

---

## 6 Diskussion

### 6.1 DAP1, Diff6, TCTP und PDI sind keine PKC-Substrate

Die Proteine DAP1, Diff6, PDI und TCTP konnten kloniert und in guter Ausbeute und Reinheit als GST-Fusionsproteine isoliert werden.

Diese Proteine sind von Dammeier als potentielle PKC $\delta$ - respektive PKC $\epsilon$ -Substrate identifiziert worden (Dammeier, 1999). Ihre Identifizierung gelang unter Verwendung von *in vivo* Phosphorylierungsreaktionen kombiniert mit zweidimensionaler Gelelektrophorese und massenspektrometrischen Untersuchungen.

In den *in vitro* Kinasereaktionen dieser Arbeit mit aufgereinigter aktiver PKC $\delta$  und PKC $\epsilon$ , sowie in Erweiterung der initialen Fragestellung auch mit PKC $\alpha$ , wurde jedoch keines der o.g. Proteine phosphoryliert. Zugleich wurde das Kontrollprotein MBP in Parallelversuchen gut phosphoryliert. Die Aktivität der PKC und die Auswahl geeigneter Versuchsbedingungen waren damit gewährleistet. In weiteren Kinaseansätzen wurde darüber hinaus MBP in Gegenwart der aufgereinigten Proteine eingesetzt. Auch hier erfolgte eine starke Phosphorylierung des Kontrollproteins, während DAP1, Diff6, PDI und TCTP nicht phosphoryliert wurden. Eine mögliche inhibitorische Verunreinigungen in den Proteinpräparationen konnte damit ausgeschlossen werden.

Hinsichtlich der Substrate kann weiter diskutiert werden, ob diese eine spezifische Modifikation oder Faltung benötigt hätten, die in *E. coli* nicht erfolgte. Bei PKC handelt es sich jedoch um sequenzspezifische Kinasen, die z.B. kurze Peptide, die ihrer Substratsequenz entsprechen, gut phosphorylieren (Nishikawa et al, 1997). Eine teilweise Auffaltung oder Nichtfaltung in *E. coli* würde daher eher zu einer verstärkten Phosphorylierung dieser Proteine führen.

Während eine Reihe von Proteinen *in vitro* durch PKC phosphoryliert werden, die keine *in vivo* Substrate sind, ist der umgekehrte Fall einer Phosphorylierung *in vivo*, nicht aber *in vitro* schwer vorstellbar. Zum Beispiel führt die *in vivo* i.d.R. weitaus niedrigere Konzentration von Enzym und Substrat hier zu einer höheren Spezifität der Reaktion als *in vitro*. Hinzu kommen *in vivo* Restriktionen durch spezifische Lokalisationen von Enzym und Substrat, die *in vitro* keinen Einfluss haben (Liu und Heckman, 1998; Mochly-Rosen et al., 1991; Staudinger et, al., 1995; Klauck et al., 1996). Darüberhinaus wurden die Phosphorylierungsversuche mit gleichen Mengen

---

Substrat und Kinase durchgeführt. Eine mögliche Phosphorylierung wäre somit erzwungen worden.

Damit bleiben zwei andere Erklärungen für die *in vitro* nicht erfolgende Phosphorylierung der o.g. Proteine durch PKC: Zum einen könnten die durch PKC *in vivo* phosphorylierten Proteine (Dammeier, 1999) in nur geringer Menge vorgelegen haben und zusammen mit einer größeren Menge eines anderen Proteins migriert sein. Bei einer Überlagerung dieser Spots in der zweidimensionalen Gelelektrophorese könnte dann die Sequenz des dominanten Proteins bestimmt worden sein, während die Sequenz des PKC-Substrats im Hintergrund untergegangen wäre.

Wahrscheinlicher ist es aber, dass es sich bei DAP1, Diff6, PDI und TCTP nicht um direkte Substrate von PKC handelt, sondern um Substrate von Kinasen, die unterhalb von PKC angeordnet sind. Für PDI ist z.B. eine Phosphorylierung durch die Tyrosinkinase Lyn (Donella-Deana et al., 1996) und die Serin- und Threoninphosphorylierung durch die Sphingosin-abhängige Kinase SDK2 (Megidish et al., 1999) bekannt. Die Versuchsbedingungen, die zur Identifizierung der o.g. potentiellen PKC-Substraten führten, beinhalteten eine zehnminütige Stimulierung mit PMA. Dies ließ neben den PKC-abhängigen Phosphorylierungen auch eine Reihe von nachgeordneten Phosphorylierungsereignissen zu. So erreicht z.B. die PMA-abhängige Aktivierung von MAPKAPK2, einem Enzym am unteren Ende der MAP Kinase Kaskade, bereits fünf Minuten nach Beginn der Stimulierung ihr Aktivitätsmaximum (Zu et al., 1996). Es ist daher anzunehmen, dass die o.g. und *in vitro* nicht durch PKC phosphorylierbaren Proteine *in vivo* durch PKC nachgelagerte Kinasen phosphoryliert wurden.

Zur Aufklärung der beteiligten Signalwege ist die transiente Expression der o.g. Proteine als myc-Tag-Konstrukte geplant. Die myc-Tag-Proteine können *in vivo* phosphoryliert und dann am myc-Tag in ausreichender Menge und Qualität für einen spezifischen Verdau und eine nachfolgende massenspektrometrische Analyse aufgereinigt werden. Aus der Kenntnis der Phosphorylierungsstellen können dann u.U. die zugehörigen Kinasen abgeleitet werden.

## **6.2 PKC $\epsilon$ in 32D Zellen**

Zur Expressionsanalyse von PKC $\epsilon$  wurden Westernblot-Untersuchungen mit den verschiedenen 32D Zelllinien durchgeführt. In diesen Versuchen konnte PKC $\epsilon$  in 32D

---

Zellen, nicht aber in den PKC $\delta$ -überexprimierenden 32D PKC $\delta$ -Zellen nachgewiesen werden. In den 32D PKC $\epsilon$ -Zellen zeigte sich das aufgrund der Überexpression von PKC $\epsilon$  in diesen Zellen erwartete starke Signal.

Für verschiedene PKC-Isoformen, wie z.B. PKC $\delta$ , kommt es zur Abnahme der Proteinexpression nach ihrer Aktivierung durch Phorbolester (Shih und Floyd-Smith, 1996). Die 32D PKC $\delta$ -Zellen zeigten jedoch auch ohne exogene Stimulierung kein PKC $\epsilon$ -Signal. Zudem wird stimulierte PKC $\epsilon$  nur langsam und nur partiell abgebaut (Borner et al., 1992). Eine Verminderung der PKC $\epsilon$ -Expression durch Degradation nach Aktivierung kann also ausgeschlossen werden.

Daneben sind Kreuzregulationen durch Interaktionen mit anderen PKC-Isoenzymen bekannt (Goode et al., 1995; Romanova et al., 1998). Neben einer Regulation der PKC-Expression auf der Proteinebene sind auch Veränderungen auf der mRNA-Ebene möglich. So wird die mRNA-Expression von PKC $\alpha$ , PKC $\beta$  und PKC $\delta$  in verschiedenen Blut- und Epithelzellen Phorbolester-induziert reguliert (Hooper et al., 1989; Assert und Pfeiffer, 1996; Shih und Floyd-Smith, 1996). In B Lymphomazellen ist die Regulation von PKC $\delta$  im Detail aufgeklärt: Hier führt die Überexpression von PKC $\alpha$  zu einer Steigerung der PKC $\delta$  mRNA-Expression und über diese zur Steigerung der PKC $\delta$  Proteinexpression (Romanova et al., 1998).

Die PKC $\epsilon$ -mRNA konnte in Northernblot-Untersuchungen lediglich in den 32D PKC $\epsilon$ -Zellen detektiert werden. Für 32D und 32D PKC $\delta$ -Zellen war auch bei langen Expositionszeiten kein Signal nachzuweisen. Damit war es nicht möglich Veränderungen in deren Expression zu detektieren und damit die Ebene der PKC $\epsilon$ -Regulation zu bestimmen. Die Ursache hierfür könnte in einer Kombination aus der großen Stabilität von PKC $\epsilon$  (Borner et al., 1992) und ihrer niedrigen Expression in 32D Zellen (Mischak et al., 1991a) liegen. Damit könnte eine geringe Notwendigkeit zur Neusynthese des Enzyms bestehen und so auch eine geringe Notwendigkeit für die Expression seiner mRNA. Bei dem Vergleich der PKC $\epsilon$ -Expression in den 32D Zellen und der Abwesenheit in den 32D PKC $\delta$ -Zellen wird jedoch eine PKC $\delta$ -abhängige Regulation von PKC $\epsilon$  sehr wahrscheinlich.

### **6.3 Erhöhte TCTP-Expression in 32D PKC $\delta$ - und 32D PKC $\epsilon$ -Zellen**

TCTP wurde zunächst als translationell kontrolliertes Protein in exponentiell wachsenden Leukämiezellen (Chitpatima et al., 1988) und als

---

wachstumsassoziiertes Protein in Ehrlich-Ascites Tumorzellen (Bohm et al., 1989) beschrieben. Bei der Analyse verschiedener Gewebe zeigt es sowohl eine transkriptionelle als auch eine translationelle Kontrolle (Thiele et al., 2000).

Seine weite Verbreitung über verschiedene Organismen und Gewebe spricht für die Ausübung von grundlegenden Stoffwechselfunktionen (Sanchez et al., 1997). Daneben wird eine Fehlsteuerung in der TCTP-Expression als möglicher Schritt in der Tumorentstehung vorgeschlagen (Chung et al., 2000).

In dieser Arbeit wurde für TCTP eine zehnfach verstärkte mRNA-Expression in den PKC $\delta$  und PKC $\epsilon$  überexprimierenden 32D Zellen gezeigt. Dies steht in guter Übereinstimmung mit der Phorbol-12-myristat-13-acetat-induzierten Steigerung der Proteinkonzentration von TCTP in menschlichen Makrophagen (Walsh et al., 1995). Die beobachtete Erhöhung der TCTP-Expression in Tumorzellen (Chung et al., 2000) und zumindest ein Teilschritt der Tumorentstehung könnte daher auf eine Fehlsteuerung der PKC-Aktivität in diesen Zellen zurückzuführen sein.

Die PKC-vermittelte Steigerung der Expression eines tumorassoziierten Gens gewinnt vor dem Hintergrund der Implikationen einzelner PKC-Enzyme in der Cancerogenese an Bedeutung. Während die Überexpression von PKC $\epsilon$  zur Ausbildung klassischer Parameter für eine onkogene Transformation führt (Mischak et al., 1993b), gibt es für PKC $\delta$  sowohl Anhaltspunkte für wachstumshemmende und differenzierungsinduzierende Effekte (Mischak et al., 1993a+b) als auch für tumorpromovierende (Li et al., 1996). Die Wirkungsweise von PKC $\delta$  und PKC $\epsilon$  sowie von TCTP in der Tumorentstehung und der exakte Signaltransduktionsweg für die TCTP-Expression muss daher weiter untersucht werden.

In diesem Zusammenhang ist der Einsatz von PKC-Inhibitoren in einer Reihe präklinischer und klinischer Untersuchungen zur Krebstherapie zu betrachten. Einzelne dieser Substanzen verhindern das Wachstum der Blutgefäße aus Rattenaorta-Präparationen (Krüger et al., 1998) und erhöhen die Apoptoseraten von kultivierten Krebszellen (Begemann et al., 1988). Andere Inhibitoren führen darüber hinaus bei akzeptabler Verträglichkeit zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes (Pollack et al., 1997). Die Inhibition von PKC durch ein Staurosporin-Analog führt dabei sowohl zur Verhinderung der Cytokin- und Interleukinproduktion als auch zu einer Reduktion von MAPK/ERK2 in den untersuchten Zellen der behandelten Krebspatienten (Thavasu et al., 1999). Eine Untersuchung der TCTP-Expression in diesen Zellen könnte weitere Hinweise auf die Funktion von TCTP liefern.

---

#### **6.4 PKC-vermittelten Expression von Adhäsionsmolekülen**

Der Prozess der Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten durch das Endothel lässt sich in drei Phasen teilen: Nach der Aktivierung der Zellen mit einem inflammatorischen Stimulus beginnen diese, zunächst locker durch Selektine gebunden, entlang der Gefäßwand zu rollen (Kansas, 1996). In der zweiten Phase kann es, vermittelt z.B. durch Chemokine und Chemoattraktoren wie Leukotriene, Interleukine und MCP-1 (Casale und Abbas, 1990; Yoshimura, 1987), zu einer festen Integrin-abhängigen Adhäsion kommen (Newton et al., 1997b). In der dritten Phase kommt es nach der Aktivierung ein- und auswärts gerichteter Signaltransduktionswege (Wahl et al., 1996) zur Emigration der neutrophilen Granulozyten durch die Endothelwand in das dahinter liegende Gewebe.

Für PKC $\delta$ -überexprimierende 32D Zellen konnte nach PMA-Zugabe innerhalb von vier Stunden eine breite Adhäsion gezeigt werden. Die 32D und 32D PKC $\epsilon$ -Zellen zeigten dagegen unverändert keine oder nur unbedeutende Adhäsionsneigungen. In den cDNA-Array Untersuchungen konnten jedoch für keine der drei untersuchten Zelllinien signifikante Steigerung in der mRNA-Expression für die gespotteten Adhäsionsmoleküle gezeigt werden. Dabei muss zunächst beachtet werden, dass nur ein kleiner Anteil der bekannten Sequenzen für Adhäsionsmoleküle auf den Array gespottet war und die relevanten Gene daher u.U. nicht auf dem Array vorhanden waren. Vor allem muss aber berücksichtigt werden, dass die durchgeführten Untersuchungen darauf ausgelegt waren, die initiale Genexpression, d.h. die im ersten Schritt gebildete mRNA, zu untersuchen. Eine nachgelagerte Induktion der Expression von Adhäsionsmolekülen, z.B. durch im weiteren Verlauf gebildete oder aktivierte Transkriptionsfaktoren, ist nicht ausgeschlossen und kann im weiteren durch Zeitreihenuntersuchungen geklärt werden. Daneben bieten auch der Einsatz von Arrays mit einer größeren Breite an Adhäsionsmolekülen und die immuncytochemische Analyse der Zellen Ansätze zur Klärung dieser Frage.

#### **6.5 PKC-vermittelte Reduktion der Lipocortin 1-Expression**

Lipocortin 1, auch als Annexin I bezeichnet, gehört zu einer Familie kalziumabhängiger Proteine. Die Mitglieder dieser Familie haben Funktionen wie die Bildung von Kalziumkanälen, die Steuerung des Vesikeltransports in Exo- und Endocytose und die Inhibition von Phospholipase A2 (Raynal und Pollard, 1994; Liemann und Huber, 1997; Moss, 1995).

---

In dieser Arbeit wurde in cDNA-Array-Untersuchungen die PKC-abhängige Verminderung der Lipocortin 1-mRNA in promyeloiden Maus 32D Zellen gezeigt. Diese Verminderung erfolgt innerhalb von 30 min und konnte in quantitativen RT-PCR-Experimenten bestätigt werden.

Die Betrachtung von Lipocortin 1 als entzündungshemmende Komponente liefert eine mögliche Funktion für die PKC-vermittelte Verminderung der Lipocortin 1-mRNA in 32D Zellen. Diese Reduktion könnte die Immunreaktion gegen bakterielle Infektionen initiieren: In RAW 264.7 Makrophagen führt eine Überexpression von Lipocortin 1 zunächst zur konstitutiven Aktivierung des MAPK/ERK-Wegs. Diese Signaltransduktion wird nach Exposition der Zellen mit bakteriellen Lipopolysacchariden jedoch rasch herunterreguliert. Dagegen zeigt der MAPK/ERK-Weg in Makrophagen mit verminderter Expression von Lipocortin 1 eine verlängerte Aktivität (Alldridge et al., 1999). Diese verlängerte Aktivität des MAPK/ERK-Wegs könnte u.a. zur kontinuierlichen Aktivierung der im nächsten Kapitel diskutierten MAPKAPK2 (Stokoe et al., 1992; Chevalier et al., 2000) und damit zur Inflammationssteigerung führen.

Das anti-inflammatorische Peptid aus den N-terminalen Aminosäuren 2-26 von Lipocortin 1 inhibiert darüberhinaus *in vitro* die Adhäsion von Neutrophilen an fMLP-stimulierte Endothelzellen (Perretti et al., 1995). In *in vivo* Versuchen führt dasselbe Peptid sowie rekombinantes humanes Lipocortin 1 zu einer mehr als 50 %-igen Reduktion der Neutrophilenadhäsion an das Endothel. Gleichermaßen wird die Emigration der neutrophilen Granulocyten in das darunterliegende Gewebe reduziert. Zusätzlich kommt es hier zu einer Ablösung bereits adhärerter neutrophiler Granulocyten (Lim et al., 1998). Die Verminderung von Lipocortin 1 allein hat allerdings keinen direkten, adhäsionssteigernden Effekt auf die 32D Zellen. In den mit Phorbol ester stimulierten 32D Zellen und den 32D PKC $\epsilon$ -Zellen, in denen es ebenfalls zu einer deutlichen Reduktion der Lipocortin 1-Expression kam, wurde keine wesentliche Steigerung der Adhäsion festgestellt. Die Suche nach den Adhäsions-vermittelnden Komponenten muss daher wie in Kapitel 6.3 vorgeschlagen fortgesetzt werden.

Die Verminderung von Lipocortin 1 kann also eine Voraussetzung für die Immunreaktion der 32D PKC $\delta$ -Zellen darstellen, indem sie deren Aktivierung über den MAP Kinase Weg verstärkt und indem sie die Adhäsion der differenzierten Zellen zulässt (Perretti et al., 1995). Die Differenzierung der Zellen und ihre Aktivierung durch Phorbol ester läuft in diesem Modell parallel zueinander ab.

---

In humanen U937-Zellen führt Phorbol ester dagegen zu einer Erhöhung der Lipocortin 1-Expression mit einem Maximum bei zwei Tagen (Kang et al., 1996). Außerdem kommt es in diesen Zellen bei der Überexpression von Lipocortin 1 zu einer Verstärkung der TNF $\alpha$ -vermittelten Apoptose (Canaider et al., 2000). Diese Unterschiede könnten zelltypspezifische Ursachen haben. So zeigt die humane Makrophagen Zelllinie U937 im Gegensatz zu den 32D Zellen z.B. eine starke PKC $\alpha$ -Expression (Strulovici et al., 1989).

## 6.6 PKC-vermittelte Steigerung der MAPKAPK2-Expression

In mRNA-Expressionsuntersuchungen mittels cDNA-Array und quantitativer RT-PCR wurde der Einfluss von PKC $\delta$  und PKC $\epsilon$  auf die Expression verschiedener zur MAP Kinase Kaskade gehörender Enzyme untersucht. Während sich die Expression der meisten untersuchten Enzyme nicht veränderte, kam es für MAPKAPK2 zu einer PKC-abhängigen Steigerung der Expression. Dies konnte vor allem in den PMA-stimulierten 32D, 32D PKC $\delta$ - und 32D PKC $\epsilon$ -Zellen, aber auch in den unstimulierten 32D PKC $\delta$ -Zellen gezeigt werden. Die Regulation der Enzyme der MAP Kinase Kaskade über ihren Phosphorylierungszustand ist ausführlich untersucht (Engel et al., 1995a; Seger und Krebs, 1995; Obata et al., 2000; Abbildung in Kapitel 1.1). Eine Regulation der mRNA-Expression von MAPKAPK2, die in dieser Arbeit gezeigt wird, ist dagegen bisher nicht publiziert.

MAPKAPK2 wurde ursprünglich als eine ausschließlich durch ERK phosphorylierte Kinase identifiziert (Strokoe et al., 1992). Neuere Untersuchungen zeigen aber ihre Phosphorylierung durch p38/MAPK *in vivo* (Ham et al., 1994; Lee et al., 1994). Eine Inhibition des MAPK/ERK-Wegs auf der Ebene von MEK führt dabei zu einer Blockierung der PMA-induzierten Aktivierung von MAPKAPK2. Die Inhibition des p38/MAPK-Wegs durch eine Blockierung von p38/MAPK inaktiviert MAPKAPK2 dagegen vollständig (Chevalier und Allen, 2000). MAPKAPK2 ist also unterhalb von p38/MAPK angeordnet und wird zusätzlich MAPK/ERK-abhängig aktiviert. Ihre Aktivierung durch p38/MAPK und indirekt über MAPK/ERK erfolgt über Serin- und Threonin-Phosphorylierung. Dabei wird *in vitro* ein Threoninrest innerhalb der katalytischen Domäne und ein zweiter innerhalb der carboxyterminalen autoinhibitorischen  $\alpha$ -Helix-Domäne phosphoryliert (Engel et al., 1995a, Chevalier und Allen, 2000).

Zu den extrazellulären Signalen, die schließlich zu einer MAPKAPK2-Aktivierung führen, gehören zunächst hämatopoetische Faktoren wie CSF-1, GM-CSF oder IL-3

---

(Foltz et al., 1997). Mit CSF-1 wird MAPKAPK2 also durch einen Faktor aktiviert, der auch die Differenzierung von 32D Zellen zu einem Makrophagen-Phänotyp induziert. Daneben führen auch Hitzeschock oder TNF $\alpha$  zu ihrer Aktivierung (Engel et al., 1995b). Genauer untersucht ist die von Tyrosinkinasen abhängige Stimulierung durch IL-6 und die Ras-abhängige Stimulierung durch IL-3 und G-CSF. Darüber hinaus bewirken aber auch das als chemotaktischer Faktor wirkende Tripeptid fMLP und PMA (Zu et al., 1996) eine MAPKAPK2-Aktivierung, während PKC-Inhibitoren wie z.B. Ro31-8220 ihre Aktivierung vermindern (Schultz et al., 1997a).

Aktivierte MAPKAPK2 wirkt über die Phosphorylierung verschiedener Komponenten auf die Organisation des Cytoskeletts ein. Hierzu gehören u.a. das Intermediärfilamentprotein Vimentin (Ben-Levy, 1998) und die F-Actin bindenden Proteine LSP1 und Hsp27 (Huang et al., 1997). Daneben phosphoryliert MAPKAPK2 auch die regulatorische Kette von Myosin II und könnte so deren Aktin-abhängige ATPasefunktion regulieren (Kommatsu und Hosoya, 1996).

MAPKAPK2 ist eines der zentralen Moleküle in der Einleitung der Immunreaktion. Ihre Funktion besteht in der Phosphorylierung von Effektorproteinen und einer veränderten Protein- und Signalmolekülexpression. Dabei wird die mRNA-Stabilität, die zu der schnellen und starken Genexpression in entzündlichen Reaktionen beiträgt, durch MAPKAPK2 erhöht. Daraus resultiert z.B. eine gesteigerte Expression der mRNA für Interleukin-6 und Interleukin-8 (Winzen et al., 1999). Hinzu kommt die MAPKAPK2-abhängige Phosphorylierung und Aktivierung von 5-Lipoxygenase (Werz et al., 2000), die die initialen Schritte in der Synthese der Leukotriene katalysiert und damit wesentlich zur Einleitung entzündlicher Reaktionen beiträgt. Die MAPKAPK2-Aktivität ist darüber hinaus auch zur Bildung von TNF $\alpha$  notwendig (Kotlyarov et al., 1999).

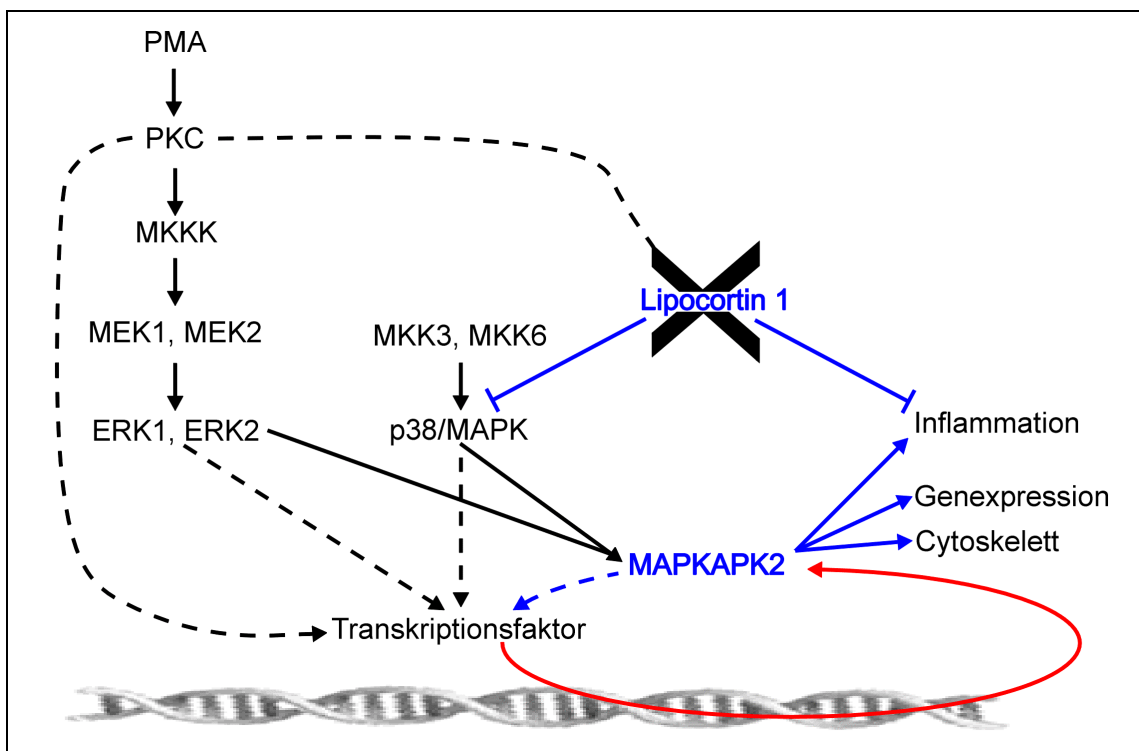
Über phorbolsterinduzierte und p38/MAPK-vermittelte Wege wird z.B. der Initiationsfaktor eIF4E phosphoryliert und damit aktiviert (Wang et al., 1998b). Daneben phosphoryliert MAPKAPK2 das „cAMP response-element binding protein“ (CREB) und kontrolliert die Genexpression auch über die Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren wie ATF-1 oder SRF (Tan et al., 1996; Heidenreich et al., 1999).

Die Aktivierung von MAPKAPK2 und die Einleitung der Immunreaktion sowie die Induktion differenzierungsspezifischer Gene sind also gut miteinander korrelierbar. In dieser Arbeit wurde dabei gezeigt, dass es neben der PKC-abhängigen Aktivierung



der MAPKAPK2 auch zu deren stärkeren mRNA-Expression kommt. Durch diese Erhöhung könnte über die vermehrte Bildung von aktivierbarem Enzym eine weitere Verstärkung der MAPKAPK2-abhängigen Signale erreicht werden. Weiterhin führt auch die im vorangegangenen Kapitel diskutierte Depletion von Lipocortin 1 zu einer kontinuierlichen Aktivität des MAPK/ERK-Wegs (Alldridge et al., 1999) und so zu einer kontinuierlichen Aktivierung von MAPKAPK2 (Strokoe et al., 1992; Chevalier und Allen, 2000). Die Steigerung der MAPKAPK2-Expression und die Aktivierung des gebildeten Enzyms erfolgen somit synergetisch zueinander.

Die abgestimmte Expression von Enzymen, die für verschiedene Aufgaben innerhalb eines zellulären Prozesses verantwortlich sind, ist ein häufig wiederkehrendes Prinzip und ist auch auf globaler Ebene belegt (Winkles, 1998). Auch die gleichzeitige Regulation der Lipocortin 1- und der MAPKAPK2-Expression spricht für eine gemeinsame Funktion auf zellulärer Ebene. Die folgende Abbildung zeigt ein Modell für die Interaktion von Lipocortin 1 und MAPKAPK2 in aktivierten 32D Zellen.



**Abb 6.1 Modell für die PMA-induzierte Aktivierung und Expression von MAPKAPK2.**

Die Verbindungen zwischen den einzelnen Komponenten stellen die Aktivierungen und Inhibitionen dar. Gestrichelte Pfeile stehen dabei für mögliche Signalwege, die in zukünftigen Versuchen untersucht werden sollen. Der rote Pfeil steht für eine Steigerung der MAPKAPK2-Expression. Die Identität des für die MAPKAPK2-Expression verantwortlichen Transkriptionsfaktors ist nicht bekannt. Die benutzten Abkürzungen stehen für extracellular-regulated kinase (ERK), MAP kinase (MAPK), MAP kinase activated protein kinase 2 (MAPKAPK2), mitogen-activated ERK-activating kinase (MEK), MAP kinase kinase (MKK).

---

Versuche mit spezifischen Inhibitoren für PKC und einzelne Komponenten der MAP Kinase Kaskade weisen bereits auf eine mögliche Aufspaltung dieses Signalwegs unterhalb von PKC hin (Schultz et al., 1997a). Die Fragestellung für zukünftige Untersuchungen ist daher, ob die PKC-vermittelte MAPKAPK2-Expression entlang der MAPK Kaskade oder über einen weiteren Signaltransduktionsweg stimuliert wird. Dies wird sich durch Expressionsanalysen für MAPKAPK2 mit den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien in der Gegenwart von spezifischen MAP Kinase-Inhibitoren beantworten lassen. Hier wird es insbesondere möglich sein zwischen einer Signaltransduktion über den MAPK/ERK2-Weg und den p38/MAPK-Weg zu unterscheiden.

Die verstärkte Signaltransduktion über MAPKAPK2 führte hierbei nicht direkt zur Ausbildung des makrophagenähnlichen Phänotyps. Die MAPKAPK2-Expression in den stimulierten 32D PKC $\delta$  und 32D PKC $\epsilon$  Zellen war vergleichbar hoch. Eine im Phänotyp manifestierte Differenzierung durch die Stimulierung mit Phorbol ester findet aber nur in den 32D PKC $\delta$  Zellen statt (Mischak et al., 1993; Kapitel 5.2.1.1). Ähnliche Ergebnisse zeigt auch die Behandlung von Phorbol ester-stimulierten HL-60 Zellen mit einem spezifischen p38/MAPK Inhibitor. Diese Zellen erwerben eine Makrophagen-ähnliche Morphologie, während die anhand der Hsp27-Phosphorylierung gemessene MAPKAPK2-Aktivität blockiert ist (Schultz et al., 1997b). Die Aktivierung und Differenzierung der Zellen läuft daher wahrscheinlich parallel zueinander ab.

## **6.7 Veränderungen im Transkriptom von 32D Zellen durch die Überexpression von PKC**

Der Einsatz von PKC $\delta$ - und PKC $\epsilon$ -überexprimierenden 32D Zellen zeigte, dass die mRNA für TCTP, Lipocortin 1 und MAPKAPK2 PKC-abhängig reguliert werden. Dabei zeigten die PKC-überexprimierenden Zellen relativ zu den 32D Zellen allerdings schon ohne Stimulierung durch Phorbol ester signifikante Änderungen in der Expression dieser Gene.

Es ist daher zu vermuten, dass es aufgrund basal vorhandener PKC-stimulierender Komponenten ständig zu einer Aktivierung einzelner PKC-Enzyme kommt. Durch ihre hohe Expression in den 32D PKC $\delta$ - und in den 32D PKC $\epsilon$ -Zellen könnte es daher bei einem unverändert kleinen Anteil gleichzeitig zu einer großen Menge aktivierter PKC kommen. Hierauf weist auch die starke Präsenz der einzelnen PKCs in der partikulären Fraktion PKC-überexprimierender 32D Zellen hin (Mischak et al.,

---

1993). Diese deutet auf eine Membranassoziation und damit möglicherweise auf eine Aktivierung hin. Es könnte daher in den PKC-überexprimierenden Zellen partiell bereits eine PKC-abhängige Signaltransduktion erfolgen, ohne dass exogen stimuliert wird.

Für weitere Untersuchungen bietet sich daher die Generierung und der Einsatz von niedrig überexprimierenden Klonen an, in denen es ohne Stimulierung zu keiner Aktivierung PKC-abhängiger Signaltransduktion und Genexpression kommt. Nach immunchemischer Vorselektion könnte die cDNA-Array Technologie einen wichtigen Beitrag zur Auswahl dieser Klone leisten. Sie bietet die Möglichkeit, Expressionsanalysen auf einer globalen Ebene durchzuführen und liefert damit die nötige Datenbreite.

Alternative Ansätze sind der Einsatz von dominant negativen, Kinase-Inaktiven PKCs oder die Generierung von PKC knock out Zellen.

## **6.8 Möglichkeiten der Expressionsanalyse mit cDNA-Arrays**

Es ist weithin akzeptiert, dass die Sequenzierung vollständiger Genome wichtige und grundlegende Informationen über die untersuchten Organismen bereitstellt. Der Aufbau und die Funktion der einzelnen Zellen sowie der aus ihnen gebildeten Organismen wird aber durch die koordinierte Expression von einzelnen Genen und Gengruppen gesteuert. Der Phänotyp der einzelnen Zelle ist demzufolge bestimmt von der spezifischen Synthese einzelner mRNAs und deren Translation in Proteine. Auf der Stufe der Proteine kommen hier vielfach posttranslationelle Modifikationen hinzu (Cazaubon et al., 1994; Snow und Hart, 1998; Meek, 1998).

In der vorliegenden Arbeit ist eine Transkriptomanalyse mit cDNA-Array- und PCR-basierten Methoden durchgeführt worden. Die Grenzen dieser Methoden sind offensichtlich: Aus den bekannten Nukleinsäuresequenzen können zwar potentielle und bekannte Stellen posttranslationeller Modifikationen abgelesen werden, nicht aber deren tatsächliche Modifikation vorhergesagt werden.

Diese Aussagen bleiben der Proteomanalyse, vor allem auf der Grundlage der zweidimensionalen Elektrophorese, vorbehalten (O'Farrell, 1975; Anderson und Anderson, 1996). Hier können Modifikationen, die in einer Ladungs- oder Größenänderung resultieren, über ein verändertes Laufverhalten der Proteine detektiert werden (Sanchez et al., 1997). Dabei bereitet allerdings die Detektion gering exprimierter Proteine derzeit noch Schwierigkeiten. So findet sich z.B. unter

---

150 durch zweidimensionale Elektrophorese untersuchten Hefe-Proteinen keines mit einem „codon bias“ Wert unter 0,1, einem arbiträr definierten Wert, der auf eine geringe Häufigkeit hinweist (Gygi et al., 1999). Umgekehrt zeigen Berechnungen, dass mehr als die Hälfte der 6.000 Hefegene einen „codon bias“ Wert von unter 0,1 haben (Goffeau et al., 1996). Ein Großteil dieser Proteine würde ohne eine vorherige Fraktionierung und Anreicherung daher wahrscheinlich nicht detektiert werden.

Hier liegen die Vorteile der cDNA-Array-Methode in einer Kombination aus der Anzahl untersuchbarer Gene und der Toleranz hoher Signalunterschiede. So wird es in naher Zukunft möglich sein, z.B. das gesamte humane Genom auf einem einzelnen Array abzubilden. Dabei werden unter günstigen Bedingungen Zielsequenzen mit bis zu 300.000-fachem Expressionsunterschied detektiert (Lockhart et al., 1996; Johnston et al., 1998). Damit wird es möglich, die globale mRNA-Expression zu analysieren und komplexe Regulationswege aufzuklären resp. zu bestätigen (Winkles, 1998).

Reine Expressionsanalysen durch cDNA-Arrays erlauben dabei keine direkte Aussage über die unmittelbare Ursache von Veränderungen in der gemessenen mRNA-Expression. Diese kann zunächst durch eine Veränderung der Transkription begründet sein, daneben sind aber auch eine mRNA-Stabilisierung oder eine verstärkte mRNA-Degradation möglich. Um Fragestellungen dieser Art beantworten zu können, sind zusätzlich „nuclear run off“-Versuche sowie Versuche in der Gegenwart von Inhibitoren der mRNA-Synthese notwendig (Romanova et al., 1998).

Schließlich muß auch beachtet werden, dass mRNA-Expression und Proteinexpression nicht linear gleichgesetzt werden können. So zeigen Anderson und Seilhamer einen Korrelationskoeffizienten von unter 0,5 für eine Gruppe von Genprodukten in menschlicher Leber (Anderson und Seilhamer, 1997). Diese Untersuchung wurde jedoch an einer Gewebeprobe in einem statischen Zustand durchgeführt. Die beobachteten Unterschiede sind wahrscheinlich auf die verschiedenen Halbwertszeiten der einzelnen mRNAs sowie auf Stabilitätsunterschiede von mRNA und Protein zurückzuführen.

In dieser Arbeit wurde eine qualitative Korrelation von cDNA-Array-, Northernblot- und Westernblot-Untersuchungen für PKC $\delta$  und PKC $\epsilon$  beobachtet. Andere cDNA-Array-Studien zeigen darüberhinaus bei einem Vergleich unterschiedlich behandelter Krebszellen eine gute Korrelation in der mRNA- und Proteinexpression differentiell regulierter Gene (Hilsenbeck et al., 1999). Daneben können mRNA-Untersuchungen

---

auch zur direkten Charakterisierung von Zellen oder Geweben eingesetzt werden. So gelingt es z.B. anhand der Arraydaten, zwischen unterschiedlichen Leukämieformen zu unterscheiden (Golub et al., 1999). Untersuchungen an normalem und cancerogenem Colongewebe zeigen ebenfalls eine klare Zuordnung von normalen und Tumorzellen. Daneben sind auch klare Unterscheidungen zwischen Zelllinien und Gewebeproben möglich (Alan et al., 1999).

Expressionsanalysen auf der Transkriptom- und Proteomebene sind keine konkurrierenden sondern vielmehr ergänzende Verfahren. Ihre volle Leistungskraft werden beide Methoden bei einer Zusammenführung und gegenseitigen Ergänzung der gewonnen Daten entfalten.