
Proteinkinase C in der Signaltransduktion promyeloider 32D Zellen

**Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
am Fachbereich für Biologie, Chemie und Pharmazie
der Freien Universität Berlin**

vorgelegt von

Olaf Schäfer
aus Göttingen

November 2000

angefertigt am

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin
Abteilung Proteinchemie
Berlin

und am

National Cancer Institute
Laboratory of Genetics
am National Institute of Health
Bethesda, Maryland, USA

Erstgutachterin: Frau Prof. Dr. B. Wittmann-Liebold

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. F. Hucho

Datum der Disputation: 15. Januar 2001

7 Zusammenfassung

Die Enzyme der Proteinkinase C Familie bilden eine Gruppe von Serin/Threonin-Kinasen. Sie erfüllen wichtige Aufgaben in der Signaltransduktion bei Zellwachstum, Differenzierung, Immunreaktion und Cancerogenese. Für die Aufklärung ihrer Funktion ist es gleichermaßen wichtig, die einzelnen PKC-Substrate zu identifizieren und die Auswirkung einer PKC-Aktivierung auf zellulärer Ebene zu analysieren.

Die Proteine DAP1, Diff6, TCTP und das PDI-Homologe werden *in vivo* nach einer Stimulierung mit dem PKC-Aktivator Phorbol ester phosphoryliert. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob diese Proteine PKC-Substrate sind.

Während PDI bereits als aufgereinigtes GST-Fusionsprotein vorlag, waren für die anderen potentiellen PKC-Substrate weder aufgereinigtes Protein noch die cDNAs zugänglich. Diese cDNAs wurden daher zunächst aus Maus 32D Zellen kloniert und in GST-Expressionsplasmide überführt. Nach ihrer Expression und Reinigung wurden alle Proteine in *in vitro* Kinasereaktionen mit PKC δ und PKC ϵ sowie, in Erweiterung der Aufgabenstellung, mit PKC α eingesetzt. Dabei wurde gezeigt, dass die o.g. Proteine keine Substrate dieser PKCs sind, sondern wahrscheinlich Substrate tiefer stehender Kinasen.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden die nachgelagerten Effekte der PKC-Aktivierung in den promyeloiden 32D Zellen betrachtet. Hierzu wurden die PKC-abhängigen Veränderungen im Transkriptom der Zellen untersucht.

Dabei wurde zunächst eine negative Regulation der PKC ϵ -Expression in 32D Zellen durch PKC δ festgestellt. Für das tumorassoziierte Protein TCTP trat daneben eine deutliche Steigerung der mRNA-Expression sowohl in den 32D PKC δ - als auch in den 32D PKC ϵ -Zellen auf. Weiterhin wurde die mRNA für das antiinflammatorische Protein Lipocortin 1 in 32D Zellen durch PKC δ und PKC ϵ stark herunterreguliert. Bei der Untersuchung verschiedener Mitglieder der MAP Kinase Kaskade zeigte sich dagegen eine PKC-abhängige Erhöhung der mRNA-Expression für MAPKAPK2.

Durch die Depletion von Lipocortin 1 kann es dabei zu einer dauerhaften Aktivierung des MAPK/ERK Wegs und zur Steigerung entzündlicher Reaktionen kommen. Die PKC-vermittelte Expressionssteigerung von MAPKAPK2 zusammen mit ihrer gleichzeitigen Aktivierung könnte dabei zur Einleitung von Differenzierung und Immunreaktion in den 32D Zellen beitragen.

8 Abstract

Protein kinase C forms a group of Serine/Threonine kinases. The members of this family execute important tasks in the signal transduction in growth, differentiation, immune response and cancer. To properly assess their functions it is important to look at both, the PKC substrates and the impact of PKC activation on the intra cellular environment.

The first part of this work elucidated the role of the potential PKC substrates DAP1, Diff6, PDI and TCTP. *In vivo* all of them are phosphorylated after stimulation with the PKC activator phorbol ester.

While GST-PDI was available as a purified fusion protein, neither protein nor cDNA was available of the other proteins. So the cDNA of DAP1, Diff6 and TCTP was cloned out of mouse 32D cells and subcloned into expression plasmids containing the gene for GST. After expression and purification, all of the proteins were used in *in vitro* kinase assays. Here, all of them proved not to be substrates of PKC δ , PKC ϵ or PKC α . On the contrary these proteins are probably substrates for other kinases downstream of PKC.

The second part dealt with the downstream effects of the PKC activation in promyelocytic mouse 32D cells. Here changes in the transcriptome of the cells were analyzed on a global basis.

First PKC δ was shown to downregulate PKC ϵ in the 32D PKC δ cells. The mRNA for the translationally regulated tumor protein TCTP on the other side was upregulated in both, 32D PKC δ and 32D PKC ϵ cells. In cDNA-Array studies other PKC regulated mRNAs were identified and proved by quantitative RT-PCR, consequently. The mRNA for the anti inflammatory protein Lipocortin 1 was downregulated by PKC δ and PKC ϵ . Of several members of the MAP kinase pathway, one, the mRNA of MAPKAPK2 was shown to be upregulated by the tested PKCs.

The depletion of Lipocortin 1 could lead to a continually activated MAPK/ERK signaling and increased inflammation. Therefore the PKC dependent upregulation of MAPKAPK2 and its simultaneous activation might develop a synergistic effect. This could be a step towards the coordinated induction of differentiation and immune response in the 32D cells.

10 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Microliter
A	Alanin
A	Ampere
AcOH	Essigsäure
AKAP 79	a kinase anchoring protein
aPKC	atypische PKC
APS	Ammonium Peroxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
B	Basen
BAP	bakterielle alkalische Phosphatase
BCA	bicinchoninic acid
Bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumine
c	Konzentration
C	Cytosin
cDNA	komplementäre DNA
CFU-GEMM	colony-forming unit granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte
CFU-GM	colony-forming unit granulocyte macrophage
cPKC	konventionelle PKC
cpm	counts per minute
CSF-1	colony stimulating factor-1
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerol
DAP1	death associated protein 1
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DEPC	Diethyl-Pyrocyanat
DMSO	Dimethyl-Sulfoxid
DNA	desoxy ribonucleic acid (Desoxyribonucleinsäure)
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
EGF	epidermal growth factor
EGTA	Ethylenglykol-N,N,N',N'-tetraacetat
eIF4E	eucaryotic initiation factor 4E
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extracellular regulated protein kinase
FAM	6 – Carboxy - Fluorescein
FKS	fötales Kälberserum
fMLP	formyl-Methionin-Leucin-Prolin
g	Erdbeschleunigung
G	Guanosin

GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GM-CSF	granulocyte macrophage colony stimulating factor
GSK-3 β	glykogensynthase kinase-3 β
GTP	Guanosintriphosphat
GTPasen	Guanosintriphosphatase
h	Stunde
HL60	human leukaemia 60
Hsp27	heat shock protein 27
IL	Interleukin
IP ₃	Inositol-1,4,5-trisphosphat
IPTG	Isopropylthio- β -D-Galactosid
kB	Kilobasen, Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
l	Liter
LAN	Linker Arm Nukleotid (Thymidin mit C ₆ -Linker)
LAN-TAMRA	LAN –Carboxy-tetramethyl-rhodamin
LB	Luria Bertani
LSP1	lymphocyte specific protein 1
m	milli
M	molar
MAP	mitogen-activated protein
MAP Kinase Kaskade	mitogen-activated protein kinase kaskade
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MAPKAPK2	mitogen-activated protein kinase activated protein kinase 2
MAPKK	mitogen-activated protein kinase kinase
MAPKKK	mitogen-activated protein kinase kinase kinase
MARCKS	myristoylated alanin-rich C kinase substrate
MBP	myelin basic protein
MCP-1	monocyte chemotactic protein 1
mg	Milligramm
MEK	mitogen-activated ERK-activating kinase
min	Minute
MKK	MAP kinase kinase
ml	Milliliter
mRNA	messenger RNA
MW	Molekulargewicht
n	nano
ng	Nanogramm
NGF	nerval growth factor
NIC	National Cancer Institute
NIH	National Institute of Health
NIH 3T3	NIH 3T3 fibroblasts
nPKC	neue Proteinkinase C
NTP	Desoxy-Nukleosidtriphosphat
OD	optische Dichte
p	piko
p38 MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase

p53	53 kDa Protein
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PBS-PI	PBS mit Proteaseinhibitoren
PC	Phosphatidylcholin
PC12	pheochromocytoma cells clone 12
PCR	polymerase chain reaction
PDGF	platelet derived growth factor
PDI	protein disulfide isomerase
PE	Perkin Elmer
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PH	pleckstrin homology domain
PI	Phosphatidylinositol
PIP	Phosphatidylinositolphosphat
PIP ₂	Phosphatidylinositol-bisphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3-4-5-phosphat
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PLA	phospholipase A
PLC	phospholipase C
PLD	phospholipase D
PM	Plasmamembran
PMA	Phorbolmyristolat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PS	Phosphatidylserin
PS	Phosphatidylserin
RACKs	receptors for activated C kinases
RAW	Maus Makrophagenlinie
RNA	ribonucleic acid
RNase	Ribonuklease
Ro31-8220	Roche Substanz Nummer 31-8220
rpm	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
SDK2	sphingosine dependent kinase 2
SDS 7700	Sequence Detection System 7700
SDS PAGE	Sodiumdodecyl-Polyacrylamid Gelelektrophorese
sec	Sekunde
SEM	standard error mean
SP	Signalpeptidomäne
SRF	serum response factor
ssDNA	single strand DNA
T	Thymidin
TAMRA	6 –Carboxy-tetramethyl-rhodamin
TBS-T	Tris-buffered solution with Triton
TCTP	translationell associated tumor protein
TE	Tris-EDTA

TEMED	N, N, N', N',-tetramethylethylendiamin
T _m	Schmelztemperatur
TM	Transmembrandomäne
TNF α	tumor necrosis factor α
TPA	12-o-Tetradecanoylphorbol-13-acetat
TTP	Thymidintriphosphat
U	unit, Einheit der Enzymaktivität
U	Uracil
U-937	human monocytic leukemia
UNG	Uracil N-Glykosidase
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
V	Volt
V	Volt
V/V	Volumen pro Volumen
w/V	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
ZK	Zellkern
μ	micro

11 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1 Ausgewählte Komponenten der zellulären Signaltransduktion.	6
Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Mitglieder der PKC-Familie.	7
Abb. 1.3 Cofaktorabhängige Stimulierung konventioneller PKC.	9
Abb. 1.4 Auflistung der Bildung von PKC-aktivierenden Mediatoren.	10
Abb. 1.5 Bildung der Blutzellen.	16
Abb. 1.6 Herstellung von cDNA-Micro-Arrays.	18
Abb. 1.7 Überblick über die verschiedenen DNA-Arrays.	20
Abb. 1.8 Hybridisierung von cDNA-Arrays.	21
Abb. 1.9 Umwandlung der Fluoreszenzprofile.	22
Abb. 1.10 Vergleich der S-100 Expression in CHP-100 Zellen mit cDNA-Array Analyse.	24
Abb. 4.1 Versuchsanordnung für das Kapillarblotting von RNA.	46
Abb. 4.2 Graphische Darstellung der TaqMan [®] -Reaktion.	54
Abb. 4.3 Graphische Darstellung des Amplikons für die TaqMan [®] -Analyse	56
Abb. 4.4 Beispiel eines PCR-Amplifikationsplots	58
Abb. 5.1 Primersequenzen und erwartete Amplifikatgröße.	61
Abb. 5.2 Auftrennung von RNA aus 32D Zellen und der PCR-amplifizierten cDNA.	61
Abb. 5.3 Klonierung der PCR-Produkte in PCR [®] -BluntII-TOPO.	62
Abb. 5.4 Subklonierung der potentiellen PKC-Substrate in die Expressionsplasmide.	63
Abb. 5.5 Expressionskinetik der Fusionsproteine.	64
Abb. 5.6 Aufreinigung der Fusionsproteine.	65
Abb. 5.7 PKC Kinase-Reaktionen mit GST-PDI.	66
Abb. 5.8 PKC Kinase-Reaktionen mit GST-DAP1, GST-Diff6 und GST-TCTP.	67
Abb. 5.9 Morphologie von 32D, 32D PKC δ - und 32 DPKC ϵ -Zellen.	68
Abb. 5.10 Northern-Gel und Northern-Hybridisierung mit Gesamt-RNA.	69
Abb. 5.11 Quantifizierung der mRNA-Expression von PKC δ .	70
Abb. 5.12 SDS-Page und Western-Hybridisierung.	70
Abb. 5.13 Quantifizierung der Expression von PKC δ und PKC ϵ .	71
Abb. 5.14 Semiquantitative RT-PCR für TCTP.	72

Abb. 5.15 Reverse Transkription in der Gegenwart von Cy5-UTP.	73
Abb. 5.16 Kumulierte Häufigkeiten für die gemessenen Signalintensitäten.	74
Abb. 5.17 Kumulierte Häufigkeiten in Abhängigkeit vom Signalverhältnis.	75
Abb. 5.18 cDNA-Hybridisierung 32D PKC δ versus 32D PKC ϵ .	76
Abb. 5.19 Reverse labeling Versuche 32D versus 32D PKC δ .	77
Abb. 5. 20 Vergleich der mit verschiedener Methoden gemessenen PKC δ -Expression.	78
Abb. 5.21 Auflistung verschiedener am Adhäsionsprozeß beteiligter Proteine	79
Abb. 5.22 Vergleich der Lipocortin 1-Expression in den einzelnen Zelllinien	80
Abb. 5.23 Auflistung der untersuchten MAP Kinase Kaskade assoziierten Gene.	81
Abb. 5.24 Vergleich der MAPKAPK2-Expression in den einzelnen Zelllinien.	82
Abb. 5.25 Quantitative RT-PCR für GAPDH.	83
Abb. 5.26 TaqMan [®] - Primer und Sonden zusammen mit den amplifizierten Bereichen.	84
Abb. 5.27 Mangan-abhängige Amplifikation der Zielsequenzen für Lipocortin 1.	85
Abb. 5.28 Mangan-abhängigen Amplifikation der Zielsequenzen für MAPKAPK2.	86
Abb. 5.29 Quantifizierung der mRNA für Lipocortin 1.	87
Abb. 5.30 Quantifizierung der mRNA für MAPKAPK2 in 32D Zellen.	88
Abb 6.1 Modell für die PMA-induzierte Aktivierung und Expression von MAPKAPK2.	97

12 Lebenslauf und Veröffentlichungen

Persönliche Angaben: geboren am 26. Februar 1969 in Göttingen
verheiratet

Schulbildung:

1988 Abitur in Göttingen

Wehrdienst:

1988-1990 Iserlohn

Studium:

1990-1992 Grundstudium der Biochemie an der Universität Bayreuth

1992-1996 Hauptstudium der Biochemie an der Freien Universität Berlin

1996 Diplomarbeit am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare
Medizin, Berlin in der Arbeitsgruppe Proteintransport:
“Expression von PKC α und PKC ζ sowie Nachweis ihrer
Beteiligung an der Vesikelbildung im Trans-Golgi-Netzwerk”

seit 1997 Promotion in der Abteilung Nephrologie, Hypertensiologie
und Genetik an der Franz-Volhard-Klinik, Berlin
in Zusammenarbeit mit der Abteilung Proteinchemie am
Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin
unter Betreuung durch
Prof. Wittmann-Liebold, Max-Delbrück-Centrum, Berlin
und Prof. Hucho, Freie Universität Berlin

1988 Mount Desert Island Biological Laboratory in Maine, USA

1999 & 2000 National Cancer Institute, National Institute of Health,
Bethesda, USA

Haller, H.; Becker, B.; Schäfer, O.; Wellner, M. (1999).

Proteinkinase C Isoforms and differentiation of endothelial cells into the fenestrated phenotype. Mount Desert Island Biological Laboratory, 38, 90-93.

Oncogene, in Revision:

**Kim, J.S.; Pirnia, F.; Choi, Y.H.; Nguyen, P.M., Knepper, B.; Tsokos, M.;
Schulte, T.W.; Mushinski, J.F.; Schaefer, O.; Trepel, J.B.**

Lovastatin Downregulates RB and Induces Apoptosis in a Primitive Neuronal Progenitor Tumor Cell Line.

In Vorbereitung:

Schaefer, O.; Mischak, H.; Muschinski, J.F.; Haller, H.
A new role for PKC δ in the differentiation of 32D cells.

13 Danksagungen

Ich danke vor allem Frau Prof. Brigitte Wittmann-Liebold, ohne deren Engagement und Unterstützung diese Arbeit niemals entstanden wäre.

Herr Prof. Ferdinand Hucho hat mich seit meinem Wechsel nach Berlin tief für das Feld der Biochemie begeistert. Ihm danke ich für die vielen Hilfestellungen im Studium und für die Unterstützung dieser Arbeit.

Herr Prof. Hermann Haller hat meine wissenschaftliche und persönliche Entwicklung maßgeblich gefördert und mir bei der Gestaltung dieser Arbeit ein hohes Maß an Freiheit ermöglicht. Vielen Dank dafür.

Einige meiner schönsten Stunden im und außerhalb des Labors habe ich gemeinsam mit Herrn Prof. J. Frederic Mushinski und Frau Dr. Betty Mushinski verbracht. Danke für Alles.

Ich danke Herrn Dr. Harald Mischak für die freundliche Aufnahme, viele Abende mit anregenden Diskussionen und die Einführung in das spannende Gebiet der Zelldifferenzierung.

Diese Arbeit ist am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, an der Franz-Volhard-Klinik und dem National Cancer Institute entstanden. Mein Dank gebührt allen Kollegen, vor allem Carsten Lindschau, für ihre Hilfe bei meinen vielen kleinen und großen alltäglichen Problemen.

Frank Essmann & Volker Baddock haben mit vielen Stunden nicht ausschließlich wissenschaftlichem Inhalts zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen – vielen Dank an Euch beide.

Alexandra, vielen Dank für Deine Unterstützung und Dein Verständnis!