
Inhaltsverzeichnis

1	Einführung	5
1.1	Zellen reagieren spezifisch auf Signale aus ihrer Umgebung	5
1.2	Die Proteinkinase C Familie	6
1.2.1	Primärstruktur der Proteinkinase C Isoenzyme	6
1.2.2	Aktivierung von Proteinkinase C	8
1.2.3	Proteinkinase C in Differenzierung und Transformation	11
1.2.4	Isoenzym-Expression und subzelluläre Verteilung	12
1.2.5	Proteinkinase C Substrate	13
1.3	Entwicklung und Differenzierung von 32D Zellen	15
1.3.1	Entstehung der Blutzellen	15
1.3.2	Proteinkinase C-abhängige Differenzierung von 32D Zellen	16
1.4	Die Untersuchung differentieller Genexpression mit DNA Arrays	18
1.4.1	Die Herstellung verschiedener DNA-Array Typen	18
1.4.2	Das Prinzip der cDNA-Analyse	20
1.4.3	Einsatz von cDNA-Arrays in der aktuellen Forschung	22
1.4.3.1	Aufdecken neuer Signaltransduktionswege	22
1.4.3.2	Arzneimittelforschung und Therapieüberwachung	23
1.4.3.3	Diagnostik	24
2	Zielsetzung der Arbeit	25
3	Material	26
4	Methoden	29
4.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	29
4.1.1	Kultivierung von WEHI Zellen	29
4.1.2	Kultivierung prämyeloider Zellen	29
4.1.3	Kryokonservierung von Zellen	30
4.1.4	Bestimmung der Viabilität	30
4.1.5	Stimulierung der Zellen	31
4.2	Proteinchemische Methoden	31
4.2.1	Puffer und Lösungen für die Proteinchemie:	31
4.2.2	Isolierung rekombinanter GST-Fusionsproteine	32
4.2.2.1	Bestimmung des optimalen Erntezeitpunkts	32
4.2.2.2	Aufreinigung rekombinanter GST-Fusionsproteine	32
4.2.3	<i>In vitro</i> Kinasereaktion	33

4.2.4	Vorbereitung von Proteinproben	34
4.2.5	Proteinbestimmung	34
4.2.6	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	34
4.2.7	Färbung von Proteingelen	35
4.2.8	Western-Transfer von Proteinen	36
4.2.9	Immundetektion von geblotteten Proteinen	36
4.3	Molekularbiologische Methoden	37
4.3.1	Puffer und Lösungen	37
4.3.2	Reverse Transkription von mRNA	38
4.3.3	Polymerase-Kettenreaktion	38
4.3.4	Blunt-end Klonierung von PCR-Fragmenten	40
4.3.5	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	40
4.3.6	Dephosphorylierung von DNA	40
4.3.7	Phenolextraktion von DNA	41
4.3.8	Ethanol-fällung von DNA	41
4.3.9	Ligation von DNA	41
4.3.10	Filterdialyse von Ligationsansätzen	42
4.3.11	Transfektion von <i>E. coli</i> durch Elektroporation	42
4.3.12	Anlegen von bakteriellen Kryokonserven	43
4.3.13	Plasmidpräparation	43
4.3.14	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	44
4.3.15	Agarosegel-Elektrophorese	44
4.3.16	Isolierung cytoplasmatischer RNA	45
4.3.17	Aufreinigung von RNA aus wässriger Lösung	45
4.3.18	Northern Analyse	46
	4.3.18.1 Northern-Gele und Northern-Transfer	46
	4.3.18.2 Herstellung der Sonden	48
	4.3.18.3 Northern-Hybridisierung und Detektion der Signale	48
4.4	cDNA-Array	49
4.4.1	Isolierung von RNA für cDNA-Array Analysen	49
4.4.2	Synthese der cDNA-Sonden	49
4.4.3	Reinigung der cDNA-Sonden	50
4.4.4	Vorbereitung des Hybridisierungsansatzes	51
4.4.5	Hybridisierung der cDNA-Arrays	51
4.4.6	Scannen der Arrays	52
4.4.7	Auswertung der gescannten cDNA-Arrays	53

4.4.7.1	Analyse von einzelnen cDNA-Arrays	53
4.4.7.2	Analyse von cDNA-Array Versuchsreihen	53
4.5	TaqMan®-Analyse	54
4.5.1	Prinzip der quantitativen RT-PCR nach TaqMan®-Prinzip	54
4.5.2	Primer- und Sondendesign	55
4.5.3	Profil für die Durchführung der quantitativen RT-PCR	57
4.5.4	Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen	57
4.5.5	Bestimmung der differentiellen Expression einzelner Gene	58
4.5.6	Analyse der Daten	58
5	Ergebnisse	60
5.1	Überprüfung von DAP1, Diff6, PDI und TCTP auf ihre Phosphorylierbarkeit durch PKC	60
5.1.1	Klonierung von DAP1, Diff6 und TCTP	60
5.1.1.1	Reverse Transkription und PCR-Amplifikation	60
5.1.1.2	Klonierung der PCR-Produkte	61
5.1.1.3	Subklonierung der Gene in die Expressionsplasmide	62
5.1.2	Expression von GST-DAP1, GST-Diff6 und GST-TCTP	63
5.1.2.1	Bestimmung des optimalen Erntezeitpunkts	63
5.1.2.2	Aufreinigung der rekombinanten Proteine	64
5.1.3	<i>In vitro</i> Kinasereaktionen	65
5.2	Proteinkinase C regulierte Genexpression	67
5.2.1	Charakterisierung der verwendeten 32D Zelllinien	67
5.2.1.1	Differenzierung der Zellen durch Phorbolster	67
5.2.1.2	Bestätigung der PKC-Überexpression auf mRNA-Ebene	68
5.2.1.3	Bestätigung der PKC-Überexpression auf Proteinebene	70
5.2.2	Überprüfung ausgewählter Genexpressionen mit RT-PCR	71
5.2.3	Etablierung der cDNA-Array Untersuchungen	72
5.2.3.1	Überprüfung der RNA-Qualität auf cDNA-Array Ebene	72
5.2.3.2	Vergleich von Array-, Northernblot- und Westernblot-Untersuchungen	78
5.2.3.3	Identifizierung differentiell exprimierte Gene durch cDNA-Array Analyse	78
5.2.3.4	Adhäsionsmoleküle und Lipocortin 1	78
5.2.3.5	MAPKAPK2	81
5.2.4	Bestätigung der differentiellen Expression durch quantitative PCR nach reverser Transkription	83
5.2.4.1	Eignung der RNA für die quantitative RT-PCR	83
5.2.4.2	Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen	84

5.2.4.3	Quantifizierung der Expression von Lipocortin 1	87
5.2.4.4	Quantifizierung der Expression von MAPKAPK2	88
6	Diskussion	89
6.1	DAP1, Diff6, TCTP und PDI sind keine PKC-Substrate	89
6.2	PKC ϵ in 32D Zellen	90
6.3	Erhöhte TCTP-Expression in 32D PKC δ - und 32D PKC ϵ -Zellen	91
6.4	PKC-vermittelten Expression von Adhäsionsmolekülen	93
6.5	PKC-vermittelte Reduktion der Lipocortin 1-Expression	93
6.6	PKC-vermittelte Steigerung der MAPKAPK2-Expression	95
6.7	Veränderungen im Transkriptom von 32D Zellen durch die Überexpression von PKC	98
6.8	Möglichkeiten der Expressionsanalyse mit cDNA-Arrays	99
7	Zusammenfassung	102
8	Abstract	103
9	Literaturverzeichnis	104
10	Abkürzungsverzeichnis	119
11	Abbildungsverzeichnis	123
12	Lebenslauf und Veröffentlichungen	125
13	Danksagungen	126