1. Einleitung

Jedes Lebewesen benötigt ein sehr gut funktionierendes Kommunikationssystem. Signale müssen aufgenommen, weitergeleitet, verarbeitet und sowohl innerhalb des Organismus als auch innerhalb einer jeden Zelle übertragen und umgesetzt werden. Wenn sich die Zelleigenschaften langfristig ändern, z.B. während der Differenzierung, sind Veränderungen in der Genexpression notwendig. Dafür müssen einige Signale den Zellkern erreichen, wo die Gentranskription stattfindet. Wird die Signaltransduktion zwischen den extrazellulären Stimuli und den nukleären Ereignissen behindert, dann wird in den Fällen, wo es keine alternativen Übermittlungswege gibt, beispielsweise die Wachstumskontrolle versagen. Die Zellen hyperproliferieren und Krebs bildet sich aus.
In diesem komplexen Netz der Signalübertragung von der Plasmamembran zum Zellkern ist die Phosphorylierung der Proteine durch Proteinkinasen ein zentrales Ereignis. Eine besondere und bedeutende Rolle spielt hierbei die Proteinkinase C (PKC), die in eine ganze Reihe von zellulären Signalübertragungen involviert ist.

1.1. Die Proteinkinase C

Die Proteinkinase C wurde zuerst als eine Histon-Kinase-Aktivität aus Rattengehirn bestimmt, die durch begrenzte Proteolyse aktiviert werden konnte [Inoue et al., 1977]. Daraufhin entdeckte man, dass diese neue Kinase auch durch Phosphatidylserin (PS) und Diacylglycerol (DAG) in einer Ca^{2+}- abhängigen Art und Weise sowie durch tumorfördernde Phorbolester, wie z.B. Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA; Synonym Tetradecanoyl-Phorbol-Acetat, TPA) aktiviert werden konnte [Nishizuka, 1984].
Die Mitglieder der Proteinkinase C-Familie sind zentrale Signalproteine. So spielen sie bei der hormonellen Signaltransduktion eine wichtige Rolle und sind in die Regulation von Zellwachstum, Zelldifferenzierung, möglicherweise in die neoplastische Transformation sowie in andere Zellfunktionen eingeschaltet [Clemens et al., 1992; Nishizuka, 1992; Livneh und Fishman, 1997].

Die Familie der Proteinkinase C

Wie die meisten der Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinase-Familien weist auch die Familie der Proteinkinase C eine beträchtliche Heterogenität auf. Anhand verschiedener Kriterien wie Sequenz, Stimulierbarkeit und Regulation sind in Säugetieren bis jetzt

mindestens 11 verschiedene Isoformen[1] der Proteinkinase C entdeckt worden, die als α-, βI-, βII-, γ-, δ-, ε-, ζ-, η-, θ-, und ι-/λ- Subtypen bezeichnet werden (wobei PKCλ das Maus-Homolog von PKCι ist) [Krauss, 1997; α, β, γ: Parker et al., 1986; Coussens et al., 1986; δ, ε, ζ: Ono et al., 1987; η: Osada et al., 1990; θ: Osada et al., 1992; ι/ λ: Selbie et al., 1993]. Die verschiedenen Isoformen unterscheiden sich in ihrer zellulären Lokalisation, in ihrer Aktivierbarkeit durch Cofaktoren sowie durch ihre Substratproteine. So sind z.B. die α-, δ- und ζ-Isoformen in nahezu allen Geweben weit verbreitet, während die anderen Subtypen nur in spezialisierten Geweben vorkommen [Krauss, 1997].

Auf der Basis ihrer enzymatischen Eigenschaften sind die Säugetier-PKC-Isotypen in kleinere Unterfamilien unterteilt worden. Die bisher am besten verstandene und am meisten untersuchte Gruppe ist die der konventionellen PKCs (cPKCs), die die Isotypen α, βI, βII und γ umfasst (das PKCβ-Gen wird alternativ gespleißt, um zwei Genprodukte zu erzeugen, die sich nur in ihren äußersten C-terminalen Enden unterscheiden [Coussens et al., 1987]). Diese PKC-Isotypen werden durch PS in einer Ca^{2+}-abhängigen Art und Weise aktiviert. Sie binden auch DAG, das sowohl die Spezifität des Enzyms für PS erhöht als auch die Affinität für Ca^{2+} in den physiologischen Bereich verlagert [Takai et al., 1979]. Der Tumorpromotor PMA aktiviert die cPKCs, indem er das erforderliche DAG eliminiert und die Konzentration des Ca^{2+} vermindert, das für die Aktivierung benötigt wird [Castagna et al., 1982].

Die neuen PKCs (nPKCs) bestehen aus den Isotypen ε, η, δ, und θ. Sie sind Ca^{2+}-unabhängig, werden aber ebenfalls durch DAG oder Phorbolester in Gegenwart von PS aktiviert [Ono et al., 1988].

Die atypischen PKCs (aPKCs) ι und ζ sind wie die nPKCs Ca^{2+}-unabhängig, reagieren jedoch auch nicht auf PMA bzw. DAG [Ono et al., 1989].

Proteinsequenzvergleiche ordnen die PKC-Isotypen in vier Untergruppen ein (Abb.1). Diese Gruppen sind identisch mit jenen, die durch die oben beschriebenen enzymatischen Kriterien erzeugt wurden, wobei die einzige Ausnahme in der

[1] In einigen Veröffentlichungen wird von 12 Isotypen ausgegangen, da man der Ansicht war, dass die PKCμ eine Angehörige der atypischen PKC-Unterfamilie ist [Johannes et al., 1994]. Sie stellt den Maus-Isotyp der Proteinkinase D (PKD) dar. PKD ist eine Proteinkinase, die durch Phorbolester und DAG stimuliert wird [Valverde et al., 1994]. Die Prüfung der katalytischen Domäne der PKD zeigt, dass sie mit CaM K II-ähnlichen Proteinkinasen verwandt ist. Sowohl ihre Substratspezifität [Valverde et al., 1994] als auch ihre Empfindlichkeit gegenüber Inhibitoren [Johannes et al., 1995] ist mit denen der PKC-Familie nicht ähnlich.

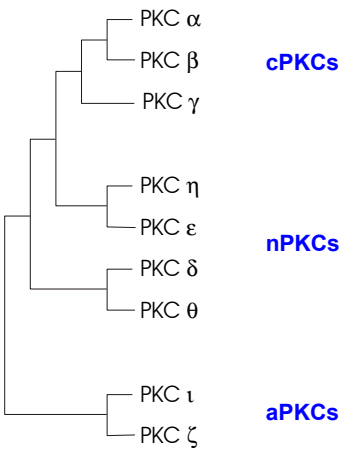

Abbildung 1. Dendrogramm, das auf Grund eines Proteinsequenzvergleiches die PKC-Isotypen in 4 Untergruppen einteilt.

Aufteilung der nPKCs in zwei Paare sehr nahe verwandter Kinasen besteht, nämlich δ und θ sowie ε und η.

Die Existenz der vielen Isoformen lässt darauf schließen, dass den einzelnen Subtypen spezifische Funktionen im Organismus zukommen [Dekker und Parker, 1994].

Struktur der Proteinkinase C

Die Mitglieder der Familie der Proteinkinase C bestehen aus einer Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 63 - 83kDa [Krauss, 1997]. Sie lassen sich in eine N-terminale regulatorische und in eine C-terminale katalytische Domäne unterteilen, die durch eine Scharnierregion verbunden sind. In beiden Domänen finden sich konservierte ($C_1 – C_4$) und variable Regionen ($V_1 – V_5$) [Hug und Sarre, 1993].

Die Struktur der gesamten Proteinkinase C konnte bislang noch nicht detailliert aufgeklärt werden. Der Grund dafür dürfte die Flexibilität und die Membranassoziation der Proteinkinase C sein [Krauss, 1997]. Dennoch ließ ein Vergleich der Proteinsequenz-Anordnungen zwischen PKC-Isotypen erkennen, dass Bereiche hoher Sequenzübereinstimmung zwischen den Familienangehörigen vorhanden sind (Abb.2).

Die C1-Domäne

Die cPKCs und die nPKCs enthalten eine C1-Domäne, bestehend aus zwei sich wiederholenden Zink-Finger-Motiven, C1a und C1b [Hurley et al., 1997]. Jedes Motiv hat ein konserviertes Muster von Cystein- und Histidin-Resten (H-X_{12}-C-X_2-C-X_{10-14}-C-

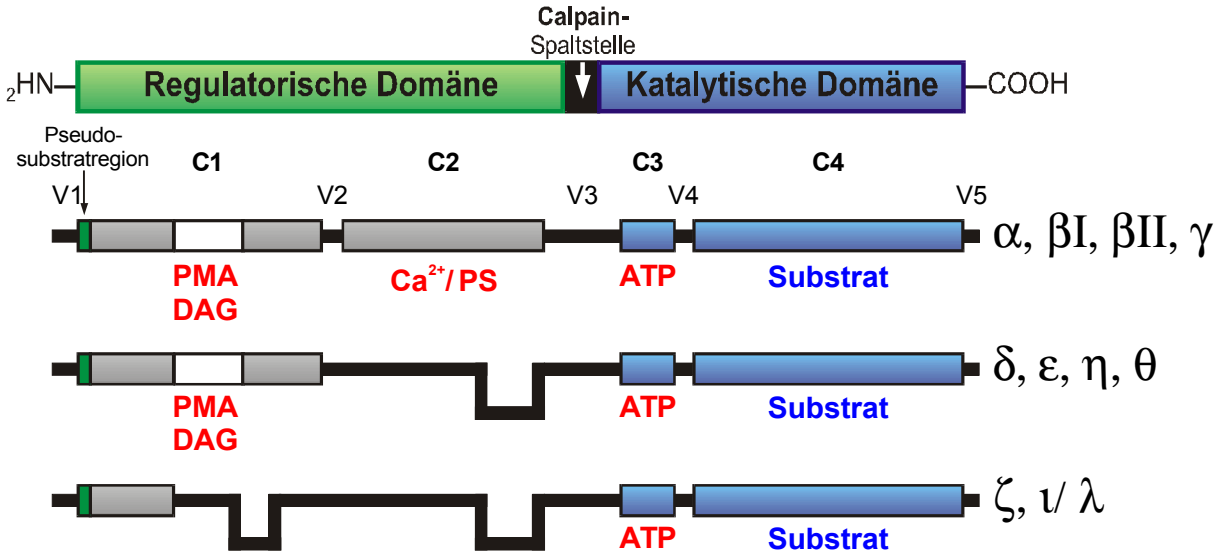

Abbildung 2. Die Domänen der Proteinkinase C-Familie.

X_2-C-X_4-H-X_2-C-X_7-C), das für die Koordination von zwei Zn^{2+}-Ionen verantwortlich ist [Hubbard et al., 1991]. Die C1-Domäne ist die Bindungsstelle für Phorbolester [Kaibuchi et al., 1989]. Bindungsuntersuchungen haben gezeigt, dass DAG mit PMA um die Bindung an die PKC konkurriert, weshalb angenommen wird, dass die beiden Moleküle mit PKC an derselben Stelle wechselwirken [Sharkey und Blumberg, 1985].
Die aPKCs reagieren nicht auf Phorbolester, enthalten aber ein einzelnes Zink-Finger-Motiv. Die Funktion des einzelnen Zink-Fingers in den aPKCs ist unbekannt [Mellor und Parker, 1998].

Die C2-Domäne

Die C2-Domäne liegt in den cPKCs unmittelbar C-terminal zur C1-Domäne. Viele Proteine, bei denen eine C2 Domäne festgestellt worden ist, binden Ca^{2+}-abhängig Phospholipid. Deshalb nimmt man an, dass die C2-Domäne die Ca^{2+}/ PS-Bindung auf die cPKCs überträgt [Mellor und Parker, 1998].
Bei den Ca^{2+}-unabhängigen PKCs fehlt die klassische C2 Domäne. Eine genaue Überprüfung dieser Enzyme lässt jedoch erkennen, dass homologe Regionen, die ursprünglich als V_0 bei aPKCs und nPKCs bezeichnet wurden, mit der C2-Domäne verwandt sind [Sossin und Schwartz, 1993]. Bei diesen C2-ähnlichen Domänen fehlen eine oder mehrere der konservierten Aspartat-Reste, die für die Ca^{2+}-Bindung erforderlich sind.

Die Pseudosubstratstelle

Angrenzend an den N-Terminus der C1-Domänen der cPKCs, aPKCs und nPKCs befindet sich eine Sequenz, die die Kennzeichen einer PKC-Phosphorylierungsstelle aufweist, jedoch ein Alanin an der entsprechenden Serin/ Threonin-Phosphorylierungsstelle besitzt [House und Kemp, 1987]. Eine Mutation dieser Region verleiht dem mutierten Protein eine Effektor-unabhängige Aktivität [Pears et al., 1990]. Diese Pseudosubstratstelle steht in Wechselwirkung mit der katalytischen Domäne und ist für die intramolekulare Inhibition der katalytischen Aktivität vor der Effektor-

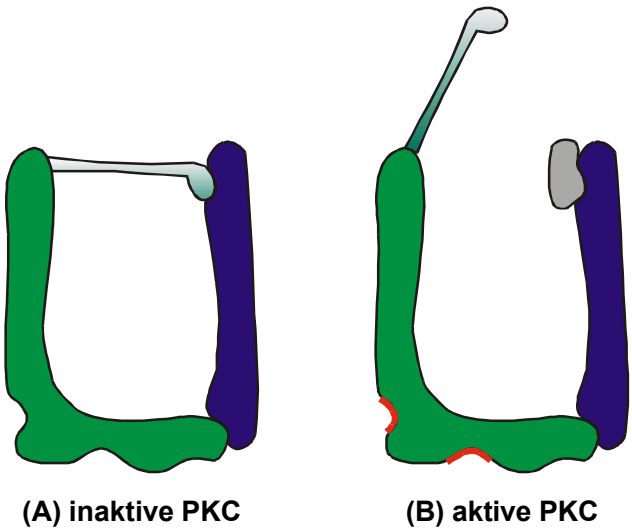

Abbildung 3. Schematische Darstellung der regulatorischen (grün) und der katalytischen (blau) Domäne, sowie der Pseudosubstratsequenz (hellgrün) der PKC. Das Substrat ist grau und die Aktivatoren rot dargestellt. **(A)** Unter nicht stimulierenden Bedingungen steht die Pseudosubstratsequenz mit der katalytischen Domäne in Wechselwirkung und verhindert so die Bindung eines Substrats an die PKC. **(B)** Nach Aktivierung der PKC wird durch eine Konformationsänderung diese Wechselwirkung zwischen der Pseudosubstratsequenz und der katalytischen Domäne aufgehoben und die Substratbindungsstelle freigelegt.

Bindung verantwortlich (Abb.3). Zur Untersuchung der Proteinkinase C können Peptide dieser Pseudosubstratsequenz als Inhibitoren der PKC eingesetzt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Pseudosubstratsequenz 19 – 31 der cPKCs als PKC Inhibitor verwendet.

Die katalytische Domäne

Die katalytische Domäne wird durch die konservierten C3- und C4-Abschnitte gebildet und enthält eine gut konservierte ATP-Bindungsregion sowie eine Substratbindungsstelle, die bei einem Vergleich der verschiedenen Mitglieder der Proteinkinase C-Familie große Unterschiede aufweist [Krauss, 1997].

Regulation und Aktivierung der Proteinkinase C

Die Proteinkinase C wird durch Ca^{2+} und Diacylglycerol reguliert und ist somit Bestandteil von Signalwegen, in deren Verlauf die Phospholipase C aktiviert wird. Dabei werden die Botenstoffe Inositol-(1,4,5)-trisphosphat/ Ca^{2+} sowie Diacylglycerol produziert. Die Aktivierung der Proteinkinase C kann somit über zwei zentrale Signalwege erfolgen. Signalwege, die von Rezeptor-Tyrosinkinasen ausgehen, stimulieren die PKC, indem die Phospholipase Cγ aktiviert wird. Wird hingegen ein aktivierendes Signal von G-Protein-gekoppelten Membranrezeptoren in Richtung Proteinkinase C ausgesandt, dann geschieht dies über eine Aktivierung der Phospholipase Cβ [Buchner, 2000].

In vielen Fällen wird nach Aktivierung der Signalwege, die die PKC als Regulationselement enthalten, eine länger andauernde Stimulation der Proteinkinase C beobachtet, die auch lang andauernde biologische Effekte nach sich zieht [Liskovitch, 1992].

Auch freie Fettsäuren, wie z.B. die Arachidonsäure, spielen eine Rolle bei der Aktivierung der Proteinkinase C. Sie können durch die Einwirkung der Phospholipase A2 auf Phospholipide freigesetzt werden. Die Details dieser Aktivierung sind noch unbekannt [Krauss, 1997].

Eine weitere Rolle bei der Regulation der Proteinkinase C spielt die proteolytische Aktivierung durch das Ca^{2+}-abhängige Calpain und durch Caspasen. Dabei werden PKCα, β, und γ meist von μ- und m-Calpain und PKCδ, ε, θ und ζ durch Caspasen gespalten [Leverrier et al., 2002; Emoto et al., 1995]. Durch diese Proteasen kann das Enzym an der Verbindungsstelle zwischen regulatorischer und katalytischer Domäne gespalten werden (Abb. 2). Die Proteinkinase C verliert somit ihre Calciumabhängigkeit und ist nun konstitutiv aktiv. Das katalytisch aktive Fragment ist so keiner Regulation durch die Cofaktoren mehr zugänglich [Leverrier et al., 2002; Krauss, 1997]. So bewirken z.B. die freigesetzten katalytischen Domänen während der Apoptose, dass Lamin B phosphoryliert [Shimizu et al., 1998] und Cytochrom c aus den Mitochodrien freigesetzt wird [Leverrier et al., 2002], was zum apoptotischen Zelltod führt.

Stimulation durch Phorbolester

Die Proteinkinase C-Familie lässt sich auf Grund ihrer Aktivierbarkeit durch einige Tumorpromotoren, wie z.B. die Phorbolester, sehr gut identifizieren und

charakterisieren. Tumorpromotoren wie Phorbol-12-Myristat-13-Acetat, PMA, sind selbst nicht imstande, eine Tumorbildung zu initiieren. Sie wirken aber fördernd auf die Tumorauslösung durch kanzerogene Substanzen, wie z.B. Benz(a)pyren. Über welchen Mechanismus die strukturell sehr heterogenen Tumorpromotoren ihre Wirkung ausüben, ist bis jetzt noch unklar.

Im Falle des PMA wird als Erklärung die Stimulation der Proteinkinase C herangezogen: Die Proteinkinase C bindet PMA mit hoher Affinität und wird somit aktiviert. Da die PKC u.a. auch an der Regulation von Proliferation und Differenzierung beteiligt ist, könnte eine unregulierte Aktivierung der PKC zu unerwünschten Proteinphosphorylierungen führen und damit eine Fehlregulation der Zellproliferation bzw. der Differenzierung einleiten.

Eine kurzzeitige Exposition mit PMA führt zur Aktivierung der PKC. Die Wirkung bei langzeitiger Exposition ist abhängig von der PMA-Konzentration. So aktivieren 100nM PMA auch bei längerer Inkubationszeit die PKC, während 500nM PMA schon nach kurzer Zeit herunterregulierend auf die PKC wirken [Liou et al., 2000; Li et al., 2001]. Die externe Zugabe von PMA in zellulären Modellsystemen stellt zwar somit ein wichtiges Hilfsmittel dar, um zu überprüfen, welche biologischen Antworten eines Signalweges unter Beteiligung und Kontrolle der Proteinkinase C ablaufen, aber es ist manchmal schwierig zu beurteilen, ob die beobachteten Effekte durch PKC-Aktivierung oder durch PKC-Depletion verursacht werden. Außerdem gibt es auch noch andere zelluläre Ziele für Phorbolester, weshalb Untersuchungen, die nur auf Phorbolester beruhen, kritisch betrachtet werden müssen [Buchner, 2000; Krauss, 1997].

Aktivierung der Proteinkinase C

In ihrer inaktiven Form liegt die Proteinkinase C als lösliches, zytosolisches Protein vor. Die katalytische Domäne ist auf Grund der Abwesenheit der aktivierenden Cofaktoren einer Autoinhibition (Abb. 3) durch die Pseudosubstratsequenz der regulatorischen Domäne unterworfen [Orr und Newton, 1994]. Bei Bindung der aktivierenden Cofaktoren Ca^{2+}, Diacylglycerol und Phospholipid bzw. bei Bindung von PMA wird wahrscheinlich eine Struktur der Proteinkinase C stabilisiert, in der das aktive Zentrum für Substratproteine zugänglich wird. Dabei macht die Peptidkette eine Konformationsänderung durch, so dass die Substratbindungsstelle im aktiven Zentrum des Enzyms freigelegt wird.

Lokalisation und Translokation der Proteinkinase C

Nach Aktivierung der PKC im Zytosol transloziert sie sowohl an die Plasmamembran als auch in den Zellkern (Abb.4).

Es ist bis heute noch nicht möglich, eine allgemeine Regel für die Lokalisation der einzelnen PKC-Isoformen aufzustellen. Unterschiedliche Zelltypen exprimieren verschiedene PKC-Isoformen, die in unterschiedlichen Kompartimenten der Zelle lokalisiert sind, einschließlich dem Zellkern [Beckmann et al., 1994; Martelli et al., 1999]. Ferner konnte gezeigt werden, dass in verschiedenen subzellulären Kompartimenten eine Stimulus-abhängige Relokalisierung stattfindet. PKC-Bindungsproteine spielen möglicherweise hierbei eine wichtige Rolle [Mochly-Rosen und Gordon, 1998].

Man vermutet, dass zwischen der zytosolischen und der membrangebundenen PKC ein dynamisches Gleichgewicht existiert, welches durch die hydrophoben Cofaktoren Phosphatidylserin und Diacylglycerol bzw. Phorbolester in Richtung Membranassoziation verschoben wird.

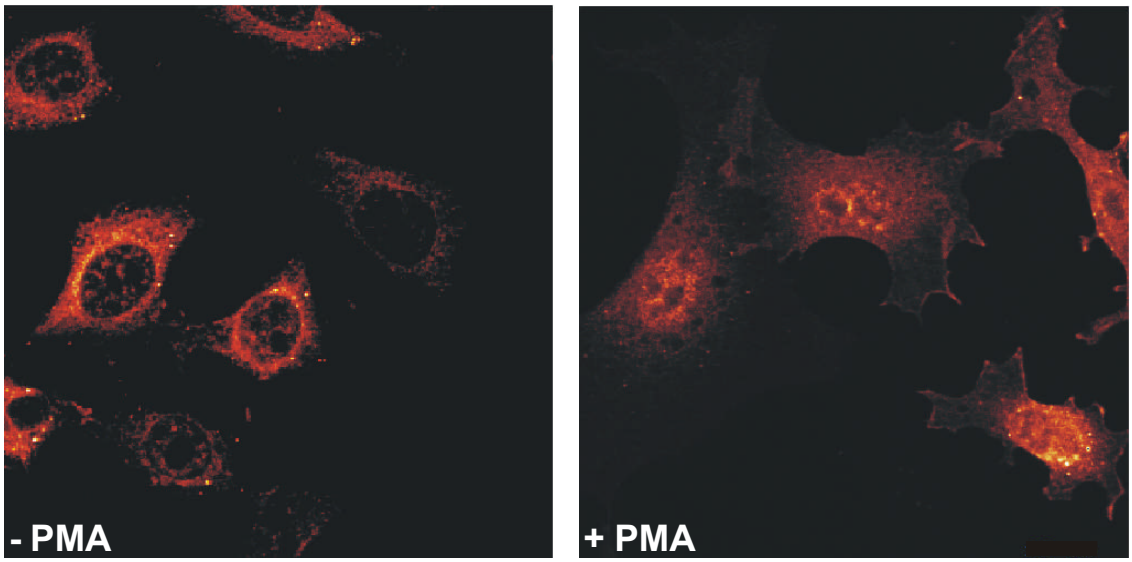

Abbildung 4. Lokalisation der PKCa in NIH 3T3-Zellen vor und nach Zugabe von 100nM PMA. Im nicht-stimulierten Zustand (-PMA) ist die PKC im Zytosol der Zelle lokalisiert, transloziert aber nach Aktivierung (+PMA) sowohl an die Plasmamembran als auch in den Zellkern. [Hucho und Buchner, 1997]

1.2. Die nukleäre Proteinkinase C

Der erste Bericht, der das Vorhandensein von PKC im Zellkern aufzeigte, wurde 1987 von Capitani et al. veröffentlicht. Diese Autoren wiesen nach, dass die PKC in Rattenleberzellkernen mit der Kernmatrix verbunden ist, einer hauptsächlich proteinhaltigen, dynamischen Struktur, die als ein Nukleoskelett fungiert [Berezney, 1995]. Anfängliche Berichte deuteten darauf hin, dass die PKCα zur Zellkernhülle der NIH 3T3-Zellen translozierte [Leach et al., 1989]. Spätere Studien haben gezeigt, dass die PKC sich vom Zytoplasma weiter ins Innere des Zellkerns bewegen konnte. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass eine ganze Reihe unterschiedlicher Signale, die in die Wachstumsregulation involviert sind, wie der Insulin-ähnliche Wachstumsfaktor 1(IGF-1, *insulin-like growth factor 1*), α-Thrombin, Angiotensin II und Vitamin D3, die Translokation der PKC in den Zellkern auslösen [Divecha et al., 1991; Martelli et al., 1991; Simboli-Campbell et al., 1994].

Da die PKC nicht nur zur Kernmembran transloziert, sondern auch noch weiter ins Innere des Zellkerns gelangt, haben verschiedene Gruppen die subnukleäre Lokalisation der Kinase untersucht. Eine sehr detaillierte Analyse der subnukleären Verteilung der PKC-Isoformen in den Neuroblastoma x Gliom-Zellen NG-108-15 wurde durch Beckmann et al. [1994] durchgeführt. Es wurde beobachtet, dass PKCα sich im Zellkern befand, mit Ausnahme der Nukleoli, wohingegen der δ- Isotyp nur in den Nukleoli gefunden wurde. Schließlich wurde PKCε in den Porenkomplexen an der Zellkernhülle lokalisiert. Obwohl die βII-Isoform im Zytoplasma vorhanden war, war sie in den Zellkernen nicht feststellbar. Einen sehr guten Überblick über die subnukleäre Lokalisation verschiedener Isoformen der PKC geben die Übersichtsartikel von Buchner [1995] und Martelli et al. [1999].

Da der gezielte Transport von Proteinen zum Zellkern in seiner Primärstruktur ein Kernlokalisationssignal (NLS, *nuclear localisation signal*) benötigt und alle Isoformen der PKC auf der Ebene des Zellkerns ermittelt worden sind [α: Neri et al., 1994, βI und βII: Mason-Garcia et al., 1995, γ: Oehrlein et al., 1998, δ: Borgatti et al., 1996, ε: Gordon et al., 1997, η: Borgatti et al., 1996, θ: Jones et al., 1997, ζ: Zauli et al., 1996, ι /λ: Wooten et al, 1997], ergeben sich die Fragen, wie die PKC-Isoformen in den Zellkern gelangen und ob sie über NLS-Motive verfügen.

Sowohl Ionen als auch kleine Moleküle können passiv durch die 9-nm Poren des Porenkomplexes des Zellkerns hindurchdringen, während Makromoleküle, wie die

PKC, ein NLS in ihrer Sequenz oder einen in Wechselwirkung stehenden Partner brauchen, der einen aktiven Transport durch den 26-nm Zentralkanal ermöglicht [Silver, 1991].

In einem klassischen Modell der Zellkern-Translokation der PKCα wurden NIH 3T3-Zellen mit Phorbolester stimuliert, was zu einer Anhäufung des Enzyms in den Zellkernen führte. Wurde jedoch das Zytoskelett durch Cytochalasin B (einem Zytostatikum) oder Colchicin (einem Alkaloid aus Liliaceae, welches als Meiose- und Mitosegift wirkt) zerstört, war die Zellkerntranslokation gehemmt [Schmalz et al., 1996]. Im Gegensatz dazu wurde in einem *in-vitro*-Kerntransportassay die Zellkernanhäufung eines Reporterproteins, das ein bekanntes NLS-Motiv enthielt, durch diese Wirkstoffe nicht beeinträchtigt. Deshalb kam man zu der Schlussfolgerung, dass das Zytoskelett eine wichtige Rolle bei der Zellkerntranslokation der PKC-Isoformen spielt, die kein NLS oder kein bis heute bekanntes NLS besitzen [Schmalz et al., 1996, 1998].

Die Translokation der PKC in den Zellkern könnte über PKC-Bindungsproteine erfolgen, die als „Chauffeure“ fungieren würden. Allerdings konnte bis heute noch kein Bindungsprotein identifiziert werden, dass diese Rolle übernehmen könnte. Auch wenn der Mechanismus dieser Translokation noch nicht richtig verstanden wird, so konnten doch PKC-Bindungsproteine innerhalb des Zellkerns identifiziert werden, die neben ihren anderen Funktionen eine wichtige Rolle beim Zurückhalten der PKC im Zellkern spielen könnten [Buchner, 2000; Rosenberger et al., 2002].

Regulation der PKC im Zellkern

Die Präsenz der PKC im Zellkern ruft die Frage hervor, wie die Kinase dort durch Lipid-Cofaktoren sowie Ca^{2+} aktiviert und im aktivierten Zustand gehalten werden kann. In diesem Zusammenhang ist herausgefunden worden, dass die Zellkerne PS enthalten [Capitani et al., 1986]. Außerdem ist die Existenz eines Phosphoinositid-Zyklus im Zellkern nachgewiesen worden, der Enzyme für die Synthese und den Abbau von Inositol-Lipiden beinhaltet. Aus denen kann DAG im Anschluss an die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) durch die Wirkung einer spezifischen Phosphatidylinositol-Phospholipase C erzeugt werden, die mit der Kernmatrix assoziiert ist [Cocco et al., 1994; Neri et al., 1999]. In anderen Zelllinien könnte jedoch das Phosphatidylcholin, über die Wirkung einer Phospholipase D oder einer

Phosphatidylcholin-Phospholipase C, eine Quelle für das nukleäre DAG sein [Raben et al., 1994; D´Santos et al., 1998].

Die Erzeugung von DAG im Zellkern ist die naheliegendste Art und Weise, PKC anzuziehen und zu aktivieren, aber nicht die einzige. So können z.B. PKC-ζ, und -λ alternativ zumindest teilweise hinsichtlich ihrer Aktivierung von Inositiden abhängig sein, wenn diese in der D-3 Position des Inositolringes phosphoryliert worden sind, wie z.B. das Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP_3) [Chou et al., 1998]. Die PI 3-Kinase, das Enzym, welches für diese Phosphorylierung verantwortlich ist, ist in Zellkernen gefunden worden [Neri et al., 1994b].

Bis heute ist noch nicht klar, ob Zellkerne in der Lage sind, ihren Ca^{2+}-Gehalt unabhängig vom Zytosol zu regulieren. Es konnte jedoch bewiesen werden, dass die nukleäre Ca^{2+}-Konzentration hoch genug ist, um Ca^{2+}-abhängige Prozesse im Zellkern zu aktivieren [Dedhar et al., 1994; Gilchrist and Pierce, 1993].

Funktionen der nukleären Proteinkinase C

Die nukleären PKC-Isoformen sind vermutlich an der Zellproliferation, an der Differenzierung, an der neoplastischen Transformation und an der Apoptose beteiligt.

So gibt es mehrere Studien, die versucht haben, die nukleären PKC-Isoformen mit der Zellproliferation zu verknüpfen. Diese Untersuchungen wurden mit einer Vielzahl von Zelllinien ausgeführt, die mit verschiedenen mitogenen Stimuli behandelt worden sind [Martelli et al., 1999].

NB4 Zellen und HL-60 Zellen haben die Fähigkeit, bei einer Behandlung mit all-*trans*-Retinsäure oder Vitamin D_3 zu differenzieren. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass sich das Niveau der PKC-Aktivität in den Kernen der HL-60 Zellen ständig erhöht, nachdem sie mit all-*trans*-Retinsäure behandelt worden sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass sich PKCα und -ζ innerhalb des Zellkerns anhäuften [Zauli et al., 1996]. In NB4 Zellen wurde nach Einwirkung des Vitamins D_3 eine schnelle Zellkern-Translokation sowohl der Isoform-α als auch -δ beobachtet, begleitet von einer Phosphorylierung von stromabwärts gelegenen Signalintermediaten [Berry et al., 1996]. Die nukleären PKC-Isoformen scheinen somit auch in die Differenzierung involviert zu sein. Diese Korrelationen können aber nicht beweisen, dass die nukleäre PKC die Zelldifferenzierung beeinflusst oder sogar reguliert.

Verschiedene andere Studien hingegen berichten von einer potentiellen Rolle der nukleären PKC bei der Apoptose [Trubiani et al., 1994; Martelli et al., 1999; Brodie and Blumberg, 2003]. Es konnte gezeigt werden, dass in spontan apoptotischen U937-Zellen das Expressionsniveau von PKCδ im Zellkern reduziert und das der nukleären PKCα erhöht war [Pongracz et al., 1995]. In HL-60-Zellen wurde Apoptose durch Camptothecin induziert. Nach einer Stunde war Lamin B phosphoryliert, bevor es gespalten wurde und die Zelle das letzte Stadium der Apoptose erreichte. Es wird angenommen, dass PKCα Lamin B während der Apotose phosphoryliert [Shimizu et al., 1998].

Um ein besseres Verständnis der Funktion der PKC im Zellkern zu erhalten und um die **Funktion der nukleären PKC** von der der zytosolischen PKC zu differenzieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein **zellkernspezifischer Inhibitor der Proteinkinase C** hergestellt und charakterisiert. Diese Kern-spezifische Wirkung unterscheidet sich von konventionellen Inhibitoren, die die PKC sowohl im Zytosol als auch an der Plasmamembran und im Kern inhibieren.

1.3. Zell-permeable Peptide und Proteine

Ein effizienter Weg, um die zeitliche und räumliche Regulation von Proteinen zu untersuchen und somit die molekülspezifischen intrazellulären Prozesse zu veranschaulichen, besteht im Transfer von Makromolekülen in lebende Zellen. Zu diesem Zweck wurden verschiedene molekulare Transfermethoden entwickelt (Tab.1).

Methode	Vorteile	Nachteile
Direkter Transfer		
Mikroinjektion	Hohe Wirksamkeit (100%) und Überlebensrate; Wenige quantitative Einschränkungen bei Zielzellen und Untersuchungsmaterial; kompartimentspezifischer Transfer	Eine begrenzte Anzahl von Zellen kann injiziert werden; Hohe Kosten; Technisch anspruchvoll
Trägervermittelter Transfer (*carrier-mediated transfer)*		
Proteintransduktion	Rezeptor, Energie und Transport sind unabhängig; Gleichzeitiger Transfer zu einer großen Anzahl von Zellen; *In vivo* Anwendungen möglich	Größeneinschränkung bei Molekülen, die transferiert werden können; Transfer wird von einer Proteinentfaltung begleitet
Liposomvermittelter Transfer	Hohe Wirksamkeit; Wenig Einschränkungen bei der Probengröße; Eine Vielzahl von Molekülen kann transferiert werden; *In vivo* Anwendungen möglich	Stört den Lipidstoffwechsel
Bombardierung mit Mikroprojektilen	Anwendbar auf ein breites Spektrum von Zellen (einschließlich Pflanzenzellen); Oberflächenrezeptor unabhängig; Geeignet für *in vivo* Gentherapie	Spezielle Ausrüstung erforderlich; Funktioniert am besten bei der DNA-Transfektion
Transfer durch Permeabilisierung der Plasmamembran		
Streptolysin-O Permeabilisierung	Funktioniert mit einer Vielzahl von Probenmolekülen; Hohe Wirksamkeit; Zellen bleiben intakt; Eine große Anzahl von Zielzellen ist separat zugänglich; Billig und einfach im Gebrauch; Könnte automatisiert werden	Größenbeschränkung (100 kDa) der Moleküle, die transferiert werden können
Elektroporation	Eine große Anzahl von Zielzellen ist separat zugänglich; Anwendbar auf ein breites Spektrum von Zellen (einschließlich Pflanzenzellen); Wenige Probeneinschränkungen; Hohe Wirksamkeit	Erfordert spezielle Geräte; Funktioniert am besten, wenn sich die Zellen in einer Suspension befinden

Tabelle 1. Allgemeine Transferverfahren: Vor- und Nachteile einiger Transfermethoden. [Stephens und Pepperkok, 2001]

Der direkte Transfer führt die interessierenden Moleküle unmittelbar in die Zelle ein. Eine zweite Transfermethode benutzt Transporter (*carrier-mediated transfer*), die selbst die Plasmamembran durchqueren können. Die Moleküle, die von Interesse sind, werden an diese Transporter gekoppelt und gelangen so mit deren Hilfe in die Zelle. Eine dritte Klasse von Transfermethoden nutzt Chemikalien, bakterielle Toxine oder elektrische Impulse, um die Plasmamembran transient zu permeabilisieren. Der Transfer erfolgt dann über Diffusion durch die gebildeten Poren. Jede dieser Methoden hat ihre charakteristischen Vor- und Nachteile in Bezug auf Zellviabilität, Transfereffizienz, allgemeine Anwendbarkeit und technische Erfordernisse (vgl. Tab.1).

Glaskapillaren-Mikroinjektion

Die effizienteste und am häufigsten benutzte direkte Transfermethode ist die Glaskapillaren-Mikroinjektion [Brandner et al., 1974]. Bei dieser Methode kann eine Transfereffizienz und eine Überlebensrate von 100% erreicht werden. Man injiziert die entsprechende Probe mit einer Glasmikropipette, deren Spitze kleiner als 0,5µm ist, in den Zellkern oder in das Zytoplasma der adhärenten Zellen. Somit ist die Mikroinjektion eine quantitative Methode, bei der sogar Ko-Injektionen mit verschiedenen anderen Molekülen in einer bestimmten und bekannten Stöchiometrie möglich sind. Außerdem können sogar ganze Organellen [Celis, 1984] oder die entsprechenden Moleküle zu bestimmten Stadien des Zellzyklus in die Zellen injiziert werden. Die Bedingungen der Zellkultur können vor, während oder nach der Injektion verändert werden. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, dass sie eine spezielle Ausrüstung, längeres Training und eine sichere Hand erfordern. Suspensionszellen sind schwieriger zu handhaben als adhärente Zellen, was somit den Zelltyp einschränkt. In der Regel werden nur 100-200 Zellen mit der entsprechenden Probe injiziert. Computer-gesteuerte oder halbautomatisierte Injektionen erlauben die Behandlung von bis zu 1500 Zellen pro Stunde.

HIV-1 Tat

Das HIV-1 Tat-Protein besitzt die Fähigkeit, den interzellulären Verkehr *in vitro* zu verstärken [Lai et al., 2000]. Das Tat-Protein besteht aus 86 Aminosäuren und enthält eine basische und eine cysteinreiche Region [Frankel und Pabo, 1988]. Es konnte

gezeigt werden, dass das von Tat abgeleitete Peptid (Aminosäuren 47-57), das aus 11 Aminosäuren besteht, für die Transduktion der Proteine ausreicht [Fawell et al., 1994; Nagahara et al., 1998]. Der exakte Mechanismus, durch den dieses 11-Aminosäuren-Peptid die Membran durchquert, ist noch nicht richtig verstanden. Es wird angenommen, dass der Import über adsorptive Endozytose erfolgt [Lewin et al., 2000; Mann und Frankel, 1991]. Schwarze et al. [1999] entwickelten ein Tat-β-Galaktosidase-Fusionsprotein, das effizient in Hirngewebe und Skelettmuskeln *in vivo* translozierte.

Penetratin

Penetratin ist ein 16-Aminosäuren langes Peptid. Es entspricht der dritten α-Helix (Aminosäuren 43-58) der DNA-Bindungsdomäne (Homeodomäne) von Antennapedia, einem *Drosophila*-Transkriptionsfaktor. Die Homeodomäne besitzt die Fähigkeit, sich durch die Plasmamembran zu schleusen. Wie Derossi et al. [1998] nachweisen konnten, beruht diese Fähigkeit auf dem Vorhandensein der dritten α-Helix. Die Synthese dieser dritten α-Helix (= Penetratin) ergab, dass das Peptid vergleichbar mit der vollständigen Homeodomäne durch die Plasmamembran tranzlozieren kann. Ferner besitzt das Penetratin die Fähigkeit, hydrophile Verbindungen durch die Plasmamembran zu führen. Das vorgeschlagene Transfermodell quer durch die Plasmamembran ist in Abb.5 dargestellt.

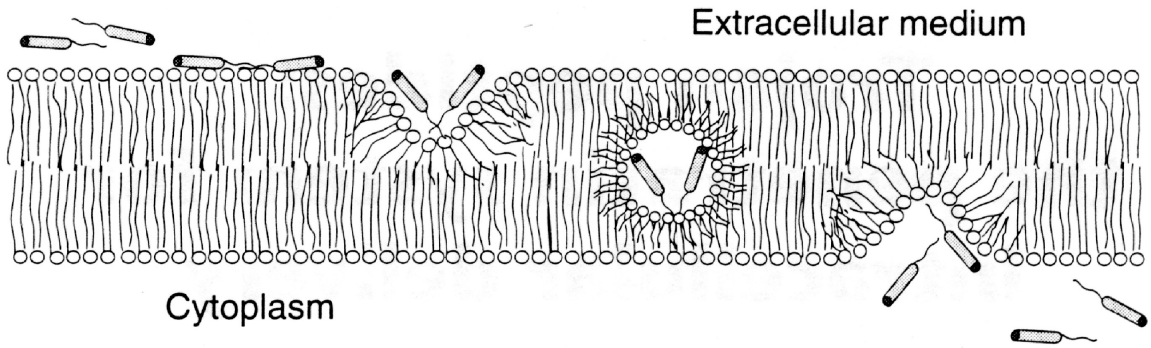

Abbildung 5. Modell zum Transport von Penetratin bzw. Penetratin-Fusionsproteinen durch die Plasmamembran: 1.Assoziation, 2.Destabilisierung, 3.Bildung einer Micelle und 4. Freisetzung ins Zytosol. In diesem Modell verlassen die Peptide nie das wässrige Milieu. [Derossi et al., 1998]

Es kommt zuerst zu einer Assoziation direkt mit der Plasmamembran. Vermutlich ist diese den elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen den positiven Ladungen der basischen Aminosäuren des Penetratins und den negativen Ladungen der

Membranlipide bzw. -zucker zuzuschreiben. Nachdem sich genügend Penetratin-Peptide auf der extrazellulären Membranfläche angesammelt haben, kommt es zu einer Destabilisierung der Membranorganisation in eine inverse Micelle. In ihrem Inneren herrscht ein hydrophiles Milieu, d.h. an das Penetratin gekoppelte hydrophile Peptide bleiben in einer wässrigen Umgebung. Die Micelle wandert durch die Membran und öffnet sich an seiner zytoplasmatischen Seite. Es bleibt jedoch zu betonen, dass dieses Modell bisher durch keine experimentellen Daten unterstützt werden konnte.
Da Penetratin effizient und nicht zelltypspezifisch ist, würde es ein wirksames Hilfsmittel für die Herstellung eines zellkernspezifischen Inhibitors der Proteinkinase C darstellen.

VP22

VP22 ist ein Hüllprotein des Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1). Es weist die bemerkenswerte Eigenschaft der interzellulären Ausbreitung auf, wobei dieses basische phosphorylierte 38kDa Protein nach Expression aus dem Zytoplasma exportiert und anschließend in viele Nachbarzellen importiert wird. Dort häuft es sich im Zellkern an [Elliott and O'Hare, 1997]. Der Mechanismus des Transportes ist gegenwärtig noch nicht verstanden, aber man vermutet einen vom Golgi-Apparat unabhängigen Weg, der mit den Aktinmikrofilamenten verknüpft sein könnte [Elliott and O'Hare, 1998].
Phelan et al. [1998] nutzten diese Eigenschaft aus und stellten ein chimäres Protein her, das aus VP22 und dem vollständigen p53-Protein besteht. Dieses Konstrukt behielt die Fähigkeit bei, sich zwischen den Zellen auszubreiten und in den Empfängerzellkernen anzuhäufen. Ferner konnten sie nachweisen, dass p53 seine Eigenschaft, Apoptose in der humanen Osteosarcoma-Zelllinie zu induzieren, nicht verliert. Diese Ergebnisse zeigen, dass ein Transport vom Zytosol der infizierten Zelle zum Zellkern der umliegenden Zellen nicht nur von Peptiden und kleinen Proteinen, sondern auch von großen multifunktionellen Proteinen durch VP22 vollbracht werden kann. VP22 könnte somit ein wichtiges Werkzeug nicht nur in der Molekularbiologie, sondern auch in der Gentherapie darstellen.

1.4. Apoptose

Lange Zeit hat man den Zelltod als ein Ereignis betrachtet, das für den Organismus grundsätzlich negativ ist. Erst durch die detaillierte Beschreibung der morphologischen Veränderungen während der Apoptose im Jahre 1972 durch Kerr, Wyllie und Currie wurde die physiologische Zellelimination als eigenständige und genetisch kontrollierte Form des Zelltods erkannt und der Begriff Apoptose[2] geprägt. Ebenso wie die Zellteilung und Zellwanderung ermöglicht der programmierte Zelltod dem Organismus, die Anzahl der Zellen und die Größe des Gewebes zu steuern und sich vor bösartigen Zellen zu schützen, die die Homöostase bedrohen. Während der Entwicklung hilft die Apoptose, den Körper zu formen, die Organe zu gestalten und die Finger und Zehen zu bilden. Sowohl das Nervensystem als auch das Immunsystem entstehen durch Überproduktion von Zellen, worauf der Tod derjenigen Zellen folgt, denen es nicht gelingt, funktionelle synaptische Verbindungen bzw. produktive Antigen-Spezifitäten herzustellen. Solch ein Programm muss genauestens reguliert werden, da zu wenig oder zu viel Zelltod zu pathologischen Erscheinungen führen kann, zu denen auch Entwicklungsdefekte, Autoimmunkrankheiten, Nervendegeneration oder Krebs gehören.

Morphologie

Morphologie apoptotischer Zellen

Bei der Apoptose läuft ein genetisch gesteuertes Programm ab, das in definierte Schritte unterteilt werden kann (Abb.6). Es sind in der Regel nur einzelne Zellen betroffen, und diese reagieren auf Signale von innen, auch wenn sich die Auslöser des Signals außerhalb der Zelle befinden. Initiiert wird der Vorgang durch das Auftreten eines Todessignals, wie z.B. UV-Licht, Toxine, Entzug von Wachstumsfaktoren, CD95/ Apo/ Fas, TNF-α, TGF-β, Zytostatika u.a. Die Zelle schrumpft zunächst und löst sich von ihren Nachbarzellen. Auf der Oberfläche bilden sich Bläschen, die gleich wieder verschwinden und durch neue ersetzt werden. Organellen behalten noch ihre Struktur, nur der Zellkern – dessen Erscheinungsbild sich bei der Nekrose (siehe unten) kaum verändert – bekommt ein völlig anderes Aussehen. Besonders auffällig ist das Verbacken des normalerweise locker im Kern verteilten Chromatins zu einem oder

[2] **Apoptose** (apo = ab, weg los; ptosis = Senkung) stammt aus dem Griechischen und beschreibt den Fall welker Blätter; im Gegensatz zu **Nekrose** (abgeleitet von griech. *nekrosis* für Tod, Tötung, Absterben).

mehreren im Lichtmikroskop deutlich sichtbaren Klümpchen in der Nähe der Kernhülle. Da die Zellmembran jedoch noch relativ lange unbeschädigt bleibt, tritt keine Entzündungsreaktion ein. Häufig wird eine apoptotische Zelle schon in diesem Stadium

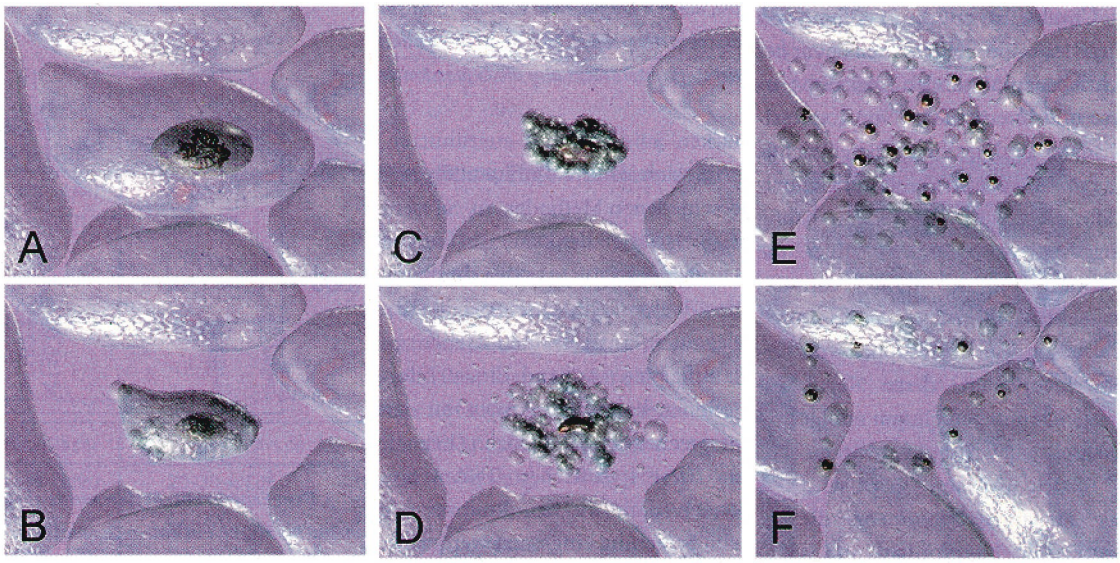

Abbildung 6. Morphologische Merkmale apoptotischer Zellen. Nach dem Auslösen eines Todesignales **(A)** schrumpft die Zelle zunächst **(B)**. Auf der Oberfläche bilden sich Bläschen und das Chromatin verklumpt **(C, D)**. Die Zelle zerfällt in viele apoptotische Körperchen, die durch Nachbarzellen oder Makrophagen aufgenommen und abgebaut werden **(E, F)**. [Herget, 2001]

von gesunden anderen Zellen in ihrem Umfeld aufgenommen und abgebaut, ohne dass eine Entzündungsreaktion einsetzt. Wird die sterbende Zelle nicht sogleich entdeckt, verändert sie sich weiter. Der Kern bricht auseinander, und die Zelle selbst zerfällt in viele membranumhüllte Teile, die apoptotischen Körperchen, von denen manche ein oder zwei Kernbruchstücke enthalten. Schließlich werden aber auch diese Reste unauffällig durch Nachbarzellen oder Makrophagen aufgenommen und in den Lysosomen weiter zerlegt, ohne dass eine Entzündungsreaktion auftritt.

Morphologie nekrotischer Zellen

Der physiologische Zelltod ist nicht zu verwechseln mit dem pathologisch bedingten Absterben von Zellen, der Nekrose. Bei der Nekrose geht das Gewebe z.B. durch Verbrennung, Vergiftung, Strahlung, einer mechanischen Verletzung oder einer anderen irreparablen Schädigung, z.B. hervorgerufen durch Sauerstoffmangel, zugrunde. Unter dem Mikroskop ist eine dafür typische Schwellung zu erkennen, die auftritt, weil Organellen wie insbesondere Mitochondrien und die Zelle selbst sich aufblähen und

zerplatzen. Wegen der Schädigung vermag sie ihren Flüssigkeits- und Elektrolythaushalt nicht mehr zu kontrollieren. Vor allem Natrium- und Calcium-Ionen, die normalerweise hinausbefördert werden, dringen ungehindert ein und mit ihnen auf Grund des osmotischen Effektes Wasser, was die Membran schließlich bersten lässt. Durch das Platzen der Plasmamembran werden Stoffe aus dem Zytoplasma freigesetzt, die im Organismus umherwandernde Immunzellen anlocken und damit eine Entzündungsreaktion hervorrufen. An sich hilft die damit einhergehende Entzündung, einen Infektionsherd zu begrenzen und anfallende Zelltrümmer zu entfernen; doch können die Immunzellen und die von ihnen abgegebenen Stoffe mitunter auch benachbartem Gewebe erheblich schaden.

Caspasen

Die meisten morphologischen Veränderungen, die von Kerr et al. [1972] bei der Apoptose beobachtet wurden, werden von einer Gruppe von Cystein-Proteasen verursacht, die speziell in apoptotischen Zellen aktiviert werden. Diese Todesproteasen sind einander ähnlich und Bestandteil einer großen Proteinfamilie, die als die Caspasen bekannt sind [Alnemri et al., 1996]. Caspasen sind durch die Evolution stark konserviert und können überall gefunden werden, angefangen vom Menschen bis zu den Insekten, Fadenwürmern und Süßwasserpolypen [Budihardjo et al., 1999; Cikala et al., 1999]. Beim Menschen sind über ein Dutzend Caspasen (14) identifiziert worden. Bei zwei Dritteln davon hat es Hinweise darauf gegeben, dass sie bei der Apoptose mitwirken [Earnshaw et al., 1999; Thornberry und Lazebnik, 1998]. Caspasen enthalten in ihrem aktiven Zentrum ein Cystein und spalten die Substrate an den Asp-Xxx Bindungen (Cysteinyl-Aspartasen). Die unterschiedliche Substratspezifität einer Caspase wird von den vier Resten bestimmt, die aminoterminal an den Spaltstellen liegen [Thornberry et al., 1997]. Da sie die meisten sichtbaren Veränderungen zustande bringen, die den apoptotischen Zelltod charakterisieren, kann man die Caspasen als die Hauptakteure ansehen. Tatsächlich bewirkt die Aufhebung der Caspaseaktivität entweder durch Mutation oder durch die Verwendung pharmakologischer Inhibitoren oder durch einige Viren eine Verlangsamung oder sogar Verhinderung der Apoptose [Earnshaw et al., 1999].

Die Aktivierung der Caspasen führt nicht zum unterschiedslosen Abbau der Zellproteine. Die Caspasen spalten vielmehr selektiv eine beschränkte Gruppe von

Zielproteinen, gewöhnlich an einer oder höchstens an wenigen Positionen in der Primärsequenz (immer nach einem Aspartatrest). Das einfachste und wahrscheinlich häufigste Ergebnis ist der Verlust biologischer Aktivität. Aber die Caspasen können auch Proteine aktivieren, und zwar entweder direkt, indem sie eine negative regulatorische Domäne abspalten, oder indirekt, indem sie eine regulatorische Untereinheit inaktivieren. So wird z.B. die Zellkernlamina durch Caspasen gespalten, was zur Zellkernschrumpfung führt [Rao et al., 1996]. Die Spaltung von PAK2 (*p21-activated kinase family*) vermittelt die Blasenbildung. Interessant ist, dass in diesem letztgenannten Fall die Caspase-Spaltung zwischen der negativen regulatorischen Untereinheit und der katalytischen Untereinheit erfolgt und zu einer konstitutiven Aktivierung von PAK2 führt [Rudel und Bokoch et al., 1997].

Aktivierung der Caspasen

Wie die meisten Proteasen werden die Caspasen als enzymatisch inerte Zymogene synthetisiert. Diese Zymogene bestehen aus drei Domänen: einer N-terminalen Prodomäne sowie den Domänen p20 und p10. Außerdem unterscheidet man zwischen langen und kurzen Prodomänencaspasen. Die meisten Caspasen werden durch proteolytische Spaltung des Zymogens zwischen den Domänen p20 und p10 und gewöhnlich auch zwischen der Prodomäne und der Domäne p20 aktiviert [Earnshaw et al., 1999].

Zu den Mechanismen der Caspase-Aktivierung gehören die proteolytische Spaltung durch eine stromaufwärts gelegene Caspase, die induzierte Annäherung (Abb.7) und die Holoenzymbildung (Abb.8). Dabei werden die Effektor-Caspasen gewöhnlich durch eine stromaufwärts gelegene Caspase proteolytisch aktiviert und die Initiator-Caspasen durch regulierte Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Am einfachsten wird eine Procaspase durch ein vorher aktiviertes Caspasemolekül aktiviert. Diese proteolytische Spaltung durch eine stromaufwärts gelegene Caspase ist geradlinig und effektiv und wird meistens für die Aktivierung von stromabwärts gelegenen Effektor-Caspasen verwendet. Die proteolytische Aktivierung wird wahrscheinlich auch für die Induzierung der Apoptose durch nicht zu den Caspasen gehörende Proteasen genutzt, wie z.B. Granzym B. Diese „Caspasenkaskaden"-Strategie der Caspasenaktivierung wird in großem Maße von Zellen für die Aktivierung der drei kurzen Prodomänencaspasen, Caspase-3, -6 und –7, angewendet. Diese drei stromabwärts gelegenen Effektorcaspasen gelten als die Arbeitspferde der Caspase-

Familie und sind gewöhnlich häufiger und aktiver als ihre langen prodomänischen Cousins [Hengartner, 2000]. Die Caspasenkaskade ist eine nützliche Methode zur Vergrößerung und Integration pro-apoptotischer Signale, aber sie kann nicht erklären, wie die erste, am weitesten stromaufwärts gelegene Caspase aktiviert wird.

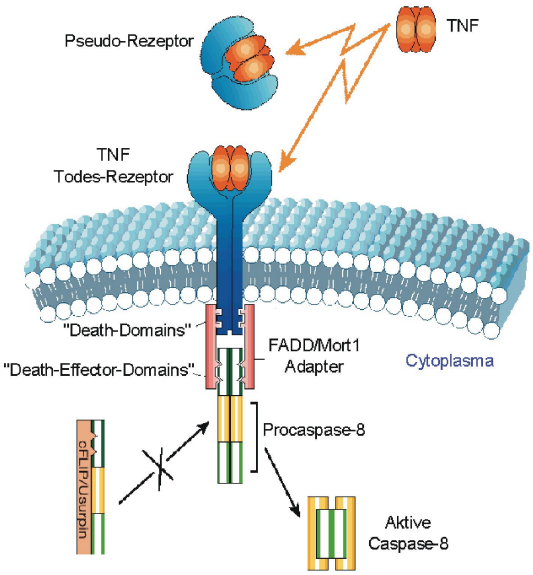

Abbildung 7. Aktivierung der Caspase-8. Bei einer Ligandenbindung aggregieren die Todesrezeptoren und bilden membranengebundene Signalkomplexe. Über Adapterproteine rekrutieren sie mehrere Procaspase-8-Moleküle, was zu einer hohen lokalen Konzentration führt. Die Dimerisierung der Procaspase-8-Moleküle führt zu ihrer Aktivierung. [Nicholson, 2000]

Die wirklichen molekularen Mechanismen, die die Aktivierung der Initiator-Caspase vermitteln, sind noch unklar und vermutlich viel komplizierter, als man zur Zeit erkannt hat. Caspase-8 ist die Schlüsselinitiator-Caspase in der Todesrezeptor-Bahn. Die Caspase-8 und –10 enthalten eine Todes-Effektordomäne (DED), wohingegen die Caspase-2 und –9 eine Domäne für die Aktivierung und Rekrutierung der Caspase (CARD) enthalten. Bei einer Ligandenbindung aggregieren solche Todesrezeptoren, wie CD95 (Apo-1/Fas), und bilden membranengebundene Signalkomplexe (Abb.7). Diese Komplexe rekrutieren dann über Adapterproteine mehrere Moleküle der Procaspase-8, was zu einer hohen lokalen Konzentration des Zymogens führt. Das Modell der induzierten Annäherung postuliert, dass unter diesen überfüllten Bedingungen die geringe intrinsische Protease-Aktivität der Procaspase-8 ausreichend ist, um den verschiedenen Proenzymen zu ermöglichen, sich gegenseitig zu spalten und einander zu aktivieren [Muzio et al., 1998]. Eine erzwungene hohe Dichte der Zymogene ist in vielen Fällen ausreichend, um die Caspasen zu aktivieren. Allerdings scheint dies ein zu

einfacher Weg zu sein, um das Schicksal einer Zelle zu kontrollieren. Während das grundlegende Konzept wahrscheinlich korrekt ist, müssen sicherlich weitere Regulationsebenen in vivo existieren, um den Prozess zu modulieren. So konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Procaspase 8 nicht durch Spaltung, sondern durch Dimerisierung aktiviert wird [Green, 2003].

Der komplizierteste bisher beschriebene Mechanismus ist die Aktivierung der Caspase-9 (Abb.8). Im Gegensatz zu anderen Caspasen hat die proteolytische Verarbeitung der Procaspase-9 nur eine geringfügige Wirkung auf die katalytische Aktivität des Enzyms. Die wichtigste Bedingung für die Aktivierung der Caspase-9 ist vielmehr ihre Assoziation mit Apaf-1 [Li et al., 1997; Zou et al., 1997]. Bei der Holoenzym-Bildung

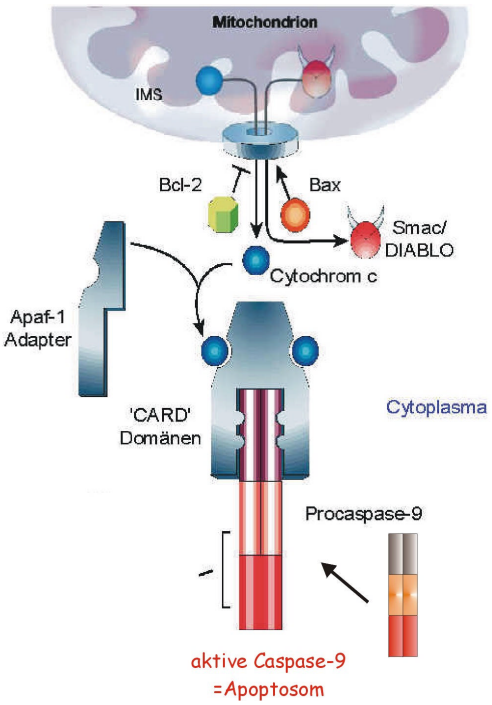

Abbildung 8. Modell der Holoenzymbildung. Bei der Aktivierung der Caspase-9 assoziiert die Procaspase-9 mit Apaf-1 und Cytochrom c zu dem apoptosomen Komplex – oft als das Apoptosom bezeichnet. Die Aktivierung der Caspase-9 wird somit durch eine Konformationsänderung vermittelt. Apaf-1 ist demzufolge eine essentielle regulatorische Untereinheit des Caspase-9-Holoenzyms. [verändert, aus Nicholson, 2000]

ermöglicht das Cytochrom c und die ATP-abhängige Oligomerisation des Apaf-1 die Rekrutierung der Procaspase-9 zu dem Apoptosom-Komplex. Die Aktivierung der Caspase-9 wird durch eine Konformationsänderung und nicht durch Proteolyse vermittelt. Demzufolge müssen wir Apaf-1 nicht nur einfach als einen Aktivator der Caspase-9 ansehen, sondern vielmehr als eine essentielle regulatorische Untereinheit des Caspase-9-Holoenzyms. Dieses Holoenzym – oft als das Apoptosom bezeichnet –

ist ein sehr großer Komplex, der mehrere zusätzliche Proteine enthalten könnte [Beere et al., 2000; Cain et al., 2000]. Die Stöchiometrie des Apoptosoms ist nicht bekannt.

Die Bcl-2 Familie

Eine weitere wichtige Rolle bei der Apoptose spielt die Bcl-2 Familie, benannt nach dem ersten Familienmitglied, das als ein Gen isoliert wurde, das an der B-Zelllymphknotengeschwulst beteiligt ist (daher der Name bcl = B-cell lymphoma). Die Familie der Bcl-2-Proteine besteht gegenwärtig aus 21 Mitgliedern und ist auf Grund struktureller und funktioneller Kriterien in drei Gruppen unterteilt worden. Die Mitglieder der Gruppe I weisen eine anti-apoptotische Aktivität auf, wohingegen die Mitglieder der Gruppen II und III den Zelltod fördern.

Die Blc-2 Familienmitglieder können sowohl homo- als auch heterodimerisieren, weshalb es so scheint, als ob sie den größten Teil ihrer Zeit versuchen, sich gegenseitig den nächsten Schritt zu blockieren, indem die gebundenen pro- und anti-apoptotischen Proteine sich gegenseitig neutralisieren [Reed, 1997; Adams und Cory, 1998]. Zellen mit einem größeren Anteil an pro-apoptotischen Proteinen werden mit höherer Wahrscheinlichkeit apoptotisch sterben, Zellen mit einem Überschuss an Familienmitgliedern, die einen Schutz bewirken, sind gewöhnlich resistent.

Die Schlüsselfunktion der Bcl-2 Familienmitglieder scheint darin zu bestehen, die Freisetzung pro-apoptotischer Faktoren, insbesondere des Cytochroms c, aus dem Mitochondrien-Intermembran-Kompartiment in das Zytosol zu regulieren [Adams und Cory, 1998; Antonsson und Martinou, 2000]. So reicht z.B. die Zugabe pro-apoptotischer Bcl-2 Familienmitglieder zu isolierten Mitochondrien aus, um die Freisetzung des Cytochroms c zu induzieren.

Nukleäre Effekte während der Apoptose

Die molekularen Teilnehmer der Apoptose sind in unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten vorhanden, darunter auch in der Plasmamembran, im Zytosol, in den Mitochondrien und im Zellkern. Die Wechselwirkung zwischen diesen Kompartimenten und der Austausch spezifischer Signalmoleküle sind von entscheidender Bedeutung für das systematische Voranschreiten der Apoptose. Obwohl zahlreiche Berichte den

Caspasen eine Schlüsselrolle bei der Apoptose zuschreiben, gibt es einige Fälle, bei denen feststehende Veränderungen im Zellkern, die für diese Form des Zelltodes charakteristisch sind, unabhängig von einer Caspaseaktivität erfolgen können. Außerdem weisen einige Untersuchungen darauf hin, dass bestimmte Vorgänge im Zellkern, darunter auch die Chromatinkondensation und die DNA-Fragmentierung, gesondert gesteuert werden und von einer ständigen Energiezufuhr *in vivo* abhängen.
Nuc-1, ein Protein, das für die Zerlegung der DNA bei den Fadenwürmern *Caenorhabditis elegans* von wesentlicher Bedeutung ist, wirkt stromabwärts von *ced-3* und *ced-4* [Ellis und Horvitz, 1986]. In einigen Fällen scheint die Aufnahme apoptotischer Zellen durch Phagozyten für die Zerlegung der DNA erforderlich zu sein, was wiederum die Schlussfolgerung nahe legt, dass die Nuc-1-Nuklease möglicherweise von Phagozyten exprimiert werden kann. Hinzu kommt, dass Experimente mit kernlosen Zellen (Zytoplasten) gezeigt haben, dass bei einer Behandlung mit CD-95 (Apo-1/Fas) Antikörpern oder Staurosporin diese Zytoplasten morphologischen Veränderungen unterzogen wurden, die für die Apoptose charakteristisch sind und die durch eine Überexpression von Bcl-2 inhibiert werden konnten [Jacobsohn et al., 1994; Schulze-Osthoff et al. 1994]. Somit konnte gefolgert werden, dass das Vorhandensein des Zellkerns für den apoptotischen Zelltod oder für die zellschützende Wirkung des Bcl-2 nicht unbedingt erforderlich ist.
Zwischen der Caspaseaktivierung und den apoptotischen Vorgängen im Zellkern muss ein Zusammenhang bestehen, da eine Vielzahl von „Todesstimuli“ in der Lage ist, diese Proteasen zu aktivieren und die Signale an den Zellkern weiterzugeben. Durch die beiden hauptsächlichen Initiatorcaspasen (8 und 9) wird die Procaspase-3 gespalten und aktiviert. Dies führt zur Spaltung verschiedener Substrate, die an der Regulation von Zellkernveränderungen während der Apoptose beteiligt sind. In Zellen oder Organismen, denen es an Caspase-3 mangelte (z.B. Caspase-3-Knock-out-Mäuse, Woo et al., 1998], konnte keine charakteristische DNA-Fragmentierung und/ oder Chromatin-Kondensation nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass Caspase-3 eine entscheidene Rolle bei den apoptotischen Vorgängen im Zellkern spielt. Ungefähr 40 Caspase-Substrate können durch Caspase-3 gespalten werden [Nicholson, 1999]. Obwohl die meisten dieser Proteine im apoptotischen Prozess entbehrlich zu sein scheinen, gibt es mehrere Caspase-3-Substrate und zwei Caspase-6-Substrate, die die Zellkernveränderungen beeinflussen. Ein Beispiel ist die von Wyllie beschriebene Nuklease [1980], die die DNA in Fragmente spaltet, die einem ganzzahligen Vielfachen

von ungefähr 180 Basenpaaren entsprechen. Diese Nuklease ist jetzt als die von Caspasen aktivierte DNase (CAD) bekannt. Sie ist vorher in lebenden Zellen als ein inaktiver Komplex mit einer inhibitorischen Untereinheit vorhanden, die als ICAD bezeichnet wird [Enari et al., 1998]. Die Aktivierung der CAD erfolgt durch eine mit Hilfe der Caspase-3 vermittelten Spaltung der inhibitorischen Untereinheit, was zur Freisetzung und Aktivierung der katalytischen Untereinheit führt.

Die Poly-(ADP-Ribose)-Polymerase (PARP) [Lazebnick et al., 1994] und die DNA-abhängige Proteinkinase (DNA-PK) [Casciola-Rosen et al., 1996] sind zwei Proteine, die an der homöostatischen Aufrechterhaltung der genomischen Integrität beteiligt sind. Ihre Spaltung durch die Caspase-3 führt dazu, dass die DNA-Reparaturprozesse außer Kraft gesetzt werden.

Lamin [Rao et al., 1996] und NuMA (*nuclear-mitotic apparatus protein*) [Robertson et al., 2000] sind zwei Proteinsubstrate, die die strukturelle Integrität des Zellkerns aufrechterhalten. Während der Apoptose werden sie durch Caspase-6 gespalten, wodurch der Zerfall des Zellkerns beschleunigt wird. Sowohl Lamin als auch NuMA können auch durch andere Proteasen gespalten werden. So z.B. spaltet Caspase-3 das NuMA an Stellen, die sich von der Caspase-6 unterscheiden. Die Spaltung von Zytoskelettproteinen, wie z.B. von Fodrin und Gelsolin, führt zum Verlust der gesamten Zellform [Robertson et al., 2000].

Die meisten Procaspasen sind im Zytosol vorhanden. Es konnte aber gezeigt werden, dass Procaspase-2 auch im Zellkern lokalisiert ist [Colussi et al., 1998; Zhivotovsky et al., 1999]. Die biologische Bedeutung der intranukleären Lokalisierung der Procaspase-2 ist jedoch unklar. Procaspase-1 transloziert ebenfalls zum Zellkern, wo sie gespalten und aktiviert wird [Mao et al., 1998]. Die einzigen bekannten Substrate für Caspase-1 sind die Cytokine sowie das Pro-Interleukin-1β ,-18 [Cryns und Yuan, 1998] und die Phospholipase A2 [Luschen et al., 1998]. Es konnten jedoch auch hier keine intranukleären Substrate der Caspase-1 ermittelt werden.

Obwohl bedeutsame Fortschritte erzielt worden sind, um speziell die Beteiligung des Zellkerns am apoptotischen Zelltod zu definieren und zu charakterisieren, ist dieser Bereich immer noch relatives Neuland. Häufig ist es unklar, welche Proteinsubstrate gespalten werden müssen, um Zellkernveränderungen hervorzurufen.

2. Zielsetzung

Die Isoformen der Proteinkinase C sind im Zellkern vermutlich an der Zellproliferation, an der Differenzierung, an der neoplastischen Transformation und an der Apoptose beteiligt. Die Literatur zu diesem Thema ist allerdings sehr kontrovers, was wahrscheinlich auf die unterschiedlichen PKC-Isoformen, die verschiedenen Zelltypen und auf das Unvermögen zurückzuführen ist, zwischen zytosolischer, Plasmamembran-assoziierter und nukleärer PKC zu unterscheiden. Aus diesem Grunde soll im Rahmen dieser Arbeit ein zellkernspezifischer Inhibitor der Proteinkinase C hergestellt und charakterisiert werden. Es werden dabei zwei unterschiedliche Ansätze verfolgt: Zum einen sollen Fusionspeptide, die aus dem PKC-Inhibitor, Penetratin und dem nukleären Lokalisationssignal (NLS) bestehen, und zum anderen ein VP22-PKC-Inhibitor-Fusionsprotein hergestellt werden. Beiden Ansätzen ist gemeinsam, dass die Fusionsproteine sich wie ein „Trojanisches Pferd“ verhalten, durch dessen Hilfe der PKC-Inhibitor spezifisch in den Zellkern eindringen kann und dort auf die Proteinkinase C inhibierend wirken soll.