spezifisch an der Threoninseitenkette T500 in der sogenannten Aktivierungsschleife innerhalb der C4-Domäne des Moleküls [127]. Diese Modifizierung führt zur Autophosphorylierung des Enzyms an den NH_2 -terminalen Aminosäuren S16 und T17, den Threoninen T314 und T324 im Aktivierungsloop, des T634 [128] und der C-terminalen Threonine T641 und T660 [129]. Nach erfolgter Autophosphorylierung wird PKC β II durch Kofaktoren aktiviert und bindet an Membranen.

Das Modell wird durch Punktmutationsstudien an der Autophosphorylierungsstelle des C-Terminus von PKC β I [130] und der Phosphorylierungsstelle T497 im Aktivierungsloop von PKC α gestützt [131].

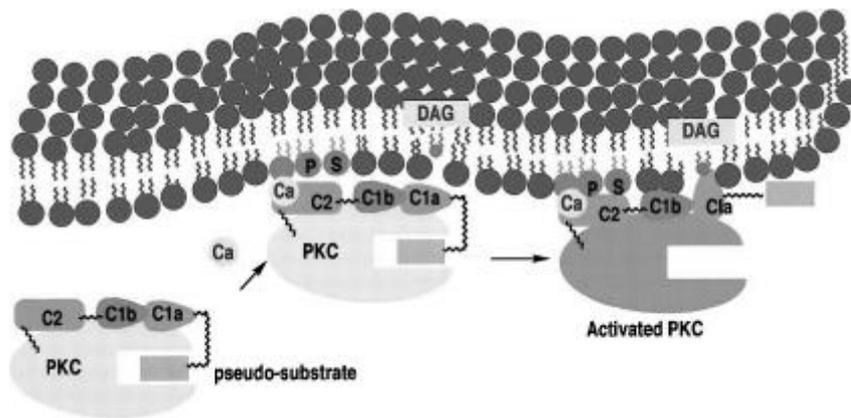


Abb. 4: Mehrstufige Aktivierung der PKC durch schrittweise Bindung von Calcium, Phospholipid und DAG nach [126]

(A) Im inaktiven Zustand befindet sich die PKC im Cytosol. Die katalytische Domäne wird durch die Pseudo-Substrat-Sequenz abgeschirmt. (B) Durch Ca²⁺-Bindung transloziert das Enzym an die Membran. (C) Nach Bindung von Phospholipiden an die C2-Domäne und schließlich von DAG an die C1a-Domäne ändert sich die Konformation des Enzyms, und die Pseudo-Substratsequenz gibt die katalytische Domäne frei, das Enzym ist aktiv.

Für die Dauer der Aktivierung des Enzyms durch seine natürlichen Kofaktoren ist der Phosphorylierungszustand spezifischer Threoninseitenketten mitverantwortlich. Im Fall von PKC α konnte z.B. gezeigt werden, daß die Phosphorylierung am T657 [131] das aktive membrangebundene Enzym vor Dephosphorylierung durch Phosphatasen und damit vor dessen Inaktivierung schützt [132,133].

Phorbolster aktivieren cPKCs auf die gleiche Weise wie DAG. Sie können im Gegensatz zu DAG von der Zelle jedoch nicht abgebaut werden, so daß eine anhaltende Aktivierung der PKC an der Membran resultiert. Die permanente Aktivierung ist letztendlich auch für die Kanzerogenität dieser Verbindungsklasse verantwortlich. Andererseits sensibilisiert die Assoziation der PKC an Membranen das Enzym für einen proteolytischen Abbau [134,135]. Dazu wird die PKC dephosphoryliert [136] und ubiquitiniert [137]. Für die cPKCs konnte die Proteasespaltstelle an der Grenze der „hinge region“ zur katalytischen Domäne ermittelt werden [134]. Die als Folge von Phorbolster-Stimulierung und Abbau beobachtete Verminderung von PKC in lebenden Zellen wird auch als „downregulation“ bezeichnet [136].

Die Membrananbindung der aktivierten cPKC durch saure Phospholipide wird nach Meinung einiger Autoren durch spezifische PKC-Ankerproteine in verschiedenen subzellulären Membranen unterstützt [11,138-142]. Diese Proteine werden als RACKs (Rezeptor für aktivierte Protein Kinase C bezeichnet [141,143]. Zusätzlich haben die gleichen Autoren die Existenz von Ankerproteinen für inaktivierte PKC-Isoformen (RICK) vorgeschlagen. Der funktionelle Zusammenhang ist in der Legende von Abb. 5 dargestellt.

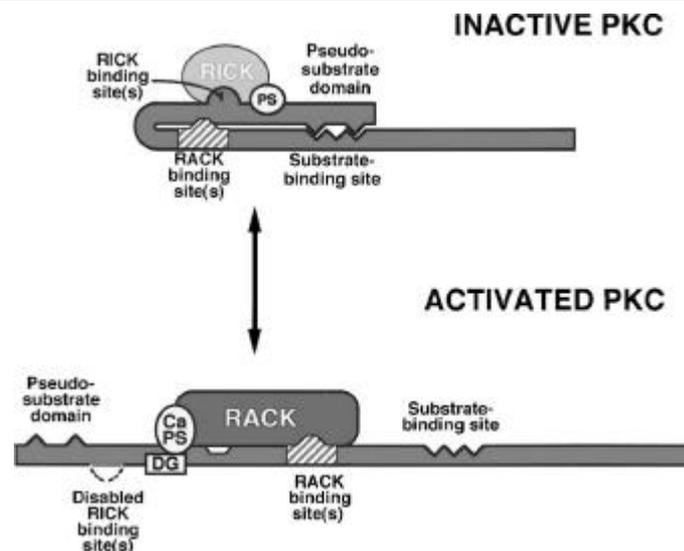


Abb. 5: Modell der Aktivierung von PKC-Isoformen durch Translokation an RACKs nach [118]

Im inaktiven Zustand ist die Substratbindungsstelle (Substrate-binding site) der katalytischen Domäne von PKC durch die Pseudosubstratsequenz (Pseudosubstrate domain) blockiert (Die katalytische Domäne ist für Substrate unzugänglich) und die Bindungsstelle für den RICK zugänglich. PKC-Aktivatoren führen zur Auffaltung der katalytischen Domäne und zur Freilegung der RACK-Bindungsstelle (RACK binding site). Die Bindung der aktivierten PKC an den RACK inaktiviert die RICK-Bindungsstelle (RICK binding site).

1.5.2.2 Neue Isoformen der PKC (nPKCs)

Das Fehlen der C2 Domäne in der regulatorischen Region von PKC δ , PKC ϵ , PKC η , PKC θ und PKC μ unterscheidet die nPKCs am gravierendsten von den cPKCs und erklärt die fehlende Stimulierbarkeit durch Calcium [144].

Die bereits für die konventionelle PKC β II beschriebene Reifung ließ sich auch für PKC δ mit Hilfe von Mutationsexperimenten nachweisen. Ohne vorherige Autophosphorylierung und anschließender konsequenter Dephosphorylierung bleibt der PKC δ -Precursor an die Membran gebunden [144]. Erst die phosphorylierte aber noch inaktive PKC δ befindet sich im Cytosol. Nach exogener Stimulation durch TPA oder Stimulierung durch Mitogene, was zu einer verstärkten Synthese von DAG führt, transloziert PKC δ an Membranen, wo sie aktiviert wird.

Die Bedeutung der Tyrosinphosphorylierung für die Reifung und Aktivierung der PKC δ wird durch in vitro-Versuche bestätigt, die zeigen, daß die Kinaseaktivität von PKC δ nach Tyrosinphosphorylierung durch verschiedene Tyrosin-Kinasen erhöht wird [145]. Für die Bedeutung der Modifikation spricht auch, daß die Tyrosin-phosphorylierte PKC δ bisher nur in Membranfraktionen nachgewiesen werden konnte [144].

Die PMA-Stimulierung führt auch bei den nPKCs zur andauernden Aktivierung und zu einer damit verbundenen Translokation an Membranen. Vermutlich unterbricht PMA die intramolekulare

Wechselwirkung zwischen der „hinge region“ und der katalytischen Domäne der nPKCs und legt so das Membran-Lokalisierungssignal in der „hinge region“ auf der Enzymoberfläche frei [146]. Die Bedeutung der Dephosphorylierung für die „downregulation“ von PKC δ und PKC ϵ in PC12 Zellen konnte durch die gleichzeitige Anwendung von Phorbol ester und Okadarsäure nachgewiesen werden, die eine „downregulation“ verhinderten [136].

1.5.2.3 Atypische Isoformen der PKC

Die aPKCs (ζ , μ und ι) sind weder durch DAG noch durch Phorbol ester aktivierbar [147]. Eine Ca^{2+} -Abhängigkeit liegt für die aPKCs ebenfalls nicht vor [148]. Diese PKC-Isoformen sind durch Phospholipide stimulierbar [89,149,150]. Neuere Untersuchungen beschreiben auch Bryostatine 1, ein makrozyklisches Lacton, das aus *Bugula neritina* isoliert wurde [151], als Aktivator dieser Isoformen [152].

Neben Phosphatidylserin [104] wird PKC ζ besonders stark in vitro durch Phosphatidylinositol 3,4-bisphosphat und Phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphat (PIP3) stimuliert [153,154] beides Produkte der PI 3-Kinase, die in der mitotischen Signalkaskade eine wichtige Rolle spielt [155]. Desweiteren wird die gleiche Isoform in vitro durch Ceramid, ein Produkt der Hydrolyse von Sphingomyelin, aktiviert [156]. Ceramid bindet direkt an das Isoenzym und aktiviert PKC ζ auch in vivo [157,158].

1.5.3 Einfluß der PKC-Isoformen auf den intrazellulären Vesikeltransport und auf die Sekretion von Proteinen

Für die verschiedenen PKC-Isoenzyme ist bekannt, daß sie nach ihrer Aktivierung an zelluläre Membranen [99] oder an das Cytoskelett binden [159,160], wo sie ihre regulierende Funktion ausüben.

Da die Aktivatoren von PKC sowohl die Exocytose permeabilisierter RBL-2H3-Zellen [161-163] stimuliert, wie auch den konstitutiven Vesikeltransport in der Zelle beschleunigt [164], kann vermutet werden, daß PKC an der Vesikelbiogenese am TGN beteiligt ist und PKC-Isoformen an den GA binden. So konnte in der Tat PKC α an Golgimembranen von HepG2-Zellen nachgewiesen werden [165]. PKC β II, eine weitere cPKC, wurde am GA neuronaler Zellen nachgewiesen [166-168]. Als Vertreter der nPKCs wurde PKC ϵ an der Golgimembran in NIH3T3-Zellen [169] aufgefunden. Auch die aPKC PKC μ [170] und PKC ζ [165] wurden an Golgimembranen von HepG2-Zellen lokalisiert.

Ein weiteres Argument für die Beeinflussung des konstitutiven und regulierten Vesikeltransportes durch PKC-Isoformen stellt die Stimulierung durch PKC-spezifische Aktivatoren bzw. die Hemmung durch PKC-Inhibitoren dar.

Die meisten Beobachtungen lassen eine Beteiligung der cPKCs und der nPKCs an der Vesikelbiogenese vermuten. So ist DAG, ein sekundärer Messenger und wichtiger Aktivator der cPKCs bei der Vesikelbildung am TGN von Hefe, von essentieller Bedeutung [171]. Dies ließ sich dadurch nachweisen, das defektes Phosphatidylinositol-Transferprotein (sec14p) in Hefe zu einer scheinbar DAG-unabhängigen Invertase-Sekretion führt, was durch Überexpression von DAG-Kinase verhindert bzw. durch Zusatz von di-C8 DAG zum Kulturmedium verstärkt werden konnte [171].

Mit Phorbolestern, die die cPKCs und die nPKCs spezifisch aktivieren [172-174], ist wiederholt eine Stimulierung von Transport- und Sekretionsprozessen in verschiedenen Zelllinien beobachtet worden [175-183].

Für „Swiss 3T3“-Fibroblasten konnte in jüngster Zeit die Stimulation der Vesikelbildung am Golgiapparat durch Phorbolester nachgewiesen werden [184]. Die regulierende Funktion von PKC bei der Vesikelbiogenese wird auch durch Befunde unterstrichen, die zeigen, daß eine dauerhafte Hemmung von PKC, verbunden mit deren proteolytischen Abbau („downregulation“) den vesikulären Transport hemmt [162,163]. Eine Vesikelbildung in MDCK-Zellen läßt sich auch durch Mikroinjektion mit PKC-Antikörpern hemmen [185].

Auch der konstitutive Vesikeltransport wird durch aktivierte PKC beschleunigt:

So wird die Sekretion von Glykosaminoglykanen (GAGs) in RBL-Zellen durch PMA stimuliert [164], und in HepG2-Zellen wird der konstitutive Transport von HSPG durch Phorbolester angeregt [165]. In MDCK-Zellen ließ sich mit Phorbolestern ebenfalls eine Steigerung der konstitutiven Vesikelbildung nachweisen [186].

Eine erhöhte Arachidonsäure-Ausschüttung ist nach Phorbolester-Stimulation in MDCK-D1 Zellen zu beobachten [187].

In Gewebeproben wie den Acini (Läppchen) der Bauchspeicheldrüse konnte durch TPA die verstärkte Sekretion von Amylase nachgewiesen werden [188].

Eine Überexpression von PKC ϵ in GH4C1-Hypophysenzellen stimuliert sowohl die basale als auch die stimulierte Sekretion von Prolactin [189].

In vitro wird der Transport von VSV G Protein vom TGN zur Zellmembran durch Calphostin C [190] oder Ro 31-8220 [164] gehemmt. In HepG2-Zellen bewirkt Calphostin C die Inhibition des konstitutiven Transportes von HSPG [165].

In vitro konnte PMA den konstitutiven Transport von VSV-Glycoprotein vom TGN zur Zellmembran stimulieren [164]. Der Zusatz gereinigter, in Baculoviren exprimierter PKC α zu einem in-vitro-Vesikelbiogenese-Assay mit angereicherten Golgimembranen verstärkt die Freisetzung von HSPG im ähnlichem Umfang wie die Zugabe von PMA [191].

Andererseits inhibiert die Überexpression der Zinkfinger-Domäne von PKC ϵ in NIH3T3-Zellen die Sulfatierung von Proteoglykanen im Golgi sowie deren Sekretion [192].

Von den aPKCs ist lediglich für die Expression von PKC μ in Zellen, die kein derartiges endogenes Enzym besitzen, eine Verstärkung der Sekretion von sulfatierten GAGs in diesen Zellen beobachtet worden [170].

Desweiteren sind auch zahlreiche Effekte von TPA auf die regulierte Exocytose beschrieben. So konnte durch Zugabe von TPA eine Verstärkung der Ca²⁺-abhängigen Exocytose von permeabilisierten RBL- und PC12-Zellen beobachtet werden [162,163,193]. Die Verstärkung der regulierten Exocytose in permeabilisierten RBL-Zellen ließ sich auch durch Substitution der durch die Permeabilisierung ausgewaschenen PKC-Isoformen PKC β oder PKC δ erreichen [162].

Eine Langzeitinkubation mit Phorbolestern, die zum metabolischen Abbau von cPKCs und nPKCs führt, inhibiert die regulierte Sekretion in RBL-Zellen [162,163].

Die beschriebenen Effekte machen deutlich, daß die Mechanismen der PKC-abhängigen Regulation des Vesikeltransportes und der Sekretion bisher nicht ausreichend bekannt sind.

Zunächst wurde eine „nicht-phosphorylierende“, katalytische Funktion der PKC bei der Aktivierung von Phospholipase D (PLD) nachgewiesen [194]. Als Folge könnte die Vesikelbildung am TGN durch die PLD-abhängige Synthese von Phosphatidsäure stimuliert werden [195], die für die Ablösung der Transportvesikel von der Donormembran verantwortlich sein soll [196].

PLD1 kann auch von PKC α in einer Kinase-unabhängigen Form aktiviert werden. In vitro aktivieren ARF und Rho die gleiche gereinigte PLD-Isoform PLD1. Da Phosphatidsäure, eines der PLD-Reaktionsprodukte, für sich selbst als intrazellulärer Modulator von Raf und bestimmten PKC-Isoformen [77] fungieren kann, oder auch zu DAG, Arachidonsäure und Lysophosphatidsäure metabolisiert wird [77], können ARF und Rho als Glieder einer Signaltransduktionskaskade gesehen werden, die bei PLD konvergiert. ARF, Rho und PKC aktivieren PLD1 synergistisch, was nahelegt, daß sie mit verschiedenen Bereichen der PLD1 interagieren [197].

PLD könnte daher als integrativer Regulator der ARF und Rho-verursachten Effekte gesehen werden. Es wurde auch vorgeschlagen, daß die Aktivierung von PLD1 durch ARF, Rho und PKC den Prozeß der Vesikelbildung mit der Aktivierung von Rezeptoren auf der Golgimembran verbindet [15]. Diese Rezeptoren könnten nach Wechselwirkung mit den Transportproteinen, durch Signaltransduktion vom Golgilumen in das Cytoplasma die Rekrutierung der Vesikelhülle veranlassen und so die Vesikelbildung an der Golgimembran auslösen. Ein indirekter Hinweis auf einen derartigen Mechanismus stammt aus der Beobachtung, daß die Bildung naszierender sekretorischer Vesikel am TGN von endokrinen Zellen durch Tyrosinkinase- und Phosphataseinhibitoren unterdrückt und durch ein stimulierendes ARF1-Peptid aufgehoben werden kann [198].

Daß es mindestens noch einen weiteren Aktivierungsweg für den Vesikeltransport geben muß, zeigen Befunde, die mit dem PKC-Inhibitor Ro 31-8220 erhoben wurden [165,199]. Dieser PKC-Inhibitor, der seine Wirkung an der katalytischen Domäne entfaltet, unterstreicht die Bedeutung der Phosphorylierung von PKC-Substraten für die Vesikelbildung.

1.5.4 Substrate der PKC

Da PKC eine relativ wenig spezifische Serin/Threonin-Kinasefamilie darstellt, sind bisher zahlreiche PKC-Substrate bei Phosphorylierungsexperimenten *in vitro* und *in vivo* identifiziert worden (s. Beispiele in Tab. 3).

Ein generelles Problem bei der Untersuchung von Kinasesubstraten mit sogenannten Zell-freien Systemen ist, daß sich viele Proteinkinasen unter diesen Bedingungen relativ unspezifisch verhalten und die ermittelten Substrate nur wenig über die biologische Bedeutung der Phosphorylierungsereignisse aussagen [200]. Die bisher aufgeklärten Regulationsmechanismen, die der PKC-Aktivierung vorausgehen (s. Kap. 1.5.2.1) - lassen vermuten, daß die Kinasen *in vivo* sehr restriktiv reguliert wird. Gerade die sehr restriktive Regulation wird wohl für ihre beobachtete Multifunktionalität im Zellstoffwechsel verantwortlich sein.

Von den bisher identifizierten *in vivo*-Substraten sollen einige für die Arbeit relevante Beispiele genannt werden:

Von den drei bisher identifizierten neuronal-spezifischen Proteinkinase C-Substraten die in Mäusen nachgewiesen wurden, ist MARCKS (Myristoylated Alanine rich C-Kinase Substrat) eines der wohl bekanntesten PKC-Substrate *in vivo* [232]. Es weist drei PKC-spezifische Phosphorylierungs-orte in der Calmodulin-Bindungssequenz auf [238], bindet an Aktin [249] und in Abhängigkeit von seinem Phosphorylierungszustand an Phospholipid-haltige Membranen [250].

Bei den Proteinen des Intermediärfilament-Systems wird Annexin II in Jurkat Zellen durch PKC phosphoryliert [215]. In Blutplättchen wird nach PKC Aktivierung mit Phorbolestern besonders die spezifische Phosphorylierung von Pleckstrin (ca. 45 kD) und der regulatorischen leichten Kette des Myosinkomplexes (MLRM 2A) beobachtet [209]. MLRM 2A ist von Interesse, da bereits Myosin II, eine andere Komponenten des Myosinkomplexes, am GA lokalisiert wurde [30] und an der konstitutiven Vesikelbildung beteiligt sein könnte [251].

Von den trimeren G-Proteinen stellt $G\alpha_{16}$ *in vivo* ein PKC-Substrat dar [227].

Unter den Proteinen, die an der Sekretionsmaschinerie beteiligt sind, ist z.B. für Synaptotagmin I, einem vermuteten Ca^{2+} -Sensor in Neuronen und neuroendokrinen Zellen, die Phosphorylierbarkeit durch PKC *in vivo* gezeigt worden [245]. Das Protein, daß auch an synaptischen Vesikeln nachgewiesen wurde, ist vermutlich an der durch Ca^{2+} ausgelösten Exocytose dieser Zellen beteiligt. Daneben ist Diacylglycerol-Kinase (DG), die die Konzentration von DAG durch

Umwandlung in Phosphatidylsäure steuert, in vivo als Substrat von PKCε identifiziert worden [248].

Tab. 3: In vitro und in vivo Substrate von PKC-Isoformen nach Nishizuka [201] und anderen Autoren^{#7}

Proteinklasse	Beispiele	In vitro	In vivo
Zelladhäsions-Proteine	Talin + Vinculin	[202]	[203,204]
Smooth muscle related proteins	MLC, MLCK, Caldesmon, Pleckstrin	[205] [205,206] [207] [208]	[209] - - [209]
Intermediär Filamente	Cytokeratin 8, 18; Vimentin	[210] [207]	[211] [212]
Cytoskelettproteine	Troponin T, Troponin I Vinculin Filamin Caldesmon Microtubule assoziiated proteins γ-Aduccin Annexin II	[201,213] [201] [201] [201] [201] [214] [215]	[216] [204] [217] - [218] [219] [215]
Kern assoziierte Proteine	Histone III HnRNPA1 Lamin B1	[220]; [221]; [222]	- [115] [223]
Zellzyklus regulierende Proteine	MEK c-src	[224] [88]	[224,225] [88]
Oberflächen-Antigene	CD34 CD8α	[107] [226]	[107] [226]
Signaltransduktion	Gα16-Untereinheit	[227].	[227]
Rezeptoren	Nicotin-Acetylcholin-Rezeptor „β-adrenic receptor“ Immunglobulin E Rezeptor α-Untereinheit der Na,K-ATPase	[201] [201] [201] [228]	- [229] - [230]
Neuronale Proteine	Neurogranin (RC3, p17, BICKS) MARCKS GAP-43 (F1, B-50, Neuromodulin)	[231] [232] [201,233,234]	[235-[237] [232,238] [239-241]
Membranproteine	Na ⁺ channel protein Glucosetransporter GTP-binding protein HLA Antigen Chromaffin granule-binding protein	[201] [201] [201] [201] [201]	[242] [243] [227] [244] -
Effektoren des Vesikeltransportes	Synaptotagmin I; Diacylglycerol-Kinase Dynamin I	[245] [246] [247]	[245] [248] [247]

^{#7}: Die Aufstellung erhebt keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Wie die Erörterung zeigt, ist sehr wenig über PKC-Substrate in vivo bekannt, die den konstitutiven Transport in eukaryontischen Zellen beeinflussen könnten.