

5 Ergebnisse und Diskussion

5.1 Expression, Reinigung und Charakterisierung des Fusionsproteins aus PKC α und Glutathion-S-Transferase (GST-PKC α)

Als Ausgangspunkt der Untersuchungen diente die von Dr. G. Kochs, Institut für Mikrobiologie und Hygiene, Universität Freiburg, erhaltene cDNA für PKC α , die von Olaf Schäfer in den Vektor pAcGHLT inseriert und mit linearisierter Baculovirus-DNA in Sf9-Zellen transduziert wurde [191]. Die erzeugten rekombinanten Viren wurden zur Infektion von Sf9-Zellkulturen verwendet. Nach der Infektion der Sf9-Kulturen mit dem Baculoviren-Konstrukt erfolgte die Zellernte für gewöhnlich zwischen dem 3. und 5. Tag oder wurde durch Ermittlung von Zellzahl und Zellvitalität der infizierten Sf9-Zellen bestimmt. Das lösliche Fusionsprotein aus Glutathion-S-Transferase und PKC α wurde aus den Zellen extrahiert und durch Bindung an Glutathion-Sepharose gereinigt (s. Kap. 4.1.7). Dazu wurden die Verfahren der Säulenaufreinigung und der Batchreinigung angewendet.

Die Reinheit der Fraktionen wurde durch SDS-PAGE und Nachweis des Fusionsproteins mit anti-PKC α kontrolliert. Im Gegensatz zum **Säulenverfahren** ergab das **Batchverfahren** wesentlich höhere Ausbeuten an Fusionsprotein und wurde deshalb zur routinemäßigen PKC-Gewinnung eingesetzt. Die Aliquots der einzelnen Expressionsansätze wurden nach SDS-PAGE mittels anti-PKC α auf Anwesenheit des Fusionsproteins überprüft. Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, daß mehrere Infektionsansätze vereinigt werden können, die den größten Gehalt an Fusionsprotein aufweisen. Die Ausbeute der PKC-Präparation wird dadurch erhöht, und der Arbeitsaufwand gegenüber den Einzelpräparationen läßt sich reduzieren.

Die derart gewonnenen GST-PKC α -Fraktionen wurden nach Affinitätsreinigung und Dialyse mittels SDS-PAGE in Gradientengelen mit 7,5 – 15 % (w/v) C und anschließender Silberfärbung nach Heuveskoven und Dernick [256] erneut auf ihre Reinheit überprüft. In einigen GST-PKC-Präparaten wurden dabei neben dem Fusionsprotein im niedermolekularen Bereich < 29 kD noch ein bis zwei Proteinbanden nachgewiesen, die aber keine Reaktivität mit dem anti-PKC α -Antikörper aufwiesen (nicht gezeigt). Vom Molekulargewicht betrachtet konnte es sich nur um das GST-Fragment des Konstrukt oder eine endogene Form der Glutathion-S-Transferase aus Sf9-Zellen handeln. Um dies nachweisen zu können, wurden zusätzlich zu den mit GST-PKC α transduzierten Sf9-Zellen auch nichttransduzierte Sf9-Zellen nach dem Batchverfahren aufgearbeitet (s. Abb. 14).

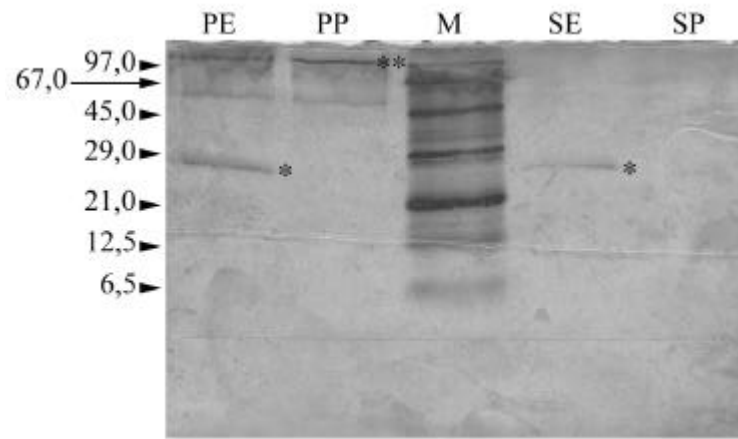


Abb. 14: Nachweis von Glutathion-S-Transferase (*, ca. 26 kD) in den Eluaten der Affinitätsreinigung von Sf9-Zellextrakten, die aus Zellkulturen mit (PE) und ohne (SE) GST-PKC α -Expression gewonnen wurden.

Die Proteine wurden nach Auftrennung in einer 16 % (w/v) SDS-PAGE durch Silberfärbung nach [256] sichtbar gemacht. Die Molekulargewichte des Proteinstandards (Spur M) wurden durch Pfeilspitzen markiert und in kD angegeben.

*: Glutathion-S-Transferase. **: GST-PKC α .

PP: Aliquot der Affinitätsmatrix, mit der ein Zellextrakt aus GST-PKC α -exprimierenden Sf9-Zellen gereinigt wurde.

SP: Affinitätsmatrix, die aus der Aufarbeitung einer Sf9-Zellkultur ohne PKC α -Expression stammt.

GST-PKC α (**) war nach der Durchführung des Batchverfahrens erwartungsgemäß nur im Eluat (PE) sowie im Aliquot der Affinitätsmatrix (PP) nachweisbar, in denen Zellextrakte von GST-PKC α -transduzierten Sf9-Zellen verwendet wurden. Die Proteinbanden, die die potentiellen Glutathion-S-Transferasen (*) darstellen sollten, waren aber sowohl im Eluat der nichttransduzierten (SE) als auch im Eluat der transduzierten Sf9-Zellen (PE) nachweisbar. Dafür daß es sich bei der Proteinbande (*) tatsächlich um die endogene Glutathion-S-Transferase der Sf9 Zelllinie handelt, sprechen drei Gründe:

Erstens wird die Proteinbande spezifisch an Glutathion-S-Sepharose gebunden und durch Glutathion spezifisch eluiert (s. Abb. 14, Spur PE und SE). Zweitens wandert die „Verunreinigung“ der GST-PKC α -Präparation (s. Abb. 14, Spur PE) im verwendeten 16 %igen (w/v) SDS-haltigen Polyacrylamidgel auf der gleichen Höhe wie die Proteinbande der nichttransduzierten Kontrolle (s. Abb. 14, Spur SE). Drittens liegt das relative Molekulargewicht von ca. 27 kD im Bereich der bereits in *Drosophila* (22,9 – 25,4 kD) und *Anopheles* (24,9 kD) nachgewiesenen Glutathion-S-Transferasen [119].

Da es sich bei Glutathion-S-Transferase (EC 2.5.1.18) um ein ubiquitär vorkommendes Enzym eukaryotischer Zellen handelt [263-265], das auch schon in verschiedenen Insektenzellen nachgewiesen wurde [266,263], ist die angenommene Identität auch plausibel. Da aber Glutathion-

S-Transferase keine Kinaseaktivität aufweist, wurde das eingesetzte Reinigungsverfahren beibehalten.

Die Überprüfung der PKC-Präparationen auf Fremdkinaseaktivität wurde mit dem analytischen Filterassay nach Hannun in Gegenwart des spezifischen PKC-Hemmers Calphostin C (s. Kap. 4.2.4.1) durchgeführt. Eine Fremdkinaseaktivität war nicht nachweisbar. Die Phosphorylierung von Histonfraktion III, das als unspezifisches Kinasesubstrat eingesetzt wurde, konnte in Abhängigkeit der Konzentration des Calphostin C gehemmt werden. Da bereits mit 2,5 μM Calphostin C eine 45 %ige Hemmung der Phosphorylierung von Histonfraktion III erreicht werden konnte, konnte davon ausgegangen werden, daß die Kinasespezifität der Präparate damit ausreichend nachgewiesen ist.

5.2 Nachweis der in HepG2-Zellen exprimierten PKC-Isoformen

Um den Einfluß von PKC α auf die Vesikelbiogenese richtig einschätzen zu können, mußte überprüft werden, in welchem Umfang endogene PKC-Isoformen in der verwendeten HepG2-Zelllinie exprimiert wurden. Dazu wurde der postnukleäre Überstand (PNS) von HepG2-Zellen durch Zentrifugation bei 100000 x g die TM vom Cytosol getrennt. Die Proteine beider Fraktionen wurden mit der SDS-PAGE aufgetrennt, auf NC transferiert und mit PKC-spezifischen Antikörpern aus dem PKC Sampler Kit [267] inkubiert. Positive Signale wurden mit Antikörpern gegen PKC α , PKC γ , PKC δ , PKC ι , PKC λ und PKC θ erhalten und sind in Abb. 15 dargestellt.

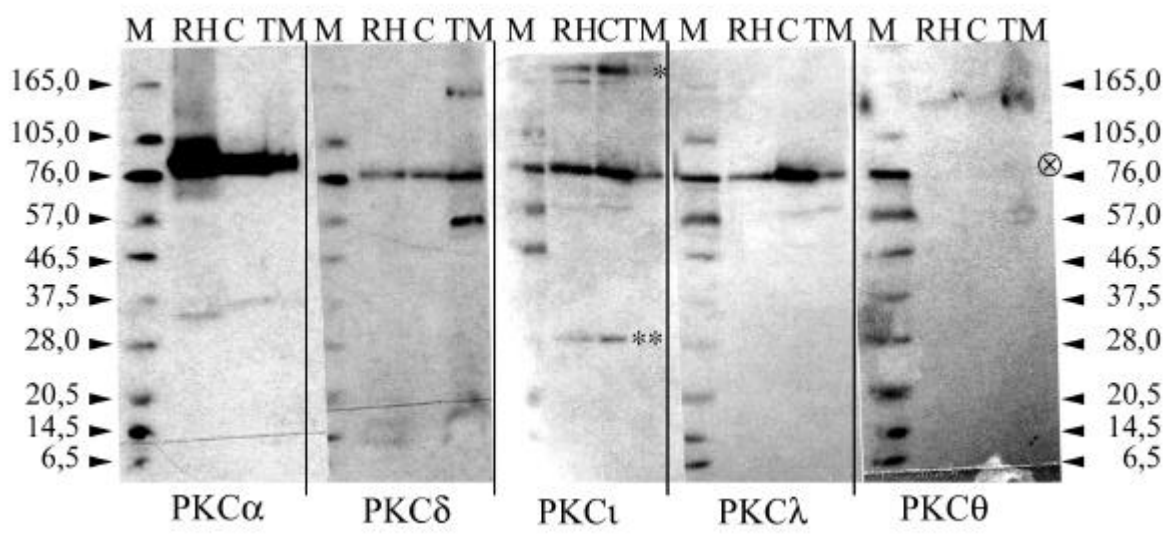


Abb. 15: Nachweis verschiedener PKC-Isoformen in Cytosol und TM von HepG2.

Der Nachweis der PKC-Isoformen erfolgte über Chemilumineszenzreaktion der Peroxidase-gekoppelten sek.

Antikörper. * und **: spezifisches Signal von PKC ι . \otimes : spezifisches Signal von PKC θ .

M: Standardproteine. RH: Rattenhirnextrakt (Positivkontrolle). C: Cytosol. TM: Totalmembranfraktion.

Tab. 5 faßt die Ergebnisse zusammen:

Tab. 5: Immunsignale mit Antikörpern gegen verschiedene PKC-Isoformen

PKC-Isoform	Rattenhirnextrakt (RH, Positivkontrolle)	Cytosol aus HepG2-Zellen (C)	TM aus HepG2-Zellen
PKC α	++++	+++	++
PKC β	n.n.	n.n.	n.n.
PKC γ	++++	+++	++
PKC δ	++	++	++
PKC ι	++	+++	++
PKC λ	++	+++	++
PKC θ	(+)	(+)	+

n.n.: nicht nachweisbar. ++++ bis +: gut erkennbare Chemilumineszenzsignale. (+): schwaches Signal der Chemilumineszens. -: kein Signal in der Chemilumineszenzreaktion.

Da für PKC α und PKC ζ in der HepG2-Zelllinie bereits entsprechende experimentelle Ergebnisse vorlagen [165], wurden bei der Auswertung der Immunsignale besonders die PKC-Isoformen kontrolliert, die bisher nicht identifiziert wurden:

Da der verwendete Antikörper gegen PKC γ nach Herstellerangaben [267] eine Kreuzreaktion mit PKC α zeigt, und PKC γ gewebsspezifisch hauptsächlich im neuronalen Gewebe exprimiert wird, muß angenommen werden, daß tatsächlich PKC α detektiert wird (Signal nicht gezeigt).

Ein Nachweis von PKC δ ist sowohl im Cytosol als auch in der TM von HepG2-Zellen möglich und bestätigt damit Literaturangaben [268]. Das Immunsignal in der TM zeigt neben dem Hauptsignal bei ca. 78 kD ein Signal bei etwa 57 kD, was vermutlich zusammen mit dem schwachen Signal bei etwa 16 kD auf proteolytischen Abbau der Isoform zurückzuführen sein dürfte. Das hochmolekulare Immunsignal in der TM-Fraktion könnte als Dimer interpretiert werden.

Die Chemilumineszenzsignale von anti-PKC ι und anti-PKC λ zeigen nach Herstellerangaben miteinander Kreuzreaktionen [267]. Da sich die Detektionsmuster beider Isoformen jedoch sowohl im Vergleichselektropherogramm des Herstellers [267] (nicht gezeigt) als auch im niedermolekularen Bereich des Immunblots unterscheiden (s. **, Abb. 15 in der Spur von PKC ι bei 28 kD), und im Fall des PKC ι -Antikörpers noch ein hochmolekulares Signal bei ca. 180 kD auftritt (s. * in Abb. 15), das sich mit allen anderen Antikörpern nicht nachweisen ließ, kann davon ausgegangen werden, daß HepG2 sowohl PKC ι als auch PKC λ exprimiert. PKC θ zeigte nur in der TM auf der erwarteten Höhe ein äußerst schwaches Signal (s. \otimes in Abb. 15). Wesentlich stärker ist

in der TM als auch im Cytosol ein spezifisches Signal mit ca. 160 kD nachzuweisen. Die Proteinbande ist allerdings fast doppelt so groß, wie sie für das theoretische Molekulargewicht der PKC θ zu erwarten ist. Da der verwendete Antikörper jedoch mit anderen PKC-Isoformen keine Kreuzreaktion zeigen soll, könnte es sich entweder um das Dimer von PKC θ oder ein homologes, aber bisher unbekanntes Protein zu PKC θ handeln.

Ein Nachweis von PKC β gelang unter den Versuchsbedingungen nicht (nicht gezeigt). Bei der Ermittlung spezifischer PKC-Substrate an der Golgi-Membran und deren Einfluß auf die in-vitro-Vesikelbiogenese von HepG2 muß dann berücksichtigt werden, daß in der untersuchten Zelllinie nicht nur die bereits identifizierte klassische PKC α und die atypische PKC ζ [165], sondern auch andere PKC-Isoformen namentlich δ und ι und/oder λ wirken könnten.

5.3 Anreicherung des TGN im Verlauf der Golgi-Präparation aus HepG2-Zellen

Die Isolierung der TGN-haltigen Membranen erfolgte entsprechend dem Fraktionierungsschema in Kap. 4.1.4.1. Zusätzlich wurde ein Aliquot der gewonnenen Golgiphase einer erneuten isopyknischen Zentrifugation unterworfen. Die gewonnene Golgiphase wurde als gereinigte Golgifraktion bezeichnet.

Zur Charakterisierung der isolierten Fraktionen aus der Anreicherung des TGN (s. Kap. 4.1.4.1) wurden sowohl Transportproteine - hier als HSPG nachgewiesen - als auch Proteine der Vesikelhülle (Clathrin, γ -Adaptin und Rab4) bestimmt [269].

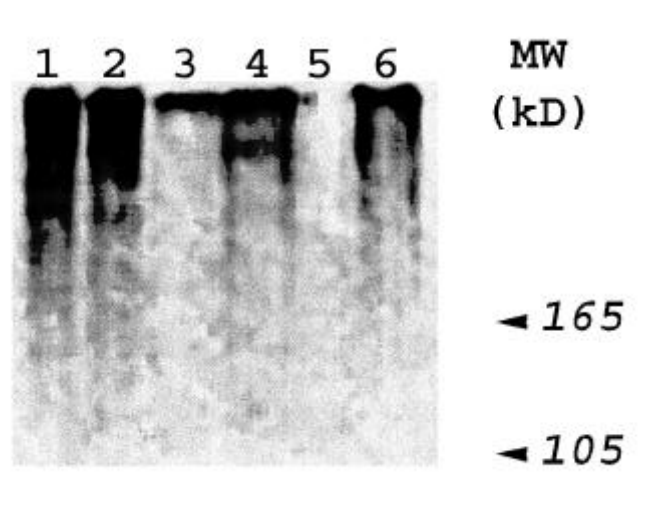


Abb. 16: Nachweis des Transportproteins HSPG durch [35 S]-Sulfat-Markierung in den Reinigungsstufen der TGN-Anreicherung modifiziert nach Beckers und Rothman [270]

Fraktionen der Golgipräparation:

(1): gereinigte Golgifraktion nach zweiter isopyknischer Zentrifugation (100 %).

(2): normale Golgifraktion (89 %).

(3): leichte Membranfraktion (47 %).

(4): cytosolisches Pellet (36 %).

(5): Cytosol (0 %).

(6): Pellet des Geschwindigkeitsgradienten (47 %).

Die Signalstärke von (1) wurde als 100 % normiert.

Der HSPG-Gehalt ist in der zweimal isopyknisch gereinigten Golgifraktion (1) und der Golgifraktion (2) gemessen an deren Signalintensitäten von 100 % bzw. 89 % ähnlich und deutlich gegenüber der leichten Membranfraktion (3) und dem cytosolischen Pellet (4) erhöht. Eine Anreicherung der Vesikelhüllproteine Clathrin, γ -Adaptin und Rab4 konnten in der zweimal isopyknisch gereinigten Golgifraktion (1) und der normalen Golgifraktion (2) ebenfalls nachgewiesen werden (nicht gezeigt).

HSPGs werden sowohl von PC12-Zellen [271] wie auch von Hepatocyten [272] im TGN sulfatiert. Markiertes HSPG stellt daher einen spezifischen Marker des TGN dar. Diese Anreicherung ist in Abb. 16 dokumentiert.

g-Adaptin ist ein Bestandteil des heterotetrameren Adaptor Proteinkomplexes 1 (AP-1), der die Bindung des Clathrins an Membranen und Vesikeln des TGN vermittelt [273,274]. Aufgrund der spezifischen Bindung von AP-1 an das TGN wird γ -Adaptin häufig als Golgimarker verwendet [275-279].

Clathrin ist das Hüllprotein der am TGN abgeschnürten CCVs [276] und von Clathrin-umhüllten Vesikelknospen [18] auf der Oberfläche des TGN [280]. Der Translokation des cytosolischen Clathrins an die Golgimembran geht die Rekrutierung der AP-1 Adapterkomplexe voraus [18]. Die gebildete Adapter-Clathrin-Hülle bleibt an der Golgimembran gebunden [18]. Da Clathrin über den Adapterkomplex AP-2 auch an die Plasmamembran bindet, ist es kein spezifischer Golgimarker. Seine Anreicherung im cytosolischen Pellet (4) könnte auf CCVs sowie AP-1 bzw. AP-2-gebundenes Clathrin zurückzuführen sein. Der Clathrin-Nachweis in der leichten Membranfraktion (3) könnte sowohl auf CCVs als auch auf Bruchstücke der Plasmamembran zurückzuführen sein [280,281].

Rab4 wurde als endosomaler Marker untersucht [282-284]. Seine Detektion im Cytosol (5) und cytosolischen Pellet (4) von HepG2-Zellen entspricht bekannten Befunden, daß Rab4 zum großen Teil mit einem cytosolischen Chaperon, dem GDP Dissoziations-Inhibitor (GDI) komplexiert [285]. Rab4 wurde bereits an Golgi-angereicherten Fraktionen nachgewiesen [286], überwiegend jedoch an frühen Endosomen [287,288] und frühen rezyklisierenden Endosomen [288-290]. Der Nachweis von Rab4 in der TGN-Präparation (1 + 2) könnte bedeuten, daß die angereicherten Membranen endosomale Kompartimente enthalten. Denkbar wäre auch eine GTP γ S-induzierte Rekrutierung von Rab4 an die Golgimembran [16]. Es ist aber auch möglich, daß aufgrund des Transportes von endozytierten Proteinen zum TGN auch Rab4 den Golgi erreicht. Eine endgültige Klärung dieser Frage steht noch aus.

5.4 Nachweis und Quantifizierung der Fähigkeit der isolierten Golgizisternen zur Bildung von Transportvesikeln

Mit Hilfe des von Tooze und Huttner entwickelten Testsystems [254] kann die Verpackung von im TGN metabolisch mit [³⁵S]-Sulfat-markiertem HSPG in konstitutive Transportvesikel gemessen werden (s. Kap. 4.1.6). Dazu werden [³⁵S]-markierte Golgi-Zisternen in Gegenwart von Cytosol, GTP, ATP und einem ATP-regenerierenden System bei 37 °C inkubiert. Anschließend werden die Golgizisternen von den gebildeten Vesikeln durch Zentrifugation getrennt, beide Phasen mit Triton X100 lysiert und das [³⁵S]-markierte HSPG mit Chondroitinsulfat und Cetylpyridiniumchlorid gefällt und dessen Radioaktivität bestimmt. Das Verhältnis zwischen Radioaktivität der Vesikelphase zur Gesamtaktivität von Vesikelphase und Golgiphase charakterisiert die Effektivität der in-vitro-Vesikelbiogenese und schwankte im Wertebereich zwischen 20 - 40 %.

5.5 Anpassung der Phosphorylierungsbedingungen nach Hannun an die Bedingungen der in-vitro-Vesikelbiogenese

Nachdem die Hauptkomponenten des Modellsystems (Golgizisternen aus HepG2-Zellen und GST-PKC α) weitestgehend charakterisiert waren, sollten die in der Literatur dokumentierten Bedingungen des in-vitro-PKC-Kinaseassays nach Hannun ([291,292]) noch an die Bedingungen der in-vitro-Vesikelbiogenese angepaßt werden.

In Vorversuchen zur Phosphorylierung von Golgiproteinen unter den Bedingungen nach Hannun (s. Kap. 4.2.4.1) [291,292] in Gegenwart von MgCl₂, CaCl₂, [³²P]- γ ATP, PS, DAG, PMA und Proteaseinhibitoren ergaben keine nennenswerte Phosphorylierung der Golgiproteine. Für diesen Effekt könnten mehrere Gründe verantwortlich sein:

- Eine vorhandene intrinsische Kinaseaktivität – wie sie bereits im Golgiapparat [293] nachgewiesen wurde - läßt sich unter den gewählten Bedingungen nicht durch PMA stimulieren.
- Golgiproteine werden durch cytosolische Kinasen wie PKC modifiziert, die nach ihrer Aktivierung an der Golgimembran binden und sich nach ihrer Deaktivierung wieder von der Membran ablösen.
- Wichtige Prozesse der Vesikelbildung – die möglicherweise durch Kinasen wie PKC beeinflusst werden - laufen erst in Gegenwart von GTP [294] ab oder sind von der Aktivierung GTP-bindender Proteine reguliert [185].

Um tatsächlich potentielle PKC-Substrate identifizieren zu können, die in die in-vitro-Vesikelbiogenese am TGN eingreifen, mußten die bis zu diesem Zeitpunkt nötigen oder bekannten

Komponenten in den Reaktionsansatz integriert werden, die für die in-vitro-Vesikelbiogenese essentiell sind. Dazu gehören die Golgimembran als Vesikel-Donor (Golgi insbesondere TGN) sowie PKC α als die nach der Arbeitshypothese regulierende Kinase auf der einen Seite und Cytosol als Lieferant für Cofaktoren, ATP als Phosphatdonor der Kinasereaktion von PKC und GTP als Effektor von G-Proteinen die in die in vitro-Vesikelbiogene eingreifen auf der anderen Seite. Um diesen Bedingungen gerecht zu werden, wurden folgende Modifikationen eingeführt:

1. Die Cytosolmenge wurde auf 400 μg und die Menge an Golgi, gemessen am Proteingehalt auf 20 μg festgesetzt. Ein Verhältnis von Golgimembran zu Cytosol von 1:20 sollte für eine optimale Vesikelbildung ausreichen [295].
2. Von den Komponenten des Energie-Regenerationssystems der in-vitro-Vesikelbiogenese bestehend aus GTP, ATP, MgCl_2 , Creatinphosphat und Creatinkinase wurden nur ATP, MgCl_2 und GTP übernommen. Die Konzentration an ATP wurde von 1 mM auf die essentielle Konzentration von 0,05 mM [165] reduziert, um das [^{32}P]- γATP für die radioaktive Markierung der Phosphoproteine nicht zu stark zu verdünnen.
3. Auf eine weitere Verwendung von PS und DAG im Reaktionsansatz wurde aufgrund der Anwesenheit von angereicherten Golgimembranen verzichtet.

Mit Hilfe der obigen Bedingungen wurde die Phosphorylierung von Golgi-Proteinen untersucht. Die Phosphorylierung von Golgi, Cytosol und einem Gemisch aus Golgi+Cytosol mit GST-PKC α in Gegenwart von Ca^{2+} und bei Abwesenheit von Phosphatase-Inhibitoren zeigte keine spezifischen Phosphorylierungsbanden.

Die präparierte Golgifraktion enthält keine nennenswerte Kinaseaktivität. Das HepG2-Cytosol zeigt im Gegensatz zur Golgifraktion starke endogene Kinaseaktivitäten, die fast den Zusatz von GST-PKC α sowie deren beobachtbare Autophosphorylierung überdeckt. Unter den hier gewählten Versuchsbedingungen sind neben den Ca^{2+} -aktivierbaren Kinasen auch Phosphatasen aktiv, die den Phosphorylierungszustand von PKC-Substraten vermindern können.

Um den Einfluß von Phosphatasen auf den Phosphorylierungsstatus zu verringern, wurden die Phosphataseinhibitoren Vanadat, Microcystin LR, NaF und Ammoniummolybdat eingesetzt und ihr Effekt auf die in-vitro-Phosphorylierungsreaktion bestimmt (s. Abb. 17).

Der Einfluß der Phosphataseinhibitoren (PINs) auf die endogene Kinaseaktivität ist besonders im Cytosol bei Vergleich der Spuren mit (2) und ohne (1) Inhibitoren offensichtlich. Desweiteren fällt auf, daß eine Doppelbande (doppelte Pfeilspitzen) sowohl im Cytosol (2) als auch im Gemisch aus Cytosol und Golgi (6) in Abhängigkeit von Ca^{2+} verstärkt in Gegenwart von PINs phosphoryliert wird. Eine Golgi-spezifische Phosphorylierung wird offenbar durch die starke Phosphorylierung von cytosolischen Proteinen überdeckt und ist nur ansatzweise als verstärkte Ca^{2+} -abhängige Phosphorylierung in Gegenwart der Phosphataseinhibitoren sichtbar (Pfeilspitze, Spur 6).

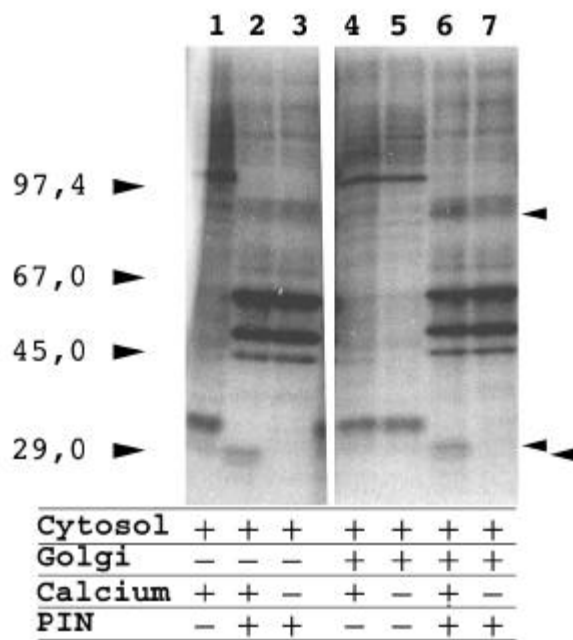


Abb. 17: Einfluß von Phosphataseinhibitoren Vanadat, Microcystin LR, Fluorid und Molybdat auf den Phosphorylierungsstatus von cytosolischen Proteinen und Golgi aus HepG2-Zellen in einem zehnmütigen analytischen in-vitro-Phosphorylierungsansatz (s. Kap. 4.2.4.2).

Die Pfeilspitzen auf der rechten Seite von Abb. 17 markieren Ca^{2+} -abhängige Phosphorylierungen.

5.6 Nachweis der ATP-abhängigen Komplexbildung von phosphorylierten cytosolischen Proteinen

Um die Golgiproteine, die im Verhältnis zur endogenen Phosphorylierung des Cytosols nur schwach modifiziert werden, besser analysieren zu können und um Artefaktbildungen durch mögliche ATP-abhängige Komplexbildung [296] zu vermeiden, mußte der analytische in-vitro-Phosphorylierungsansatz um einen Separationsschritt zur Trennung von Golgiproteinen und cytoplasmatischen Proteinen ergänzt werden.

Im analytischen in-vitro-Phosphorylierungsansatz wurde zu diesem Zweck ein zusätzlicher zehnmütiger Zentrifugationsschritt mit 15000*g eingeführt (s. Kap. 4.2.4.2) und sowohl Überstand (Ü, Cytosol) und Sediment (S, Golgi) mittels SDS-PAGE (s. Kap. 4.2.1.2) aufgetrennt.

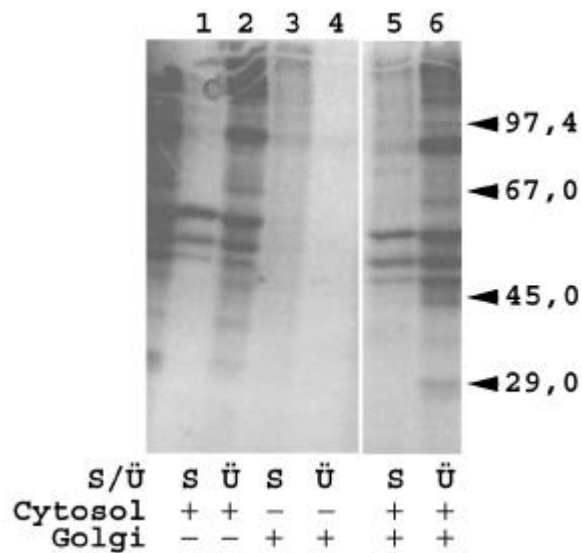


Abb. 18: Nachweis sedimentierbarer Phosphoproteine im Cytosol (1), Golgi (3) und im Gemisch aus Cytosol und Golgi (5) nach analytischer in-vitro-Phosphorylierung (s. Kap. 4.2.4.2).

Der sedimentierbare Anteil der in-vitro-Phosphorylierten Proteine ist mit (S) bezeichnet, der nichtsedimentierbare Anteil dagegen mit (Ü).

Die geringe radioaktive Markierung der Golgifractionen läßt sich durch Zentrifugation erwartungsgemäß fast vollständig sedimentieren (s. Abb. 18, Spur 3 + 4). Andeutungsweise ist auch im Überstand noch Radioaktivität zu erkennen. Erklärbar wäre dieser Effekt dadurch, daß sich entweder Proteine nach deren Phosphorylierung von den Golgimembranen ablösen oder daß Phosphoproteine an den während der Phosphorylierung gebildeten Vesikeln gebunden bleiben und bei 15000*g nicht zu sedimentieren sind. Im Vergleich zur endogenen Phosphorylierung des Cytosols ist der Phosphorylierungsgrad der Golgiproteine jedoch gering.

Daß ein wesentlicher Teil der cytosolischen Phosphoproteine mit den Golgizisternen sedimentiert (s. Abb. 18, Spur 5), könnte entweder eine Bindung an die Golgimembran oder die Bildung hochmolekularer, sedimentierbarer Proteinkomplexe als Ursache haben. Da die Anwesenheit von Golgimembranen zur Sedimentation eines großen Anteils der cytosolischen Phosphoproteine nicht erforderlich war (s. Abb. 18, Spur 1), war die Komplexbildung oder Aggregation cytosolischer Proteine anzunehmen.

Um die Bildung dieser cytoplasmatischer Proteinkomplexe nachzuweisen, wurde nach Kap. 4.1.5.1 ATP-Cytosol in Gegenwart von ATP±EDTA für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert und die sedimentierbaren Proteinkomplexe über einen Dichtegradienten aufgetrennt (Abb. 19).

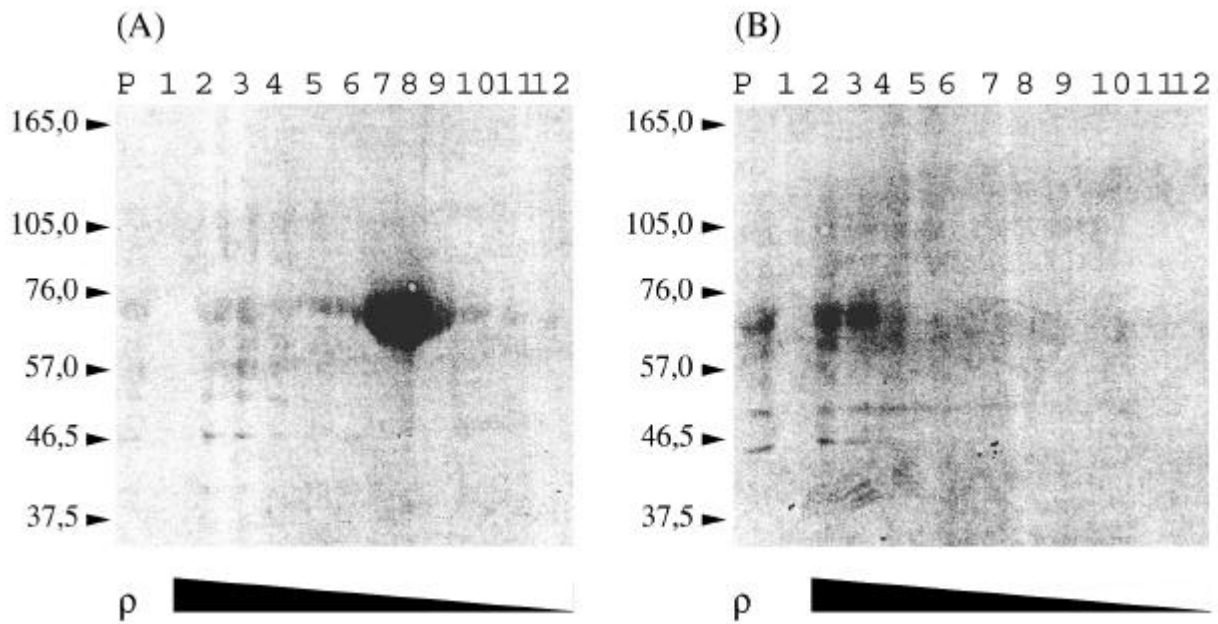


Abb. 19: Erneute Komplexbildung von cytosolischen Proteinen in Gegenwart von ATP (A) oder ATP+EDTA (B).

Die Sedimentation erfolgt von Fraktion 11 (Ausgangspunkt) in den Bereich der Fraktionen 1-10.

Der Saccharose-Dichtegradient wird durch die Keile angedeutet. Das pelletierbare Protein ist mit P gekennzeichnet.

Die Visualisierung der Komplexbildung erfolgte durch Ponceau S-Proteinanfärbung auf der Proteintransfermembran.

Wie die Abb. 19 ausweist, werden auch weiterhin Proteinkomplexe beobachtet, die im Gradienten sedimentieren (s. Spur 5 – 9).

In Gegenwart von EDTA werden möglicherweise größere Komplexe gebildet, die in den Fraktionen 1-4 nachzuweisen sind. Um der Aggregation cytoplasmatischer Proteine in weiteren Experimenten vorzubeugen, wurde zur Isolation Golgi-spezifischer PKC-Substrate zum einen vorinkubiertes und anschließend durch Ultrazentrifugation geklärtes Cytosol verwendet und zum anderen der Golgi nach der in-vitro-Phosphorylierung durch isopyknische Zentrifugation frei von cosedimentierenden Proteinkomplexen isoliert.

5.7 Untersuchung der Phosphorylierung von Golgi-assoziierten Proteinen

Da die Phosphorylierung von Golgi-proteinen durch endogene Kinasen gering ist (s. Abb. 18), wurde GST-PKC α zum Phosphorylierungsansatz aus Golgi und Cytosol zugesetzt. Die nach der Phosphorylierung cosedimentierenden cytosolischen Proteinkomplexe wurden durch isopyknische Zentrifugation abgetrennt. Die Verwendung eines SDS-PAGE Gradienten von 7,5-17,5 % (w/v) im Maxi-Elektrophoresesystem führt darüber hinaus zu einer beträchtlich erhöhten Auflösung der Phosphorylierungsmuster.

5.8 Untersuchung des möglichen Einflusses von Ro 31-8220 auf die Membranbindung von PKC α

Um den Einfluß von Ro 31-8220 auf PKC α zu untersuchen, wurde die Membranbindung der endogenen Kinase (s. Kap. 4.2.4.3) nach in-vitro-Phosphorylierung eines Gemisches aus Cytosol und Golgi durch Immundetektion mit anti-PKC α untersucht (Abb. 21).

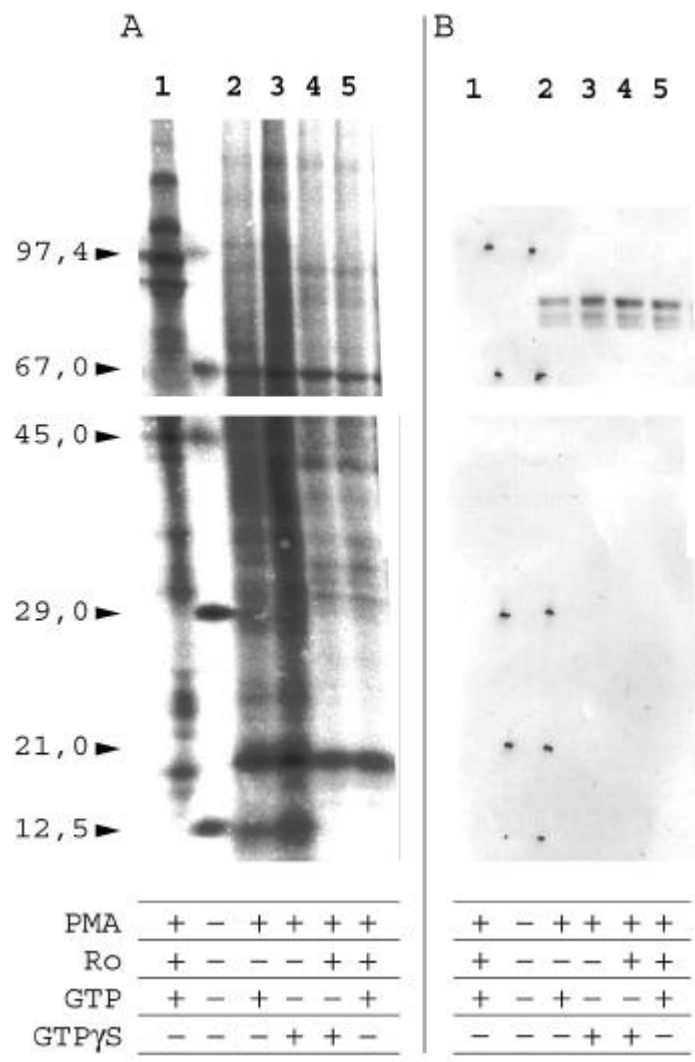


Abb. 21: Einfluß von Ro 31-8220 auf die Phosphorylierung (A) und die Verteilung (B) von PMA-aktivierter PKC α im Cytosol (1) und Golgi (2-5) nach präparativer in-vitro-Phosphorylierung.

Da die Detektion von endogener PKC α nur in den Golgifraktionen (2-5) möglich war und sich die Phosphorylierung des Cytosols nicht von der in Abb. 20 zu unterscheiden war, wurde hier auf die zusätzliche Darstellung weiterer cytosolischer Proben verzichtet.

Die Molekulargewichte der Standardproteine sind in kD angegeben.

Die Hemmung der PKC-abhängigen Phosphorylierung von Golgi-assoziierten Proteinen (Spur 2+3) durch Ro 31-8220 (Spur 3+4) ist in Abb. 21A deutlich zu erkennen. Eine Ablösung der durch Ro 31-8220 gehemmten PKC α von der Golgimembran ließ sich nicht nachweisen.

Dieser Effekt steht im Gegensatz zu in vivo-Experimenten [299]. Möglicherweise wird das durch PMA aktivierte Enzym nicht durch Ro 31-8220 von seiner Membranverankerung abgelöst. Ein Grund dafür könnte die wesentlich höhere Membranaffinität der PMA-aktivierten PKC α gegenüber der DAG-aktivierten Form sein [300]. Dies würde auch experimentellen Beobachtungen entsprechen, daß die PMA-abhängige Translokation von PKC-Isoformen durch PKC-Inhibitoren unterschiedlich stark beeinflusst wird [301].

5.9 Identifizierung von Golgi-assoziierten PKC-Substraten

5.9.1 Ergebnisse der Phosphorylierungsversuche

Die *in-situ*-Phosphorylierung von Golgi-proteinen hängt in Gegenwart von ATP und GTP entscheidend von der Anwesenheit cytoplasmatischer Proteine ab (s. Abb. 20). In Abwesenheit der cytoplasmatischen Proteine findet keine nennenswerte Phosphorylierung von Golgi-proteinen statt (nicht gezeigt).

Für diesen Effekt gibt es zwei Erklärungen:

- a) Golgi-gebundene PKC-Substrate werden am Golgi nur dann exponiert, wenn sich die Struktur von Golgimembran und Membran-assoziierten Proteinen im Verlauf der durch cytosolische Proteine vermittelten Vesikelbiogenese verändert, oder aber
- b) Cytoplasmatische Proteine werden entweder in freier Form oder in gebundener Form phosphoryliert und bleiben dann an der Golgimembran gebunden.

In jedem Fall sind cytosolische Proteine essentiell, und nur in ihrer Gegenwart können die funktionell wichtigen PKC-Substrate identifiziert werden.

Da viele Golgi-assoziierte Proteine auch frei im Cytoplasma vorkommen, könnte die Bedeutung einer möglichen Phosphorylierung für die Membranbindung nach Identifizierung dieser PKC-Substrate geklärt werden.

5.9.2 Zweidimensionale Trennung der Proteine nach Hartinger et al.

Da die Auflösung der eindimensionalen SDS-PAGE - auch bei Verwendung eines Gradientengels – nicht ausreicht, um einzelne Phosphoproteine abzutrennen, sollte eine zweidimensionale Elektrophorese-Methode zum Einsatz kommen. Zunächst wurde ein von Hartinger et al. [259] entwickeltes Verfahren angewendet, das sich bei der Trennung von integralen Membranproteinen bewährt hatte.

Nach der Phosphorylierung wurden phosphorylierte und nicht modifizierte Proteine aus den isolierten Golgimembranen mit Benzyl-dimethyl-n-hexadecylammoniumchlorid (16-BAC) in Gegenwart von 8 M Harnstoff bei 62°C extrahiert [259]. Die dabei entstandenen positiv geladenen Protein-Detergenz-Komplexe werden bei pH 2,1 in einem 7,5 - 11,5 %igen (w/v) PAA-Gel separiert (s. Kap. 4.2.1.3). Durch eine nachfolgende SDS-PAGE in einem Gel-Gradienten wird eine gegenüber der eindimensionalen Elektrophorese wesentlich verbesserte Auftrennung der Proteine erreicht. Ein typisches Elektropherogramm von Golgiproteinen ist in Abb. 22 wiedergegeben.

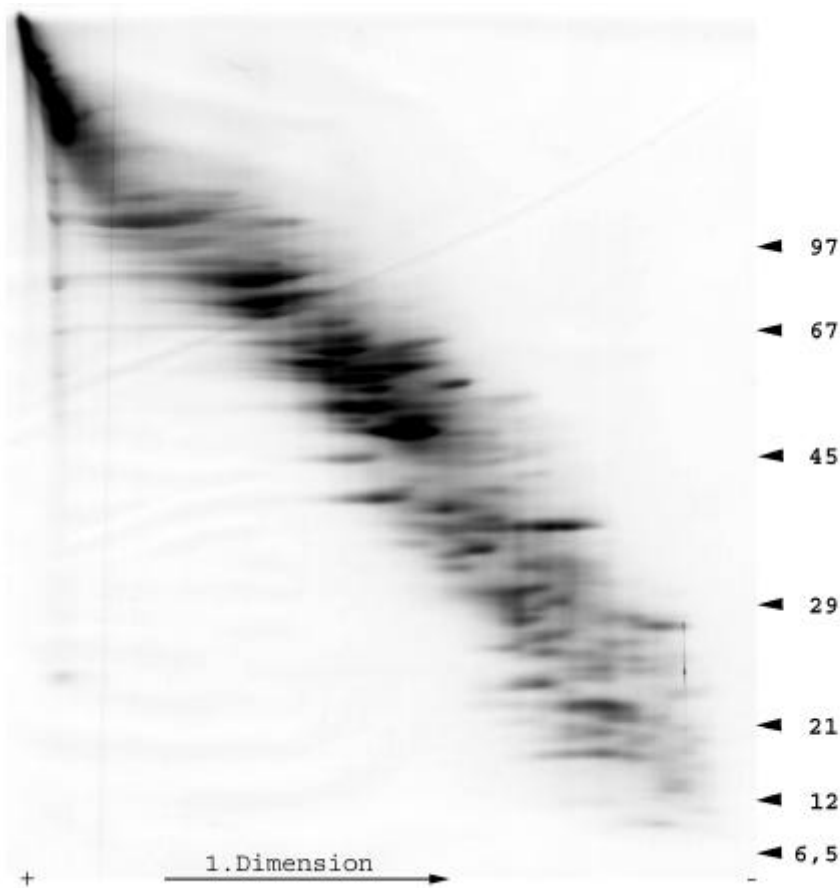


Abb. 22: 2D-Trennung angereicherter Golgiproteine nach Hartinger [259]

Nach dieser Methode lassen sich mehr als 100 Proteinflecke in der angereicherten Golgifraktion aus HepG2-Zellen differenzieren (Abb. 22), wodurch eine bessere Identifizierung von Phosphoproteinen in den in-vitro-Phosphorylierungsansätzen möglich sein sollte. Ein Vorteil dieser Methode besteht darin, daß nahezu alle Proteine extrahiert werden, und daß sie auch stark kationische Proteine erfaßt, die bei der isoelektrischen Fokussierung mit Ampholyten aus dem Gel wandern würden. Das Elektropherogramm läßt aber auch erkennen, daß die überwiegende

Anordnung der Proteine in der Diagonalen besonders im hochmolekularen Bereich der 2D-Gele nicht ausreicht, um dort markierte Phosphoproteine von den unmarkierten Proteinen zu trennen. Durch die zweidimensionale Auftrennung werden die Unterschiede in den Phosphorylierungsmustern bei der Stimulierung durch PMA bzw. Hemmung durch Ro 31-8220 in der PKC-abhängigen in-vitro-Phosphorylierung von Golgi-Membranen besonders deutlich (Abb. 23).

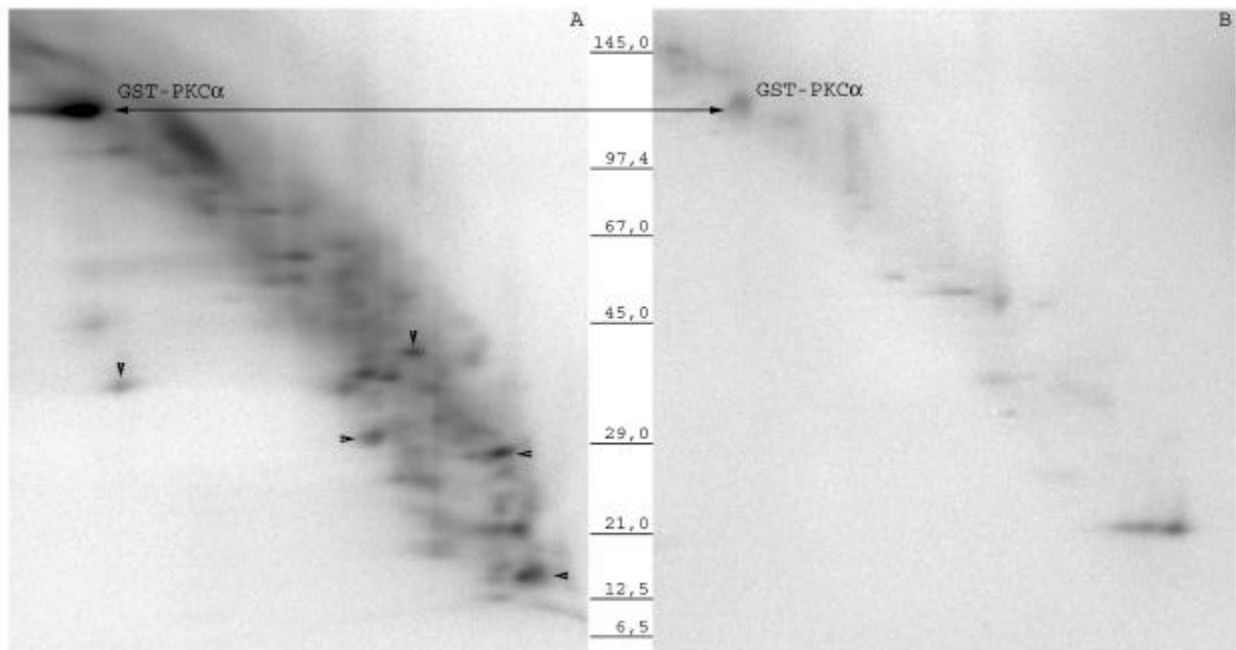


Abb. 23: 2D-Trennung von in-vitro-Phosphorylierten Golgiproteinen nach Hartinger

A: Phosphorylierung in Gegenwart von PMA (s. Kap. 4.2.4.3).

B: Phosphorylierung in Gegenwart von PMA und Ro +31-8220.

GST-PKC: Autophosphorylierungssignal des hier eingesetzten GST-PKCα Fusionsproteins.

Die Pfeilspitzen markieren besonders markante Phosphoproteine nach Stimulierung mit PMA.

Die verbesserte Trennung erlaubt es, die PKC-abhängige Phosphorylierung von der durch andere, nicht hemmbare Kinasen verursachten Phosphorylierungen deutlich besser zu unterscheiden. Zum anderen ist erkennbar, daß sich die Autophosphorylierung der eingesetzten GST-PKCα auch durch Ro 31-8220 nicht vollständig unterdrücken läßt. Diese Beobachtung, wie auch die analogen Muster von Phosphoproteinen in Abwesenheit von GST-PKCα und schließlich der Nachweis großer Mengen endogener PKCα in den Extrakten der HepG2-Zelllinie [165] führten zu der Überlegung, bei weiteren Versuchen auf den Zusatz von GST-PKCα zu verzichten. Außerdem wird in diesem Fall eine Störung durch Fragmente des autophosphorylierten Fusionsproteins vermieden.

Eine Analyse der nicht solubilisierten Phosphoproteine mit SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung zeigte nur wenige Proteine mit sehr diffusen Signalen (nicht gezeigt), so daß auf eine weitergehende Untersuchung verzichtet wurde.

Nach präparativer Phosphorylierung in Gegenwart von endogener PKC α sowohl in Gegenwart von PMA als auch unter Zusatz von Ro 31-8220 als Kontrolle wurden die Golgiproteine mit der oben beschriebenen Methode aufgetrennt. Die Phosphoproteine wurden durch Autoradiographie und Phosphoimaging detektiert (s. Abb. 24). Die radioaktiven Gelbereiche mit den detektierten PKC-Substraten und die entsprechenden Gelbereiche aus dem Kontrollgel wurden präpariert und die Radioaktivität nach Cerenkov gemessen (s. Tab. 11, Anhang).

Für eine massenspektroskopische Untersuchung wurden solche Proben ausgewählt, die eine Markierung von mindestens 100 cpm zeigten und deren Phosphorylierung durch Ro 31-8220 hemmbar war (s. Tab. 11, Anhang).

Die am stärksten markierten PKC-Substrate (s. Tab. 6) die bei der Cerenkov-Messung eine Aktivität von 300 bis 5000 cpm zeigten, wurden wie auch alle anderen in dieser Arbeit beschriebenen Proben durch Dr. Albrecht Otto im PAA-Gel mit Trypsin gespalten und die extrahierten Peptide durch Dr. Albrecht Otto und Dr. Eva-Christina Müller massenspektrometrisch sequenziert. Folgende Peptidsequenzen wurden ermittelt:

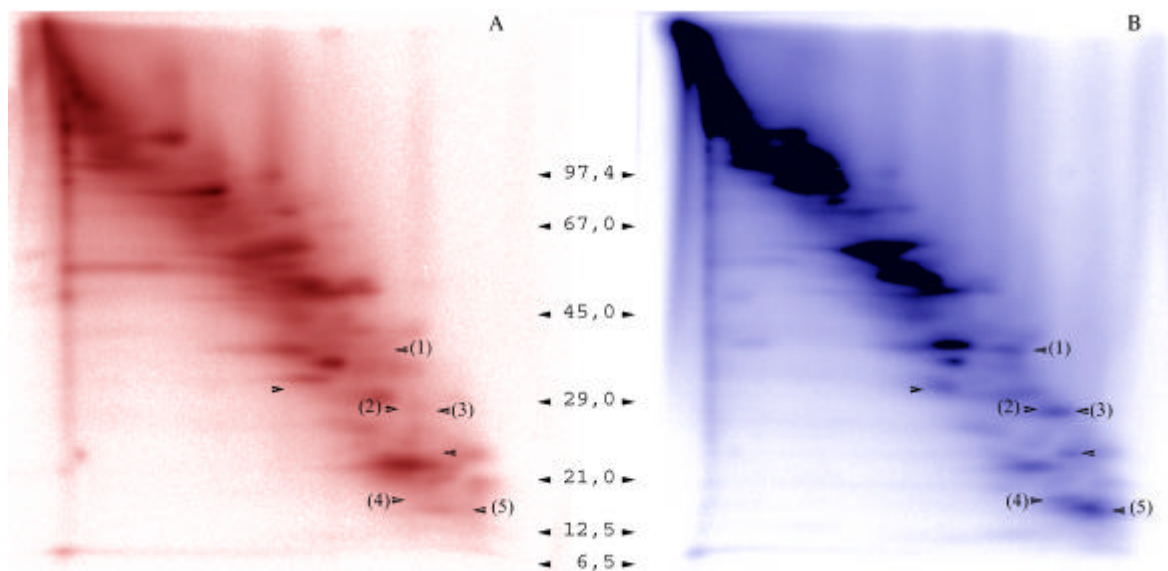


Abb. 24: Phosphorylierungsmuster, die bei der präpartiven in-vitro-Phosphorylierung angereicherter Golgimembranen in Gegenwart von Cytosol, endogenen PKC-Isoformen und PMA erhalten wurden.

A: Phosphorylierungsmuster in Gegenwart von Ro 31-8220. B: Phosphorylierungsmuster nach PMA-Stimulierung der endogenen PKC-Isoformen.

Die ausgehöhlten Pfeilspitzen markieren die PKC-abhängige Phosphorylierung in Gegenwart von PMA.

Die Bezeichnungen (1) - (5) markieren die PKC-Substrate, die identifiziert wurden.

Tab. 6: Ergebnisse der massenspektroskopischen Peptidsequenzierung:

Probe	Δ cpm*	geschätztes MW, kD	ermittelte Peptidsequenzen	Protein mit identischer Peptidsequenz**	Theor. MW, kD
(1)	1083	38	ISQTYQQYGR GLGTDDNTLIR AEIDMoxLDIR DEGNYLDDALVR	Annexin IV (P09525)	33
			VNDAVTTDGVQTIR	λ -Immunglobulin (L07570)	33
(2)	358	30	DPENFPFVVLGNK FQSLGVAFYR	Rab7 (P51149)	23.5
(3)	750	28	LQIWDTAGQER	Rab8 (P24407)	23.7
(4)	5520	17	WESGYNTR STDYGIFQINSR LGMoxDGYR GISLANWMOxCamLAK YWCamNDGK	LysozymC (P00695)	16
			TFVNITPAEVGVLVGK	Profilin (P07737)	16
			WQNNLLPSR	S15A (P39027)	16
(5)	550	15	ADALQAGASQFETSAAK	Synaptobrevin 2 (P19065)	15
			NLQSEVEGVK	Endobrevin (EST66449)	32
			LVQAFQYTDK	Antioxydant enzyme (Q13162)	15

_: potentielle Phosphorylierungsstelle für PKC nach Prosite. *: Zerfallsrate nach Abzug des Nullwertes.

** : Die Zuordnung der Peptidsequenz zu einem Protein erfolgte durch Einsatz des Programmes „Proteome search tool“ und Abgleich der Peptidsequenzen zur SwissProt-Datenbank [119].

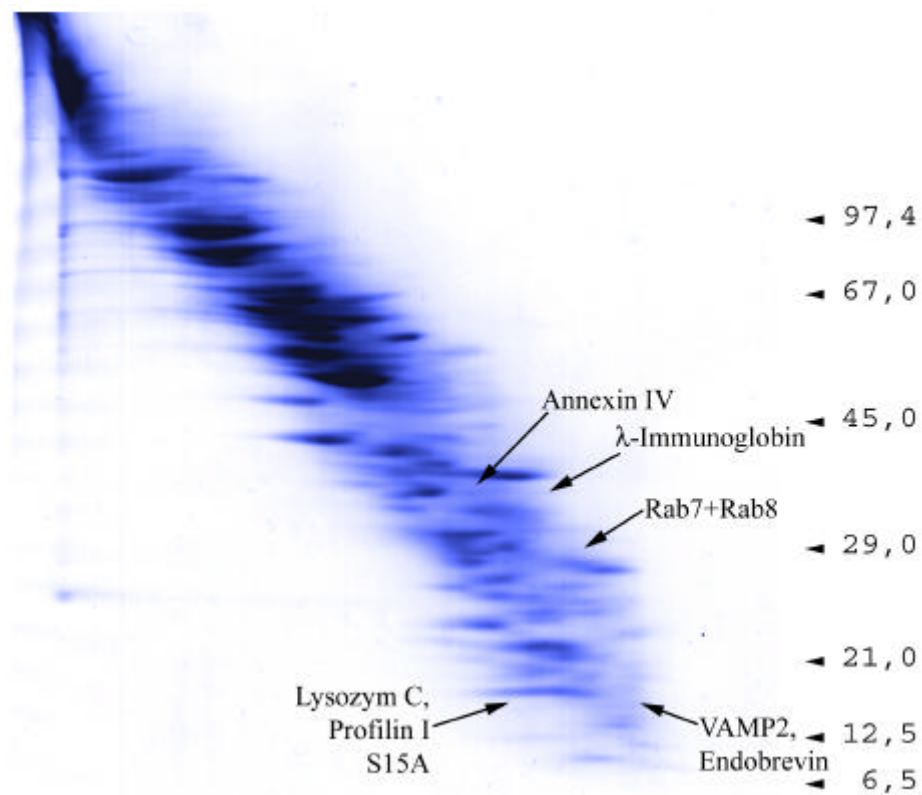


Abb. 25: Lokalisierung der infizierten Proteine im Golgi protein-Muster anhand der massenspektroskopisch sequenzierten Peptide.

Rab7 und Rab8 bzw. Lysozym C, Profilin I und S15A wurden in der gleichen Probe identifiziert.

Eine Zuordnung der Sequenzdaten zu dem Proteinemuster der 2D-Elektrophorese liefert Abb. 25. Die Zuweisung der Sequenzdaten zu einzelnen PKC-Substraten ist aufgrund der unvollständigen Trennung nach Hartinger nicht möglich. Alle mittels MS identifizierte Proteine weisen bis auf Lysozyme C [302] potentielle PKC-Phosphorylierungsstellen auf, eine in-vitro-Phosphorylierung wurde dagegen nur für Profilin I und Annexin IV beschrieben.

Da aufgrund der unvollständigen Trennung nach Hartinger die PKC-Substrate nicht isoliert werden konnten, müssen die gewonnenen Sequenzdaten unter einschränkenden Kriterien betrachtet werden:

1. wurde mehr als ein Protein identifiziert, so könnten ein oder mehrere Proteine das PKC-Substrat darstellen, wenn nicht
2. die Menge des PKC-Substrats zu gering ist, um durch Sequenzierung erkannt zu werden.

Da im Folgenden zum Teil widersprüchliche Ergebnisse erhalten wurden, erfolgt eine ausführliche Diskussion der Daten in Kap. 5.9.5.

5.9.3 Zweidimensionale Proteintrennung modifiziert nach Görg et al.

Da die Auftrennung von Golgi-Proteinen durch die 2D-Elektrophorese nach Hartinger (s. Abb. 25) unvollständig ist, wurde das zweidimensionale Elektrophorese-System nach Görg [303,260] für die Trennung von Golgi-Proteinen adaptiert.

Die hier angewandte Variante der 2D-Elektrophorese nach Görg [260] bedient sich in der ersten Dimension eines trockenen PAA-Gelstreifens mit einem immobilisierten nichtlinearen pH-Gradienten von pH 3-10 (IPG-Streifen), der sich mit Probe-haltigem Laufpuffer rehydratisieren läßt. Der originale Probenextraktionspuffer nach Görg enthält:

9,0 M Harnstoff, 2 % (v/v) NP-40, 0,8 % (w/v) Ampholine pH 3,5-10, 2 % (v/v) β -Mercaptoethanol und 8 mM PMSF [303] und wurde für Membranprotein-haltige Proben wie folgt optimiert:

8,3 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 4 % (w/v) CHAPS, 10 mM DTE und 0,5 % (v/v) Pharmalyte pH 3-10 (nichtlinear).

Der Zusatz von Thioharnstoff zum Lysepuffer erhöht die Löslichkeit von Serumproteinen [304], sowie von Membranproteinen [305] und leicht zur Aggregation neigenden Proteinen wie Tubulin [306]. Durch den Austausch von NP-40 gegen 3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylammonium]-1-Propansulfonat (CHAPS) – einem chaotropen Reagenz - sowie von 1,4-Dithioerythritol (DTE) gegen β -Mercaptoethanol als Reduktionsmittel wird die Solubilisierung von integralen Membranproteinen und Membran-assozierenden Proteinen ebenfalls verbessert [307].

Mit dem so optimierten Extraktionspuffer, der gleichzeitig als Laufpuffer in der isoelektrischen Fokussierung verwendet wird, lassen sich analytisch bis zu 500 μ g Golgiprotein auftrennen (s. Abb. 26). Zu präparativen Zwecken sind Trennungen mit mehr als 2 mg Gesamtprotein möglich (nicht gezeigt). Die vorgeschlagene Extraktionszeit der Originalvorschrift wurde beibehalten, die

Optimierungsversuche ergaben jedoch, daß nur die anschließende hochoberflächige Zentrifugation mit $> 100000 \times g_{\max}$ für 30 Minuten und 25°C sowie die ausschließliche Verwendung des Überstandes (Probenpuffer) ein gutes zweidimensionales Elektropherogramm ergeben. Die Probenapplikation erfolgte nicht auf den bereits vorequilibrierten IPG-Streifen, sondern durch Rehydratisierung der trockenen 18 cm-IPG-Streifen im Probenpuffer. Dazu wurden je $350 \mu\text{L}$ Probe in einer Inkubationsrinne vorgelegt, der IPG-Streifen aufgelegt, die Rinne mit dünnflüssigem Parafin überschichtet und für 16-20 Stunden inkubiert [308]. Die Proteine werden bei dieser Vorgehensweise durch Diffusion schonend in das Gel überführt, und die angewandte Zeitspanne reicht völlig aus, die trockenen Immobiline-Gelstreifen zu rehydratisieren. Die isoelektrische Fokussierung wurde bei 20°C durchgeführt und in eine einstündige Vorlaufphase mit 400 V (max. 1 mA , max. 4 W) und eine Fokussierungsphase mit 3500 V für $87,5 \text{ kWh}$ (25 h) eingeteilt. Da die Stromstärke während der Fokussierungsphase auf 1 mA (4 W) begrenzt wurde, stieg die Spannung beim Übergang von Vorlaufphase zu Fokussierungsphase nicht sprunghaft, sondern kontinuierlich auf 3500 V an. Im Gegensatz zu anderslautenden Literaturangaben konnte die Fokussierungsphase nicht auf 24 kWh verringert werden, da unter diesen Bedingungen keine vollständige Fokussierung erfolgte.

Die Gelstreifen wurden zur Vorbereitung der anschließenden SDS-PAGE umequilibriert: Im ersten Schritt wurden die Gelstreifen für 15 Minuten mit 30% (w/v) Glycerin in SDS-PP [233] inkubiert und danach in einem zweiten Schritt 15 Minuten mit 30% (w/v) Glycerin und 481 mg Iodacetamid in SDS-PP behandelt. Zur elektrophoretischen Trennung in der zweiten Dimension wurde ein nichtlinearer SDS-haltiger $7,5\text{-}17,5 \%$ iger (w/v) Polyacrylamidgradient mit 20 cm Lauflänge verwendet und die Trennung bei einer Spannung von 100 V über Nacht durchgeführt. Zuerst wurden die zweidimensional analytisch aufgetrennten Proteine mit der Silberfärbung nach Heuvelskoven und Dernick [256] angefärbt. In der Optimierungsphase wurde jedoch auf die Silberfärbung nach Blum [309] übergewechselt. In dieser Silberfärbemethode ist Glutardialdehyd durch Formaldehyd ersetzt und Ethanol durch Methanol substituiert worden. Diese Maßnahmen sollten nach Literaturangaben [310] die Möglichkeit der massenspektroskopischen Peptidsequenzierung erlauben. Für präparative zweidimensionale Gele wurde die Coumassie-Färbung mit CBB R-250 beibehalten [311].

Ein typisches analytisches Golgi-Proteinmuster derart separierter Proteine zeigt Abb. 26.

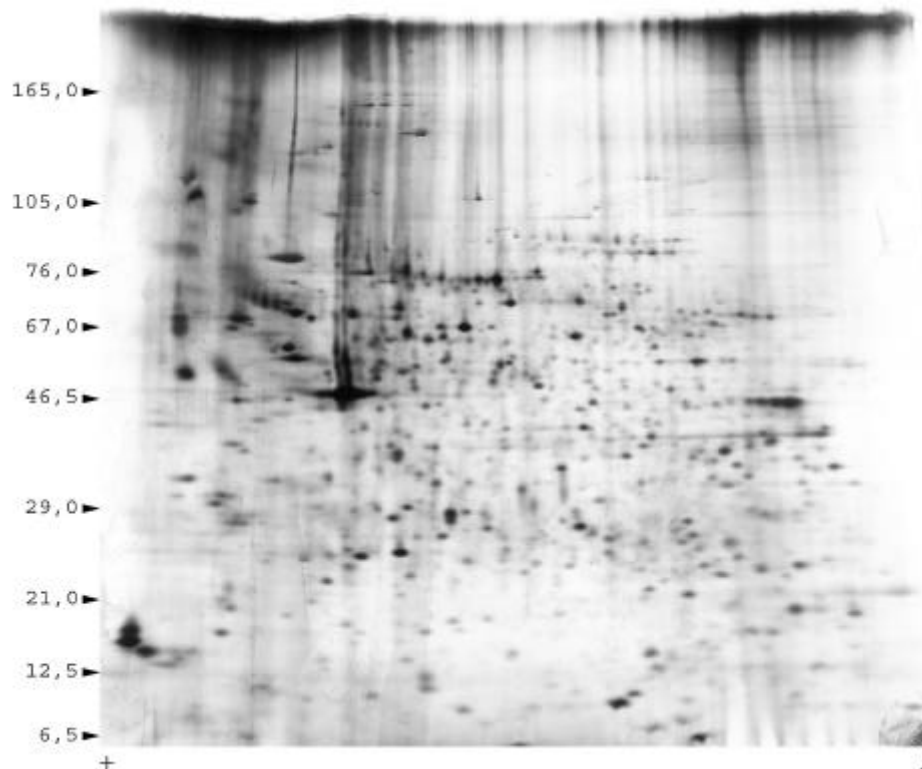


Abb. 26: Analytische 2D-Trennung von Proteinen aus Golgimembranen modifiziert nach Görg [260]

Der pH-Gradient bei der Elektrofokussierung in der 1. Dimension umfaßt einen Bereich von pH 3,5 (+) bis pH 9,5 (-) und ist etwa im Bereich von pH 4 bis pH 7 linear [308]. Die PAA-Konzentration bei der SDS-PAGE in der zweiten Dimension betrug 5 – 20 % (w/v). Die Proteine wurden durch Silberfärbung nach Blum [309] sichtbar gemacht. Die Molekulargewichte der verwendeten Standardproteine sind in kD angegeben.

Im Vergleich zur 2D-Elektrophorese nach Hartinger erhält man auch bei Einsatz großer Proteinmengen gut fokussierte Proteinmuster mit mehr als 500 identifizierbaren Flecken. Die besser separierten Proteinflecke sind deutlich kleiner und stärker konzentriert als in der 2D-Elektrophorese nach Hartinger. Beide Effekte verbessern Trennung und Detektion der Proteine und erhöhen dadurch die Signifikanz der Sequenzdaten.

5.9.3.1 In-vitro-Phosphorylierung der Proteine von isolierten Golgizisternen

Nach präparativer Phosphorylierung von angereicherten Golgimembranen in Gegenwart von Cytosol und PMA sowie in Abwesenheit bzw. unter Zusatz von Ro 31-8220, wurden die Golgizisternen isoliert. Die Golgiproteine wurden mit der in Kap. 4.2.1.4 beschriebenen Methode aufgetrennt und die gebildeten Phosphoproteine durch Phosphoimaging detektiert. Die bei Anwendung der verbesserten Methode resultierenden Phosphorylierungsmuster sind in Abb. 27 dargestellt.

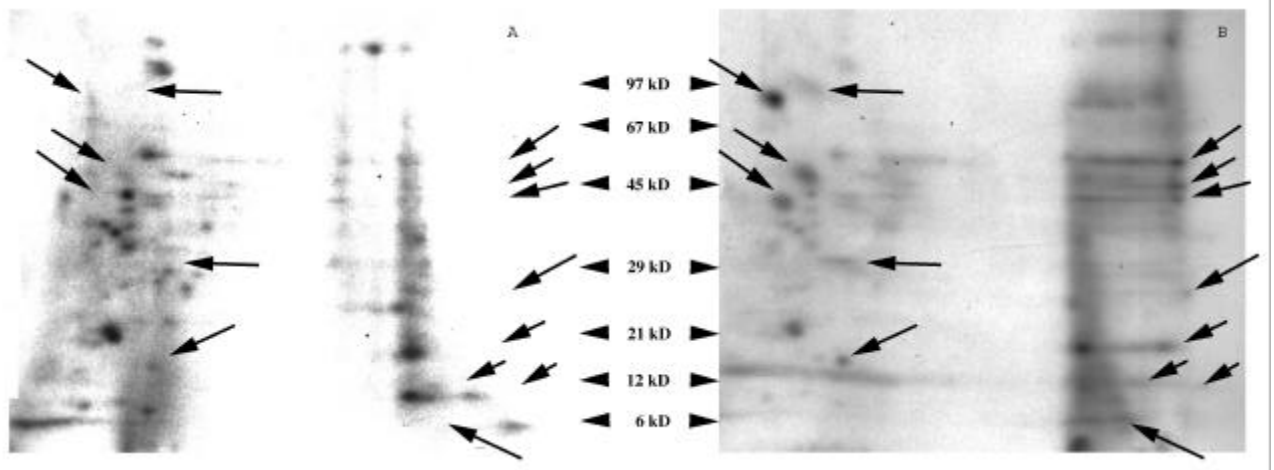


Abb. 27: Vergleich der Phosphorylierungsmuster angereicherter Golgi-Membranen nach präparativer *in-vitro*-Phosphorylierung in Gegenwart von Cytosol und Ro 31-8220 (A) sowie Cytosol und PMA (B).

2D-Elektrophorese modifiziert nach Görg. Die am stärksten markierten PKC-Substrate sind durch Pfeile markiert.

Die radioaktiven und die korrespondierenden Gelstücke aus dem Kontrollansatz wurden präpariert (s Tab. 13) ab S. 99) und mit massenspektroskopischer Peptidsequenzierung analysiert. Die erhaltenen Peptidsequenzen sind in Tab. 7 aufgeführt.

Tab. 7: Übersicht über die identifizierten potentiellen PKC-Substrate nach Peptidspaltung im Massenspektrometer (Q-TOF).

Nr	Probe	Proteingehalt nach CBB-Anfärbung	Δ cpm*	ermittelte Peptidsequenzen	Protein mit identischer Peptidsequenz**	Theor. MW, kD
G1	39+E	++	60	NQLTSNPENTVFDK	GRP78 (P11021)	72,1
G2	35+D	-	94	GDVTAEEAAGASPAK AAATPESQEPQAK	MacMarcks (P49006,)	19,4
G3	34+C	++	84	AVDPDGDGHVSWDEYK YSEFFTGSK	Cab45 (Maus, Q61112)	42,1
G4	45+G	+	131	YEELQITAGR TLLEGEESR	Cytokeratin 1 (P04264)	65,9
				EQISDIDDAVR	P15 (P53999)	14,3
G5	46+F	++	125	LGGSAVISLEGKPL	Cofilin (P23528)	18,5
G6	53	+	29	AVDPDGDGHVSWDEYK YSEFFTGSK	Cab45 (Maus, Q61112)	42,1
G7	54	+	25	AVDPDGDGHVSWDEYK YSEFFTGSK	Cab45 (Maus, Q61112)	42,1
G8	55	++	28	NQLTSNPENTVFDK	GRP78 (P11021)	72,1
G10	47	+	78	LVFLGEQSVGK	Rab6 (P20340)	23,6

-: keine Anfärbung. +: schwache Einfärbung. ++: deutliche Anfärbung durch CBB.

*: Radioaktiver Zerfall nach Abzug des Nullwertes.

** : Identifikation beruht auf dem Vergleich von Peptidmassen und massenspektroskopisch ermittelten Aminosäuresequenzen mit Datenbankinformationen

Nachgewiesen wurden die bereits bekannten PKC-Substrate (MacMARCKS (G2) und Rab6 (G10). Das identifizierte **Cytokeratin 1** (G4) gehört zur Familie der Intermediärfilament-Proteine. **Cab45** (CB45, G3) und **GRP78**/BiP (G1) werden als luminal Proteine des GA [312] und des ER beschrieben. **P15** (G4) ist ein Transkriptions-Koaktivator.

Die Aufzählung zeigt, daß keines der zuvor in der 2D-Elektrophorese nach Hartinger identifizierten PKC-Substrate mit der hier angewandten Methode wiedergefunden wurde. Dies muß im Nachhinein so gewertet werden, daß sich die Methode nach Hartinger nur in Ausnahmefällen zur Identifikation unbekannter Golgi-Proteine als PKC-Substrate eignet, und auch nur dann, wenn sich die Migrationseigenschaften der Proteine in beiden Dimensionen stark voneinander unterscheiden. Dies scheint noch am ehesten für kleinere Proteine gegeben zu sein.

Neben der erwarteten Phosphorylierung von Golgi-assoziierten Proteinen wie Rab6 und MacMARCKS wurden auch luminal Proteine markiert.

Ein Nachweis von luminalen Proteinen als potentielle PKC-Substrate (hier GRP78 und Cab45) in der in-vitro-Phosphorylierung könnte mehrere denkbare Ursachen haben:

1. Gegenwärtig ist nicht klar, ob die präparierten Golgizisternen intakt sind und die Phosphorylierung tatsächlich im luminalen Raum stattfindet. In diesem Fall muß [³²P]-γATP in das Golgilumen transloziert werden [313], und zusätzlich sollte eine PKC-Isoform oder eine durch Ro 31-8220-hemmbar Kinase im Golgilumen vorhanden sein.
2. Im Fall von GRP78 wird durch das nachgewiesene Protein entweder eine Verunreinigung der präparierten Golgi-angereicherten Membranen durch Bestandteile des ER-Kompartiments nachgewiesen, die sich mit der nach Beckers und Rothman [270] angewendeten Präparationsmethode nicht abtrennen lassen. Es könnte aber auch bedeuten, daß modifiziertes GRP78 zwischen ER und Golgi hin und her transloziert, was zu beweisen wäre.
3. Die Golgi-Kompartimente enthalten eine nachgewiesene luminal Kinaseaktivität [293], deren Substrate zur Zeit aber nicht bekannt sind.
4. Im Golgilumen könnte auch eine Autophosphorylierung von GRP78 [314] ablaufen, die durch vorhandene ATP-Transporter in der Golgimembran zusätzlich begünstigt wird [313] und [³²P]-γATP im Golgilumen ca. 40fach anreichert.
5. Sollten perforierte Membranen oder „inside out“-Vesikel vorliegen, könnte eine Phosphorylierung luminaler Proteine auch durch cytoplasmatische PKC erfolgen.

5.9.3.2 In-situ-Phosphorylierung in permeabilisierten HepG2-Zellen

Der Nachweis einer in-vitro-Phosphorylierung kann zwar als erster Hinweis auf eine biologische Bedeutung dieser Modifizierung gewertet werden, ist aus den oben genannten Gründen aber keine Garantie für eine biologische Relevanz in vivo. Insbesondere die Identifizierung von luminalen Proteinen machte die Untersuchung der in-situ-Phosphorylierung permeabilisierter HepG2-Zellen notwendig, um zu überprüfen, inwieweit die beobachteten Phosphorylierungen auch bei einem wenig oder nicht fragmentierten Golgiapparat auftreten.

Dazu wurden PKC-Substrate in permeabilisierte HepG2-Zellen in Gegenwart von $GTP\gamma S$, Ca^{2+} , PMA und Phosphataseinhibitoren durch endogene PKC α phosphoryliert (s. Kap. 4.2.4.4). Die schwache, gut reproduzierbare Phosphorylierung am Golgiapparat permeabilisierter Zellen unterscheidet sich stark von der in-vitro-Phosphorylierung Golgi-angereicherter Membranen in Gegenwart von Cytosol, wie ein Vergleich von Abb. 28A und B zeigen.

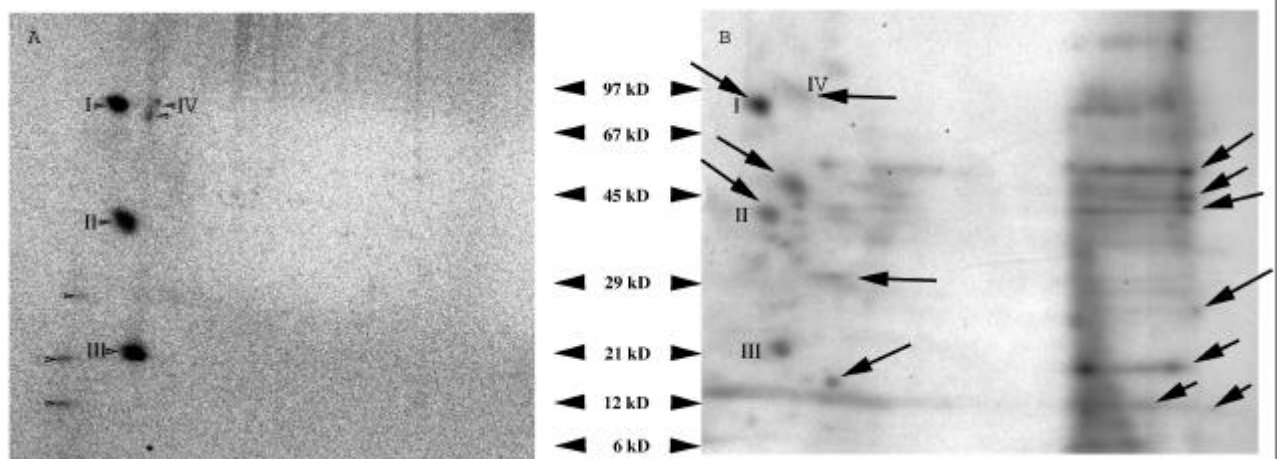


Abb. 28: Gegenüberstellung der in-situ-Phosphorylierung permeabilisierter HepG2-Zellen (A) und der in-vitro-Phosphorylierung angereicherter Golgimembranen (B) in Gegenwart von PMA.

Pfeilspitzen in A markieren die PKC-spezifische Phosphorylierung von Golgi-proteinen in den permeabilisierten Zellen. Pfeile in B markieren die PKC-abhängigen Phosphorylierungssignale der in-vitro-Phosphorylierung. Übereinstimmungen sind durch die Bezeichnungen I - IV hervorgehoben.

Es sind wesentlich weniger Phosphorylierungen in der in-situ-Phosphorylierung zu beobachten als in der in-vitro-Phosphorylierung. Die gut nachweisbaren Phosphoproteine beschränken sich in der in-situ-Phosphorylierung ausschließlich auf den sauren (linken) Bereich des Elektrochromatogramms. Zum Nachweis der PKC-abhängigen Modifizierung wurden Ro 31-8220 und Gö 6976 eingesetzt. Die Auftrennung der modifizierten Proteine ergibt unter Einsatz von Gö 6976 folgende Phosphoimager-Signale:

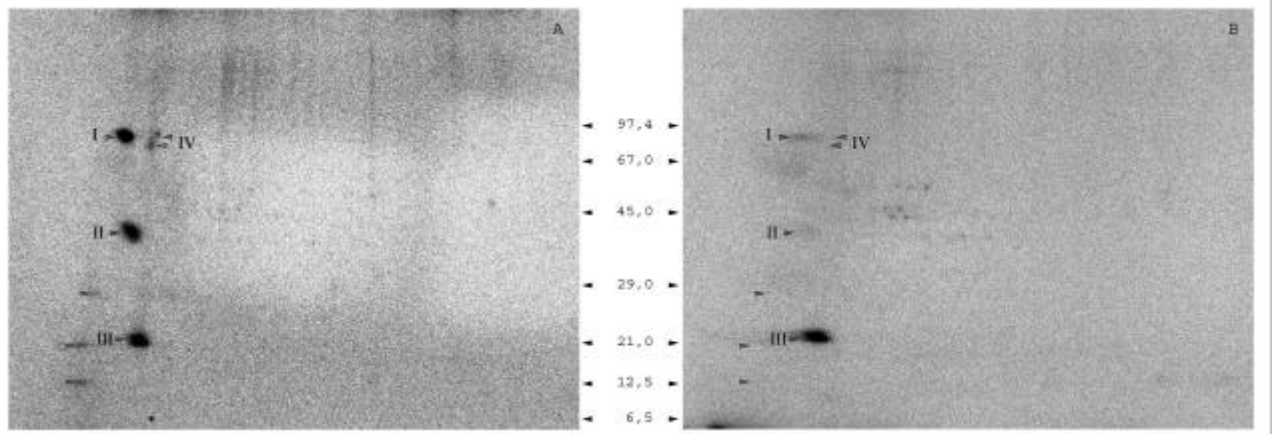


Abb. 29: In-situ-Phosphorylierung von Golgi-proteinen permeabilisierter HepG2-Zellen in Gegenwart von PMA (A) und Gö 6976 (B)

Die ausgehöhlten Pfeilspitzen markieren in beiden Abbildungen die Orte der PKC-spezifischen Phosphorylierungsprozesse.

Die Phosphorylierung der PKC-Substrate I, II und IV ist durch Gö 6976, einem spezifischen Inhibitor der cPKCs, charakteristisch hemmbar (s. Abb. 29). Im Gegensatz dazu wird PKC-Substrat III, das in der in-vitro-Phosphorylierung durch Ro 31-8220 hemmbar ist, wahrscheinlich von nPKCs phosphoryliert, da der PKC-spezifische Inhibitor Ro 31-8220 alle PKC-Isoformen hemmt. Die Übereinstimmung der in-situ-Phosphorylierung mit der in-vitro-Phosphorylierung der bereits erwähnten PKC-Substrate I - VI läßt sich reproduzieren und wird deshalb in der Abb. 30 dargestellt.

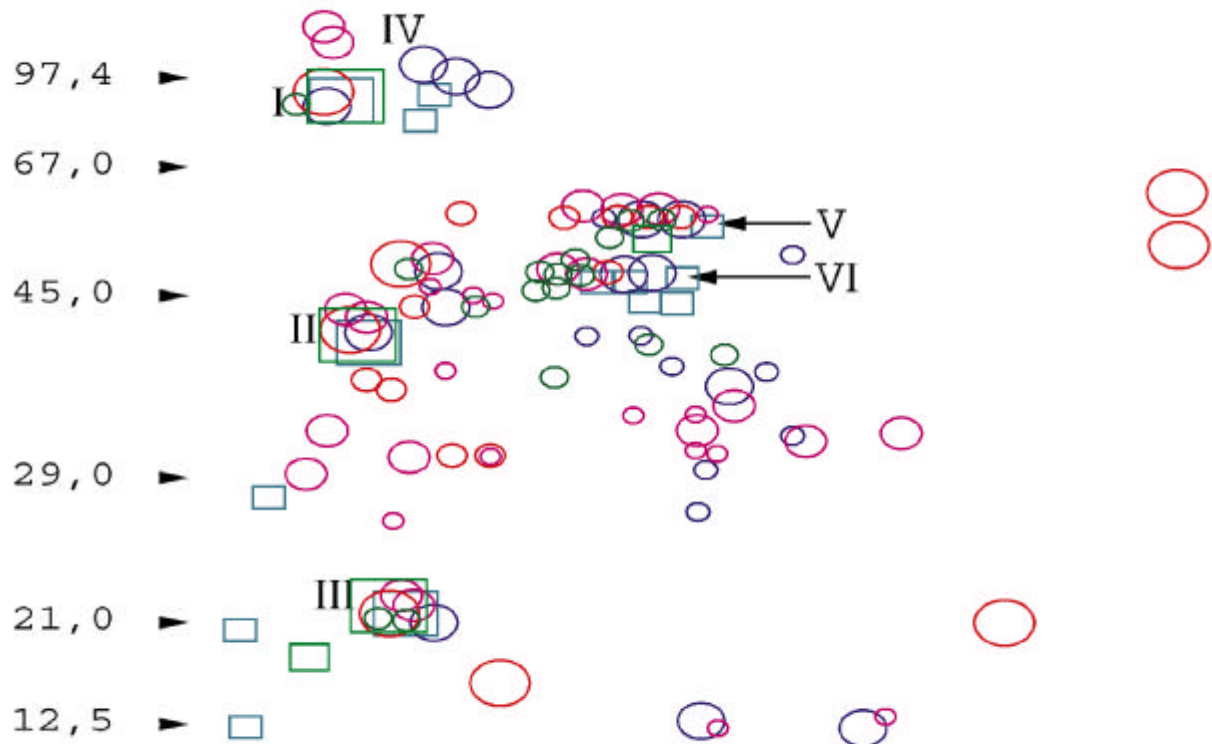


Abb. 30: Überlagerung mehrerer *in vitro* und *in-situ*-Phosphorylierungsmuster von angereicherten Golgimembranproteinen in Gegenwart von PMA

Die Phosphorylierungsereignisse werden vereinfacht als Konturen dargestellt. I - VI: Phosphorylierungssignale, die sowohl *in vitro* als auch *in situ* zu detektieren sind. \circ \square \circ \square : Markierung von vier *in vitro*-Phosphorylierungsmustern angereicherter Golgimembranen in Gegenwart von Cytosol. \square \square : Bezeichnung der *in-situ*-Phosphorylierung permeabilisierter HepG2-Zellen. Die Pfeile kennzeichnen zwei weitere Bereiche (V und VI) mit hoher Übereinstimmung zwischen *in situ* und *in vitro*-Phosphorylierung (s.u.).

Auch bei dieser Darstellung lässt sich die Modifizierung der hauptsächlichen PKC-Substrate I - VI in den Elektropherogrammen der *in vitro*- bzw. *in-situ*-phosphorylierten Golgiproteine deutlich nachweisen. Die zusätzlich markierten Proteine V und VI in Abb. 30 zeigen Phosphoproteine, die nach eingehendem Vergleich der verschiedensten 2D-Phosphorylierungsmuster sowohl in der *in vitro*- als auch in der *in-situ*-Phosphorylierung als PKC-Substrate eingestuft werden konnten. Zur Bestätigung der Ergebnisse der *in vitro*-Phosphorylierung aus Kap. 5.9.3.1 wurden zusätzlich dazu die in Abb. 30 markierten PKC-Substrate I - IV mit CBB gefärbten Gelen der *in-situ*-Phosphorylierung präpariert und zur Sequenzierung eingereicht. Nach Präparation der zugehörigen Gelstücke wurden die Proben zur massenspektroskopischen Identifikation eingereicht (s. Tab. 8).

Tab. 8: Identifikation zusätzlicher potentieller PKC-Substrate nach Vergleich von in-vitro- und in-situ-Phosphorylierungsmustern

Probe	CBB-Anfärbung (Proteingehalt)	ermittelte Peptidsequenzen	MW, kD (geschätzt)	Δ cpm	Protein mit identischer Peptidsequenz	Theor. MW, kD
I	+/-	-	90	n.n.	MARCKS #8 (P29966)	31,4
II	-	s. Tab. 7	42	n.n.	MacMARCKS (P49006)	19,4
III	+/-	EAFNMoxIDQNR LNGTDPEDVIR FTDEEVDELYR GNFNYIEFTR	22	n.n.	regulatorische leichte Kette des Myosinkomplexes 2A (P19105)	19,7
IV	-	n.n.	100	n.n.	-	-
V	+/-	LSELEAALQR LQAEIEGLK AQYEDIANR LEGLTDEINFLR TEMENEFVLIK LVSESSDVLPK	50	n.n.	Cytokeratin 8 (P05787)	53,5
VI	+/-	VIDDTNITR STFSTNYR AQYDELAR ETMoxQSLNDR RQSVENDIHGLR SLGSVQAPSYGAR	48	n.n.	Cytokeratin 18 (P05783)	47,9

#8: durch Immundetektion nachgewiesen (s. Kap. 5.9.4.2).

-: keine CBB-Anfärbung.

+/-: schwache Anfärbung.

n.n.: Zum Zeitpunkt der Probengewinnung war die Markierung der Proteine bereits zu stark abgeklungen, um noch bestimmt zu werden.

PKC-Substrat I konnte durch massenspektroskopische Peptidsequenzierung nicht identifiziert werden, ließ sich jedoch immunologisch als MARCKS bestimmen (s. Kap. 5.9.4.2). PKC-Substrat II war bereits als MacMARCKS ermittelt worden (s. Tab. 7), und PKC-Substrat III konnte als regulatorische leichte Kette des Myosinkomplexes (MLRM 2A) identifiziert werden.

PKC-Substrat IV konnte wie PKC-Substrat I nicht identifiziert werden, da bei Anwendung der hochempfindlichen massenspektroskopischen Sequenzierungsmethoden derzeit nur Proteine identifiziert werden können, die in Mengen von mindestens 1 - 10 pMol aus den präparierten Gelstücken isolierbar sind, d.h. die noch mit Coomassie anfärbbar sind. Proteine aus Silbergefärbten Gelen sind nur unter großen Schwierigkeiten zu sequenzieren (s. [315]), wofür die technischen Voraussetzungen im Versuchszeitraum nicht zur Verfügung standen.

Die Proben V und VI konnten als **Cytokeratin 8** und **Cytokeratin 18** identifiziert werden. Sie gehören wie das Cytokeratin 1 zur Familie der Intermediärfilament-bildenden Proteine. Ihre Lokalisation am Golgiapparat von HepG2-Zellen ist bisher nicht beschrieben.

5.9.3.3 Nachweis von PKC-Substraten **durch** immunologische Identifizierung

Durch Elektrophorese nach Hartinger konnten Profilin I und Annexin IV als potentielle in-vitro-PKC-Substrate identifiziert werden (s. 5.9.2).

Zur Überprüfung dieser Ergebnisse wurden die durch 2D-Elektrophorese nach Görg getrennten Proteine auf NC transferiert und ihre radioaktive Markierung mit spezifischen Immunsignalen korreliert.

Ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch **Profilin I** erkennt, wurde von Frau Prof. Dr. B.M. Jockusch (TU Braunschweig) zur Verfügung gestellt. Den Vergleich der in-vitro-Phosphorylierung von Golgiproteinen mit dem Antikörpernachweis von anti-Profilin I zeigt Abb. 31.

Für Profilin I wird nach 2D-Elektrophorese und Proteintransfer auf NC nur ein Proteinfleck nachgewiesen (s. Pfeil, Abb. 31A). Das Signal des Profilin I-spezifischen Antikörpers ist dagegen langgezogen und in den sauren pI-Bereich verlängert (s. ⊗) und könnte somit auf eine post-translationale Phosphorylierung [316] oder Acetylierung des N-Terminus hindeuten [119].

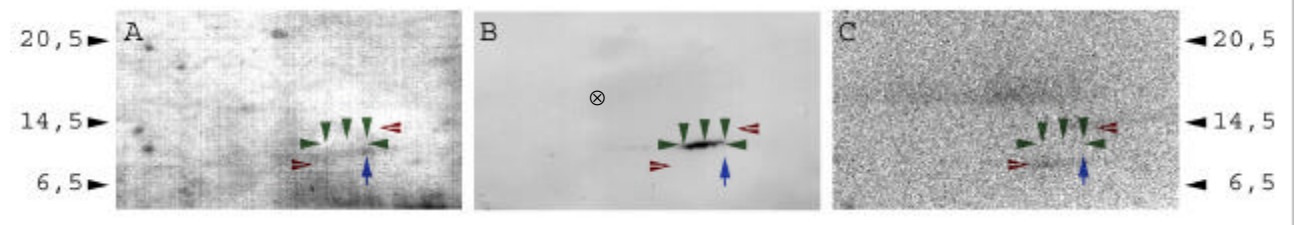


Abb. 31: Versuchte Kolokalisation des anti-Profilin I Nachweises mit der radioaktiven Markierung im Western Blot der in-vitro-Phosphorylierung von Golgiproteinen in Gegenwart von PMA

A: PonceauS-Proteinanfärbung der transferierten Golgiproteine.

B: DAB-Anfärbung des anti-Profilin I Nachweises.

C: [³²P]-Markierung durch PMA-stimulierte in-vitro-Phosphorylierung.

Pfeile markieren die Proteinanfärbung auf dem Westernblot.

Pfeilspitzen stellen das Antikörpersignal für anti-Profilin I dar und ausgehöhlte Pfeilspitzen markieren die nachweisbare in-vitro-Phosphorylierung von Proteinen.

Auf der Höhe des anti-Profilin I-Nachweises in Abb. 31B läßt sich jedoch keine [³²P]-Markierung nachweisen (s. Abb. 31C). Ein deutliches Phosphorylierungssignal befindet sich dagegen unterhalb des Immunsignals. Die verbesserte zweidimensionale Trennung nach Görg et al. [260,303] zeigt, daß die mit der 2D-Elektrophorese nach Hartinger nachgewiesene potentielle Phosphomarkierung

des Profilin I wohl einem bisher unbekanntem PKC-Substrat zugeordnet werden muß (s. ausgehöhlte Pfeilspitze unter dem Immunsignal in Abb. 31B).

Eine PKC-abhängige Phosphorylierung von Profilin I kann in HepG2-Zellen zwar nicht vollständig ausgeschlossen werden [316], könnte aber aus den oben genannten Gründen zu dem falschen positiven Ergebnis in Kap. 5.9.2 geführt haben.

Mit Hilfe eines **Annexin IV**-spezifischen monoklonaler Antikörper (Dianova) wurde Annexin IV im 2D-Gel nach Görg identifiziert (Abb. 32B).

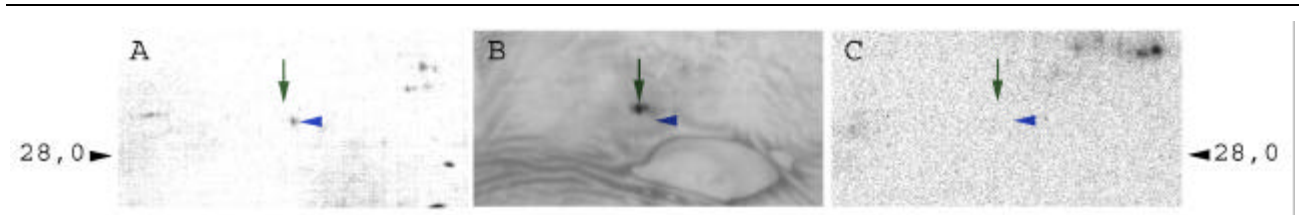


Abb. 32: Fehlende Kolokalisation des anti-Annexin IV-Signals mit der radioaktiven Markierung der in-vitro-Phosphorylierung von Golgiproteinen in Gegenwart von PMA

A: Ponceau S-Proteinanfärbung der Transfermembran.

B: DAB-Anfärbung des anti-Annexin IV Nachweises.

C: [³²P]-Markierung der in-vitro-Phosphorylierung.

Der Pfeil markiert das Antikörpersignal auf der Transfermembran.

Die Pfeilspitze in den Ausschnitten A-C stellt die Proteinanfärbung auf der Blotmembran dar.

Die Pfeilspitze am rechten Rand der Bildausschnitte gibt die Position des Molekulargewichtsmarkers wieder.

Annexin IV ist als homogener Fleck in der Immunanfärbung nachweisbar und zeigt keine [³²P]-Markierung, so daß eine in-vitro-Phosphorylierung durch PKC-Isoformen ausgeschlossen werden muß. Eine Anfärbung des Annexin IV mit Ponceau S war nicht möglich. Die im 2D-Gel nach Hartinger nachgewiesene [³²P]-Markierung muß daher einem anderen Phosphoprotein zugeordnet werden, das aufgrund einer zu geringen Konzentration durch die Mikrosequenzierung nicht erfaßt wird.

5.9.4 Immunologischer Nachweis der durch massenspektroskopische Peptidsequenzierung identifizierten potentiellen PKC-Substrate in den Golgi-Präparaten

Um die PKC-Substrate mit den massenspektroskopisch identifizierten Proteinen korrelieren zu können, wurden Golgiproteine erst eindimensional und zweidimensional aufgetrennt, auf NC transferiert und soweit möglich immunologisch nachgewiesen. Die Detektionsmuster aus der Immundetektion wurden anschließend mit den Phosphorylierungsmustern von Golgiproteinen aus permeabilisierten HepG2-Zellen verglichen.

Eine immunologische Detektion aller massenspektroskopisch nachgewiesenen potentiellen PKC-Substrate war nicht möglich, da für einige Proteine - wie MacMARCKS, P15, λ -Immunglobulin und Endobrevin - kein Antikörper zu erhalten war.

5.9.4.1 Immunnachweis der potentiellen PKC-Substrate in Gewebs- und Zellextrakten

Als Vorstufe der zweidimensionalen Immunlokalisation der potentiellen PKC-Substrate wurde die Spezifität der einsetzbaren Antikörper in verschiedenen Zellfraktionen und Gewebeextrakten untersucht. Einen Überblick über die erhaltene Immundetektion vermittelt Tab. 9.

Tab. 9 : eindimensionaler immunologischer Nachweis der potentiellen PKC-Substrate

Antikörper	Rattenhirnextrakt (Positivkontrolle)	Cytosol aus HepG2-Zellen	TM aus HepG2-Zellen	Golgimembranen aus HepG2-Zellen
LycC	n.b.	-	+	+
AnxIV	n.b.	++	n.b.	+
Cab45	+	+	n.b.	n.b.
Pro1	+	++	+	+
MARCKS	n.b.	+	+	n.b.
GRP78	n.b.	++	+++	n.b.
MacMARCKS [317]	n.n.	n.n.	++	n.n.
Rab6	++	+	n.b.	+
Rab7	n.b.	(+)	+	+
Rab8	+	(+)	++	n.b.
VAMP2	-	+	++	+
CK18	n.b.	++	+	n.b.
CK8	n.b.	++	+	n.b.

n.n.: nicht nachweisbar. n.b.: nicht bestimmt. +++ bis +: gut erkennbare Chemilumineszenzsignale.

(+): schwaches Signal der Chemilumineszens. -: kein Signal in der Chemilumineszenzreaktion.

Alle drei massenspektroskopisch nachgewiesenen Rab-Proteine (Rab6, Rab7 und Rab8) lassen sich eindimensional in der TM von HepG2-Zellen nachweisen (s. Tab. 9). **Rab6** und **Rab7** sind zusätzlich in der Golgifraktion von HepG2-Zellen immunologisch zu detektieren.

VAMP2 ist sowohl in TM als auch in Golgimembranen von HepG2-Zellen immunologisch nachweisbar. Im HepG2-Cytosol zeigt der VAMP2-Antikörper ein Immunsignal bei etwa 40 kD, hierbei könnte es sich z.B. um einen SNARE-Komplex handeln.

Cytokeratin 8 (CK8) und Cytokeratin 18 (**CK18**) sind überwiegend im HepG2-Cytosol detektierbar, der Nachweis in der gereinigten TM ist eindeutig.

Lysozym C (LycC) läßt sich wie für ein Transportprotein erwartet, in der TM-Fraktion und im Golgi nachweisen, nicht jedoch im Cytosol. Das Immunsignal ist jedoch schwächer als das CK18-Immunsignal in der TM-Fraktion.

Cab45 läßt sich nur im Rattenhirnextrakt und Cytosol von HepG2-Zellen nachweisen.

GRP78 ist sowohl im Cytosol als auch in der TM-Fraktion von HepG2-Zellen detektierbar.

MacMARCKS konnte durch Kooperation mit Dr. Sally Corradin (Genf) immunologisch in der TM-Fraktion von HepG2 nachgewiesen werden [317].

Da die kommerziell verfügbaren Antikörper in ihrer Qualität und Anwendbarkeit große Unterschiede aufwiesen, stellen die erhaltenen Immunsignale lediglich eine erste Abschätzung der zu erwartenden 2D-Nachweisbarkeit der potentiellen PKC-Substrate dar. So ist zu erwarten, daß LysozymC aufgrund seines nur schwachen Immunsignals nur sehr schlecht zweidimensional nachweisbar sein wird. Der parallele Nachweis der potentiellen PKC-Substrate Rab6, Rab7 und Rab8 sollte aber prinzipiell möglich sein.

5.9.4.2 2D-Nachweis der potentiellen PKC-Substrate

Einen Überblick über die erfolgreiche 2D-Lokalisation massenspektrometrisch identifizierter Proteine in angereicherten Golgifraktionen aus HepG2-Zellen dokumentiert Abb. 33:

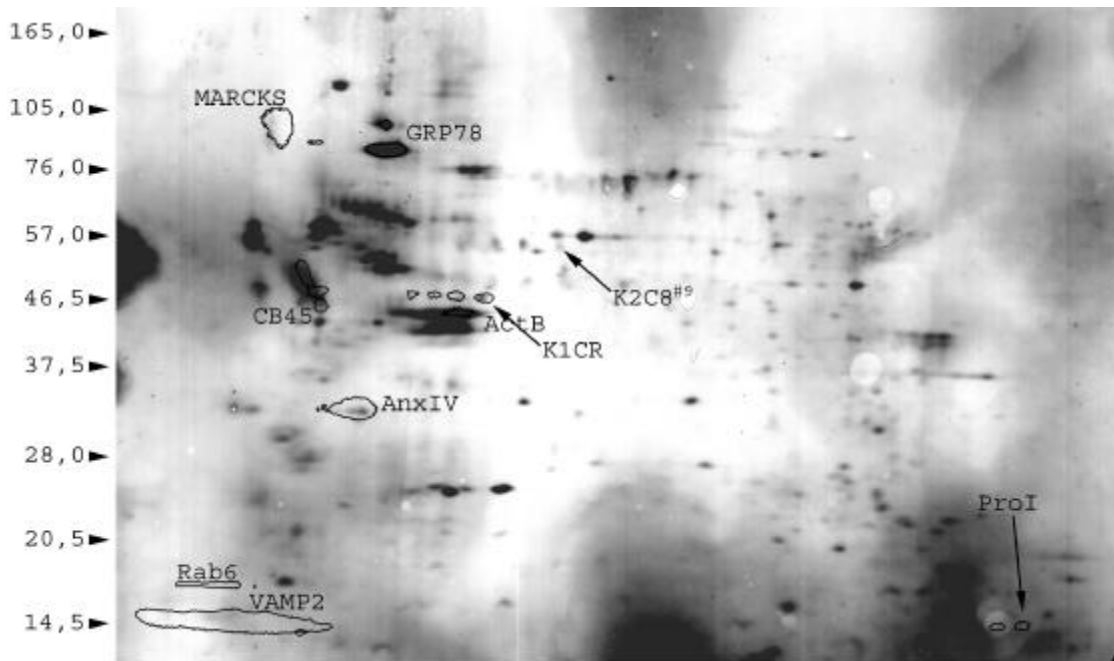


Abb. 33: 2D-Immunlokalisation potentieller PKC-Substrate in Golgi angereicherten Membranen permeabilisierter HepG2-Zellen.

Die Immunsignale der immunologisch identifizierten Proteine werden als Konturen wiedergegeben.

ActB: β -Aktin;

K2C8: Cytokeratin 8;

K1CR: Cytokeratin 18;

CB45: Cab45;

Wurden von einem Antikörper mehrere Immunsignale erzeugt, ist das Hauptsignal beschriftet.

Die Molekulargewichte am Rand der Abbildung sind in kD angegeben.

^{#9} : Die Zuordnung von Cytokeratin 8 erfolgte nach Peptidsequenzierung

Von den potentiellen PKC-Substraten konnten MARCKS, Rab6, Cytokeratin 8 (K2C8), Cytokeratin 18 (K1CR), Annexin IV (AnxIV), Profilin I (ProI), GRP78, Cab45 (CB45) und Synaptobrevin 2 (VAMP2) zweidimensional in Golgiproteinen lokalisiert werden (s. Abb. 33). Für Rab7, Rab8 und Lysozym C konnte dagegen kein zweidimensionaler Immunnachweis in Golgiproteinen erhalten werden.

5.9.5 Zusammenfassung der Daten zur Identifizierung und Phosphorylierung von Golgi-assoziierten Proteinen und ihre mögliche Bedeutung für die Vesikelbildung am TGN

5.9.5.1 Die bevorzugten PKC-Substrate, MacMarcks, MARCKS und die regulatorische leichte Kette des Myosinkomplexes 2A

5.9.5.1.1 MacMARCKS

MacMARCKS wurde nach in-vitro-Phosphorylierung und 2D-Elektrophorese nach Görg durch massenspektroskopische Peptidsequenzierung als potentielles PKC-Substrat an der Golgimembran identifiziert (s. Tab. 7, Probe G2). Die Phosphorylierung des Proteins ließ sich auch in permeabilisierten HepG2-Zellen durch Vergleich der Phosphoproteinmuster nachweisen (s. Abb. 28, Bezeichnung II). Immunologisch konnte MacMARCKS bisher nur in der TM-Fraktion von HepG2-Zellen nachgewiesen werden [317].

Da MacMARCKS sowohl in vitro (3 phosphorylierbare Aminosäurereste) als auch in vivo durch PKC phosphoryliert wird [318], stellt der Nachweis dieses Proteins am Golgi einen interessanten Befund dar. Über MacMARCKS ist sonst relativ wenig bekannt. Sein Nachweis an der Golgimembran ist bisher nicht beschrieben. In PC12-Zellen konnte es im perinukleären Raum lokalisiert werden [119]. Aufgrund seiner Homologie zu MARCKS könnte es jedoch wie dieses die Wirkung von PLC hemmen [319] und PLD stimulieren [320]. Die Befunde über MARCKS könnten darauf hinweisen, daß das z.T. homologe MacMARCKS möglicherweise auch an der Vesikelbildung beteiligt ist.

5.9.5.1.2 MARCKS

MARCKS wurde durch Immunlokalisation zuerst eindimensional (s. Kap. 5.9.4.1) und anschließend zweidimensional (s. Kap. 5.9.4.2) in aufgetrennten Golgiproteinen nachgewiesen. Nach Korrelation von Immunoblots mit Phosphoproteinmustern kann die Identität von PKC-Substrat I (s. Kap. 5.9.3.2) als die des MARCKS bestätigt werden.

MARCKS wird in vitro [321] als auch in vivo [322,323] von PKC phosphoryliert. Desweiteren bindet MARCKS in vivo und in vitro an PKC [324] und assoziiert in Abhängigkeit von seinem Phosphorylierungszustand mit Calmodulin als auch mit sauren Phospholipiden wie PIP₂ [325]. Da durch die PKC-abhängige Phosphorylierung die Membranbindung von MARCKS reguliert wird [238], MARCKS bereits an der Plasmamembran und den Lysosomen nachgewiesen werden konnte [326] und die Überexpression von MARCKS in humanen Neuroblastomazellen die PKC-abhängige Stimulierung von Phospholipase D unterstützte [320], kommt der Lokalisation an der Golgimembran, die bisher nicht beschrieben wurde, eine besondere Bedeutung für die Regulation der PKC am Golgi zu. Da Aktinfilamente vom phosphoryliertem MARCKS vernetzt werden [327],

und erst während der Arbeit gezeigt wurde, daß die Vesikelhülle von COPI-umhüllten Vesikeln β/γ -Aktin enthalten [328] bzw. Aktinfilamente als essentiell für die Morphologie des GA angesehen werden [329], könnte auch PKC als Effektor von MARCKS eine wichtige Rolle bei der Regulation dieser Prozesse zukommen.

5.9.5.1.3 Regulatorische leichte Kette des Myosinkomplexes 2A

Die Identifizierung von PKC-Substrat III als regulatorische leichte Kette des Myosinkomplexes 2A (MLRM 2A) und dessen bereits beschriebener Phosphorylierbarkeit durch PKC in vitro [182] und in vivo [330] unterstreichen ein zweites Mal die Bedeutung des Myosinkomplexes für die Vesikelbiogenese am Golgi. Zum ersten Mal wurde die Bedeutung des Myosinkomplexes für die Vesikelbiogenese durch Untersuchungen zu Myosin II herausgearbeitet. Zuerst wurde in vitro nachgewiesen, daß Myosin II direkt an Phospholipid-haltige Vesikel binden kann [331]. Schließlich konnte nachgewiesen werden, daß das Protein in vivo am GA und post-Golgi-Vesikeln gebunden ist [30] und eine Depletierung von Myosin II die in-vitro-Vesikelbiogenese am TGN hemmt [251]. Die Phosphorylierbarkeit durch PKC wurde an fünf Aminosäureresten (S1, S2, T7, T8 und T9) nachgewiesen [330]. Die Phosphorylierung an den Aminosäureresten T7, T8 und T9 inhibiert die Aktin-aktivierte Actomyosin ATPase und die Phosphorylierung des Aminosäurerestes S19 durch die „Myosin light chain kinase“ (MLCK) [330], was zum Abbau der Aktin-Stressfasern führt. Da MARCKS von PKC gebunden und phosphoryliert wird (s. Kap. 5.9.5.1.2), Calmodulin an unphosphoryliertes MARCKS bzw. von phosphoryliertem MARCKS freigesetzt wird [318] und MLCK durch Calmodulin stimuliert wird [332], könnte der Nachweis der Golgiassoziation von MRLC 2A auf einen bisher unbekanntem Mechanismus der Regulation des konstitutiven Vesikeltransportes durch PKC hindeuten.

Auf eine Beteiligung von MRLC 2A am Vesikeltransport könnte auch der Befund hinweisen, daß die Antigen-induzierte Sekretion von RBL-Zellen mit der Phosphorylierung von MRLC 2A durch PKC korreliert [182].

5.9.5.2 Rab-Proteine

Rab6, **Rab7** und **Rab8** sind zur Gruppe der Vesikel-assoziierten Proteine zu zählen.

5.9.5.2.1 Rab6

Rab6 konnte durch Sequenzierung (s. Tab. 7, G10) und Immundetektion (s. Abb. 33) im Golgi nachgewiesen werden. Seine zweidimensionale Lokalisation in Golgimembranen aus permeabilisierten HepG2-Zellen bestätigt seine massenspektroskopische Identifikation als in-vitro-PKC-Substrat (s. Abb. 33). In permeabilisierten HepG2-Zellen ist zwar ein PKC-Substrat in der Nähe des Rab6-Immunsignals nachweisbar, die Korrelation mit dem Immunsignal aber ungenügend

um dessen Identität als Rab6 bestätigen zu können. Möglicherweise zeigt phosphoryliertes Rab6 aufgrund von Konformationsänderungen ein stark abweichendes Mobilitätsverhalten oder wird unter den in situ Bedingungen vor einer Phosphorylierung durch PKC umfangreicher geschützt als dies in vitro der Fall ist.

Daß Rab6 überhaupt als PKC-Substrat in-vitro-Phosphoryliert werden kann, wurde im Verlauf der eigenen Arbeiten erstmals durch Fitzgerald und Reed 1999 publiziert [333]. Welche der vier potentiellen PKC-Phosphorylierungsstellen (T61, T104, T113 oder S156) in Blutplättchen nach PMA-Stimulation durch PKC phosphoryliert werden, ist zur Zeit aber nicht bekannt [333].

Die Bedeutung von **Rab6** für die Vesikelbiogenese ist bereits beschrieben [334].

Rab6 bildet einen cytosolischen Komplex mit p62, es assoziiert aber auch mit TGN38/41 [334] und könnte an der Ausbildung von Vesikelhülle(n) beteiligt sein.

5.9.5.2.2 Rab7

Der Nachweis der Phosphorylierung von Rab7 (s. Tab. 6, 2), wie aufgrund der Ergebnisse der 2D-Elektrophorese nach Hartinger vermutet wurde, konnte durch 2D-Elektrophorese nach Görg nicht bestätigt werden. Die Golgiassoziation konnte zwar mit einem Rab7-spezifischen Antikörper im Westernblot immunologisch eindimensional nachgewiesen werden (Kap. 5.9.4.1). Eine 2D-Immunlokalisation von Rab7 gelang im Versuchszeitraum dagegen nicht.

5.9.5.2.3 Rab8

Obwohl **Rab8** (s. Tab. 6, 3) als potentielles in-vitro-PKC-Substrat nach 2D-Elektrophorese nach Hartinger und Peptidsequenzierung identifiziert wurde, und das Protein bereits am Golgi lokalisiert wurde [335] (s. Kap. 5.9.4.1), ließ sich mit dem Rab8-spezifischen Antikörper kein immunologischer Nachweis im zweidimensionalen Golgiproteinmuster erhalten und die PKC-abhängige Phosphorylierung in permeabilisierten HepG2-Zellen somit nicht überprüfen. Für Rab8 ist eine Phosphorylierung nach Thrombin-Stimulierung von Blutplättchen durch eine bisher nicht identifizierte Kinase bereits beschrieben [336]. Rab8 könnte jedoch auch durch die Kinase rab8ip/GC phosphoryliert werden, die mit Rab8 assoziiert [337]. Da eine Beteiligung von Rab8 am post-Golgi Vesikeltransport zur basolateralen Plasmamembran [335,338] sowie an Transportprozessen in neuronalen Dendriten nachgewiesen wurde [339], könnte Rab8 auch den konstitutiven Transport regulieren und sollte in zukünftigen Studien weiter untersucht werden.

5.9.5.3 Cytokeratine

Der Aufbau des **Cytokeratin**-abhängigen Cytoskeletts von Hepatocyten wird durch eine rasche Abfolge von Phosphorylierungs- und Dephosphorylierungsschritten kontrolliert [340]. PKCε wird für die Phosphorylierung einiger Cytokeratine verantwortlich gemacht [210]. Cytokeratine konnten

bisher nur in neugeborenen Ratten am trans-Golgi und TGN nachgewiesen werden, die zuvor im Uterus hohen Ethandosen ausgesetzt wurden [341].

5.9.5.3.1 Cytokeratin 1

Für das zur Intermediärfilament-Familie gehörende und nach 2D-Elektrophorese nach Görg mittels MS identifizierte potentielle in-vitro-PKC-Substrat **Cytokeratin 1** (s. Tab. 7, G4) ist zur Zeit keine PKC-abhängige Phosphorylierung bekannt. Da der Cytokeratin 1-spezifische Antikörper keine 2D-Immunlokalisation ermöglichte, konnte auch dessen PKC-abhängige Phosphorylierung in permeabilisierten HepG2-Zellen nicht überprüft werden.

Der Nachweis von Cytokeratin 1 am Golgiapparat ist neu und könnte auf eine Wechselwirkung von Intermediärfilament und Golgiapparat hindeuten.

5.9.5.3.2 Cytokeratin 8 und Cytokeratin 18

Für **Cytokeratin 18** (K1CR, PKC-Substrat VI, s. Tab. 8), das nach massenspektroskopischer Peptidsequenzierung als potentielles PKC-Substrat identifiziert werden konnte, gelang auch die zweidimensionale Immundetektion durch einen Cytokeratin 18-spezifischen Antikörper der Fa. Onkogene. Die immunologische Identifizierung von Cytokeratin 18 konnte anschließend mit der in-vitro-Phosphorylierung korreliert werden. Durch Vergleich der Immunsignale mit den Phosphorylierungsmustern der Golgi-Proteine aus den permeabilisierten HepG2-Zellen konnte nachgewiesen werden, daß Cytokeratin 18 auch in permeabilisierten HepG2-Zellen PKC-abhängig phosphoryliert wird.

Für **Cytokeratin 8** (K2C8, PKC-Substrat V), das ebenfalls als potentielles PKC-Substrat identifiziert wurde, war eine zweidimensionale Immunlokalisation mit einem Cytokeratin 8-spezifischen Antikörper zwar nicht möglich, die massenspektroskopische Zuordnung für das Protein ist aber so eindeutig, daß auch dessen Phosphorylierbarkeit in permeabilisierten HepG2-Zellen überprüft werden konnte. Tatsächlich ließ sich eine sehr schwache PKC-abhängige Phosphorylierung in den zweidimensionalen Phosphoimagerbildern nachweisen.

Die Phosphorylierbarkeit von Cytokeratin 8 und Cytokeratin 18 durch PKC ist in Hepatocyten nach PMA-Stimulation sowohl in vitro [342] als auch in vivo [343] bereits beschrieben. Gleiche Effekte wurden in humanen Epithelzellen des Darmes [342] beobachtet. Die Phosphorylierung von Cytokeratin 8 und Cytokeratin 18 konnte durch ein PKC ϵ -Pseudosubstratpeptid vollständig inhibiert werden [210], was auf die Beteiligung von PKC ϵ an der Phosphorylierung hindeuten würde. Der Nachweis dieser Cytokeratine und ihrer Phosphorylierung am Golgiapparat ist bisher jedoch nicht beschrieben und deutet auf einen möglichen Einfluß der Cytokeratinphosphorylierung auf eine Golgifunktion hin.

5.9.5.4 Membran- und Vesikel-assoziierte Proteine

5.9.5.4.1 Synaptobrevin 2

Der Nachweis von **Synaptobrevin 2** (VAMP2) als potentielles in-vitro-PKC-Substrat durch 2D-Elektrophorese nach Hartinger (s. Tab. 6, (5)) und massenspektroskopischer Peptidsequenzierung läßt sich nach zweidimensionaler immunologischer Detektion mit einem VAMP2-spezifischen Antikörper in angereicherten Golgimembranen bestätigen. Eine Phosphorylierung in permeabilisierten HepG2-Zellen ließ sich dagegen nicht nachweisen. Die im Verhältnis zu den bevorzugten PKC-Substraten schwache [³²P]-Markierung ober- und unterhalb der Immunlokalisation ist anderen PKC-Substraten zuzuordnen, die jedoch nicht weiter untersucht wurden. Die massenspektroskopische Peptidsequenzierung (Kap. 5.9.3.1) sowie die 1D- (Kap. 5.9.4.1) und 2D-Immunlokalisation (Kap. 5.9.4.2) bestätigen die Bindung von VAMP2 an den Golgiapparat. VAMP2 besitzt eine trans-Membrandomäne und ist bereits am Golgi lokalisiert worden [344]. Obwohl das Protein neben einer potentiellen Phosphorylierungssequenz für Caseinkinase auch eine für PKC aufweist [302], ist eine PKC-abhängige Phosphorylierung bisher nicht nachgewiesen worden. Die Phosphorylierbarkeit des homologen Synaptobrevin 1 (VAMP1) durch eine Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II ist dagegen dokumentiert [345]. Die Beteiligung von VAMP2 am Vesikeltransport ist mehrfach dokumentiert [302,282,346]. VAMP2 könnte als t-SNARE an der Vesikelbildung beteiligt sein und über seinen Phosphorylierungszustand reguliert werden.

5.9.5.4.2 Endobrevin

Das durch massenspektroskopische Peptidsequenzierung am Golgiapparat nachgewiesene **Endobrevin** (s. Tab. 6, (5)) konnte mangels eines spezifischen Antikörpers nicht weiter untersucht werden. Für das Synaptobrevin-analoge Protein ist bis auf eine Lokalisation am Endosom [119,347] wenig bekannt. Aufgrund der Sequenzhomologie zu anderen SNAREs könnte es aber durchaus in den konstitutiven Vesikeltransport eingreifen [347].

5.9.5.5 Lumenale Proteine

5.9.5.5.1 λ-Immunglobulin und Lysozym C

Für die luminalen Proteine λ-**Immunglobulin** (1, Tab. 6) und **Lysozym C** (4, Tab. 6), die nach in-vitro-Phosphorylierung und 2D-Elektrophorese nach Hartinger (s. Kap. 5.9.2) als potentielle PKC-Substrate massenspektroskopisch identifiziert wurden, konnte kein zweidimensionaler Immunnachweis erbracht werden (s. Kap 5.9.4). Eine Phosphorylierung der beiden Proteine in permeabilisierten HepG2-Zellen ließ sich ebenfalls nicht nachweisen (nicht gezeigt).

Weder für λ -Immunglobulin noch für Lysozym C [348] ist bisher eine Modifizierung durch PKC-Isoformen nachgewiesen worden. Dies könnte darauf hindeuten, daß es in vitro möglicherweise zum Abbau des GA oder zu einer Störung in der Membranstruktur kommt, was letztendlich zur Phosphorylierung der luminalen Proteine führt, die in vivo nicht nachweisbar ist. Zudem würde eine PKC α -abhängige Phosphorylierung der Proteine eine intrinsische Kinaseaktivität im Golgiapparat voraussetzen, die zwar nachgewiesen wurde [293], deren Substratspezifität bisher jedoch unbekannt ist.

Eine Beteiligung von λ -Immunglobulin und Lysozym C an der Regulation des Vesikeltransportes ist eher unwahrscheinlich, da die Proteine luminal transportiert werden und auch unter in-vitro-Bedingungen nicht mit PKC interagieren sollten.

5.9.5.5.2 Cab45

Cab45 (CB45, Probe G3), ein luminales Ca²⁺-bindendes Protein des GAes [312], wurde als potentiell PKC-Substrat mittels in-vitro-Phosphorylierung und 2D-Elektrophorese nach Görg durch massenspektroskopische Peptidsequenzierung identifiziert. Die zweidimensionale Immundetektion ist spezifisch im 2D-Muster von Golgi-Proteinen nachzuweisen (s. Abb. 33). Eine Kollokalisierung von 2D-Immunsignal und [³²P]-Markierung bestätigt zwar die massenspektroskopische Identifizierung als in-vitro-PKC-Substrat, eine Phosphorylierung von Cab45 in permeabilisierten HepG2-Zellen ließ sich aber nicht nachweisen. Obwohl Cab45 sechs potentielle PKC-Phosphorylierungsstellen aufweist [302] und möglicherweise Ca²⁺-abhängige Vorgänge im ER oder post-ER-Kompartiment reguliert [119], ist es zumindest in HepG2-Zellen kein PKC-Substrat. Die luminal Lokalisation des Proteins im Golgiapparat macht - wie bereits in Kap. 5.9.5.5.1 ausgeführt - eine Beteiligung an der PKC α -abhängigen konstitutiven Vesikelbildung unwahrscheinlich.

5.9.5.5.3 GRP78

GRP78 (G1) ist wie Cab45 (s. Tab. 7 und Kap. 5.9.5.5.2) als potentielles PKC-Substrat identifiziert worden. Die durch MS ermittelte Golgi-Assoziation ist bisher nicht beschrieben, wird aber immunologisch ein- und zweidimensional bestätigt (s. Kap. 5.9.4). Die Phosphorylierung in permeabilisierten HepG2-Zellen konnte nicht belegt werden, obwohl die posttranslationale Modifikation von GRP78 durch Phosphorylierung und ADP-Ribosylierung bereits nachgewiesen wurde [349]. Die dafür verantwortliche Kinase konnte aber nicht identifiziert werden [350]. Es ist daher anzunehmen, daß GRP78, das ein Hauptbestandteil der Coumassie-anfärbbaren Golgi-Proteine darstellt (nicht gezeigt), zumindest in permeabilisierten HepG2-Zellen vor einer Phosphorylierung durch PKC geschützt wird. Welche Rolle dem Protein im Golgiapparat zukommt, ist zur Zeit unklar. Eine Beeinflussung der konstitutiven Vesikelbildung durch GRP78 wird bisher nicht

beschrieben. Da das GRP78 aber in deutlicher Menge nachgewiesen wurde, könnte es ein reguläres luminales Protein des Golgi darstellen.

5.9.5.6 Golgi-assoziierte Proteine, die nicht phosphoryliert werden

5.9.5.6.1 Annexin IV

Annexin IV (auch als Lipocortin IV, Endonexin I, Chromobindin 4, Protein II, P32.5, placental anticoagulant protein II, PAP-II, PP4-X, 35- β Carbohydrate-binding protein P33/P41 oder P33/41 bezeichnet) wurde durch massenspektroskopische Peptidsequenzierung ursprünglich als potentielles in-vitro-PKC-Substrat am Golgiapparat identifiziert (s. 1, Tab. 6). Eine Lokalisation von Annexin IV am Golgi ist bisher nicht nachgewiesen, wird aber durch die 2D-Immunlokalisation des Proteins durch die eigenen Untersuchungen bestätigt (s. Kap. 5.9.3.3, Abb. 32 und Kap. 5.9.4.2, Abb. 33). Obwohl das Protein 5 potentielle PKC-Phosphorylierungssequenzen aufweist [302] und eine in-vitro-Phosphorylierung durch PKC nachgewiesen wurde [351], ließ sich eine PKC-abhängige in-vitro-Phosphorylierung (s. Kap. 5.9.3.3, Abb. 32) und in-situ-Phosphorylierung (nicht gezeigt) von Annexin IV mittels 2D-Kolokalisation von radioaktiver Markierung und Immundetektion in HepG2-Zellen nicht nachweisen.

Da aber Annexin IV wie alle Vertreter der Annexine Ca^{2+} -abhängig Phospholipide bindet [352] und eine Modifikation von Annexin IV durch PKC-abhängige Phosphorylierung dessen Phospholipid-bindende Eigenschaften verändern könnte [353], wäre ein Eingreifen des Proteins in die Prozesse der Vesikelbildung durchaus vorstellbar. Die Funktion des Proteins an der Golgimembran ist zur Zeit jedoch nicht bekannt.

5.9.5.6.2 Profilin I

Profilin I wurde - analog zu Annexin IV - ursprünglich als potentielles in-vitro-PKC-Substrat am Golgiapparat identifiziert (s. 4, Tab. 6). Die Assoziation mit dem Golgiapparat konnte immunologisch ein- (s. Kap. 5.9.4.1, Tab. 9) und zweidimensional (s. Kap. 5.9.3.3, Abb. 31 und Kap. 5.9.4.2, Abb. 33) bestätigt werden.

Obwohl die in-vitro-Phosphorylierung von Profilin I durch PKC [354,316] beschrieben ist, war weder die in-vitro- (s. Abb. 31, Kap. 5.9.3.3) noch die in-situ-Phosphorylierung des Proteins am Golgiapparat von HepG2-Zellen nachweisbar (nicht gezeigt). Es muß daher angenommen werden, daß Profilin I zumindest in HepG2-Zellen nicht durch PKC phosphoryliert wird.

Mehrere Gründe sprechen jedoch dafür, daß Profilin I einen Einfluß auf die Vesikelbiogenese haben könnte:

1. Profilin I wurde am Golgiapparat nachgewiesen (s.o.).

2. Das Protein bindet an G-Aktin [355] sowie an PIP2 [356] und könnte damit als Bindeglied zwischen Vesikeltransport und dem Aktincytoskelett fungieren.
3. Die PIP2-Bindung von Profilin I regt die PKC-abhängige Phosphorylierung von Profilin I in vitro an [354], was in vivo zu einer Stimulierung von PI3-Kinase führen könnte [357]. PIP3, das Reaktionsprodukt der PI3-Kinase aktiviert besonders nPKCs [153,358], die wiederum die Vesikelbildung am GA stimulieren könnten.
4. Die inzwischen nachgewiesene Wechselwirkung zwischen Profilin I und Dynamamin I [359], könnte bei der Vesikelabschnürung eine Rolle spielen.

Daß Profilin I offenbar an der Vesikelbiogenese beteiligt ist wird in Kap. 5.11 dargelegt.

5.9.5.7 Verschiedene am Golgi lokalisierte Proteine

5.9.5.7.1 Cofilin

Für das ursprünglich nach Peptidsequenzierung am Golgiapparat identifizierte **Cofilin** (s. Tab. 7, G5) war ein immunologischer Nachweis der Golgiassoziation nicht möglich, da im Versuchszeitraum kein Antikörper zu erhalten war. Es konnte daher auch nicht geklärt werden, ob Cofilin eventuell ein gering modifiziertes PKC-Substrat darstellt. In der Literatur gibt es bisher keine Hinweise auf eine mögliche Phosphorylierung durch PKC. Cofilin wird dagegen durch LIM-Kinase 2 modifiziert, was zu Veränderungen am Aktinzytoskelett führt [360,361]. Als subzelluläre Lokalisation des Cofilins werden das Cytosol und der Zellkern angegeben [119]. Eine Bindung von Cofilin an den Golgiapparat ist bisher nicht beschrieben, könnte jedoch auf eine mögliche funktionelle Wechselwirkung des Golgiapparates mit dem Aktin-Cytoskelett hinweisen.

5.9.5.7.2 P15

Der Transkriptions-Koaktivator **P15** wurde wie Cofilin durch massenspektroskopische Peptidsequenzierung als potentielles PKC-Substrat identifiziert (s. Tab. 7, G4). Da kein Antikörper zu erhalten war, konnte die Golgiassoziation experimentell nicht bestätigt werden. Obwohl in der Primärstruktur vier potentielle PKC-Phosphorylierungsstellen vorhanden sind, ist in permeabilisierten HepG2-Zellen keine Modifizierung durch PKC nachweisbar. Das Protein wird dagegen durch Kaseinkinase II modifiziert [362] und ist bisher nur im Zellkern nachgewiesen worden. Eine Bindung an Membranen, insbesondere an den Golgiapparat, wurde bis heute nicht beobachtet. Ob P15 eine Funktion am Golgi ausübt, ist nicht bekannt und konnte auch nicht überprüft werden.

5.9.5.7.3 S15A

Das ribosomale Protein **S15A**, daß nach 2D-Trennung nach Hartinger als potentielles PKC-Substrat am Golgi identifiziert wurde (4, Tab. 6), weist zwar zwei potentielle PKC-Phosphorylierungsmotive

auf [302], seine Phosphorylierung war aber in permeabilisierten HepG2-Zellen nicht nachweisbar. Eine Phosphorylierung durch PKC-Isoformen ist bisher auch nicht beschrieben worden. Die Golgiassoziation konnte nicht überprüft werden, da ein entsprechender Antikörper nicht zur Verfügung stand. Eine regulierende Wirkung des ribosomalen Proteins auf den konstitutiven Vesikeltransport scheint nicht sehr wahrscheinlich zu sein und müsste, wenn dies angenommen werden würde, sehr gründlich untersucht werden.

5.10 Nachweis von PKC-spezifischen Bindungsproteinen an Golgizisternen

Um die Wirkungsweise von PKC-Isoformen an der Golgimembran zu charakterisieren, wurden PKC α -spezifische Bindungsproteine an der Golgimembran identifiziert.

Basierend auf dem von Chapline et al. [214,363] entwickelten „overlay assay“ wurde ein Verfahren zum Nachweis PKC α -spezifischer Bindungsproteine optimiert (s. Kap. 4.2.3.1).

Nach Auftrennung von Golgiproteinen in PAA-Gradientengel wurden die Proteine auf NC transferiert und zur Vermeidung von unspezifischer Proteinbindung an die Transfermembran mit BSA blockiert. Als Sonde zur Bestimmung der PKC-spezifischen Bindungsproteine wurde GST-PKC α unter PKC-aktivierenden Bedingungen in Gegenwart von Ca²⁺, PS und PMA eingesetzt. Als Kontrolle dienten Ansätze mit Ro 31-8220 in Gegenwart der o.g. PKC-Aktivatoren und Ansätze in Abwesenheit aller Aktivatoren. Die gebundene Kinase wurde anschließend mit dem Quervernetzungsreagenz Formaldehyd an ihre Bindungspartner chemisch gebunden und überschüssiges Formaldehyd mit Glycin neutralisiert. Für den Nachweis der quervernetzten GST-PKC α mit einem PKC α -spezifischen Antikörper (Upstate) wurde die NC für die Antikörperdetektion reequilibriert und eine Stunde mit dem PKC-spezifischen Antikörper inkubiert. Fluoreszierende Marker, die direkt vor dem Nachweis des spezifischen PKC-Antikörpers durch Chemilumineszenzdetektion auf der NC aufgebracht wurden, ermöglichten die zweidimensionale Zuordnung der Bindungsproteine.

Das Ergebnis der Behandlung von Golgiproteinen, die durch 1D-SDS-PAGE getrennt und mit GST-PKC α inkubiert wurden, zeigte eine Vielzahl offenbar unspezifischer Signale (s. Kap. 4.2.3.1.1, Abb. 13), darunter alleine 12 GST-PKC α -bindende Proteinbanden im Molekulargewichtsbereich von 14 - 44 kD.

Um die Spezifität der PKC-Bindung zu erhöhen und gleichzeitig zwischen PKC-Bindungsproteinen und PKC-Substraten unterscheiden zu können, wurden die Golgi-angereicherten Proteine zweidimensional elektrophoretisch aufgetrennt, geblottet und die Konzentration von GST-PKC α im Overlayexperiment auf 1 μ g/ml reduziert [364]. Abb. 34 zeigt die PMA-stimulierte Bindung von GST-PKC α an Proteine der zweidimensional aufgetrennten Golgimembranen.

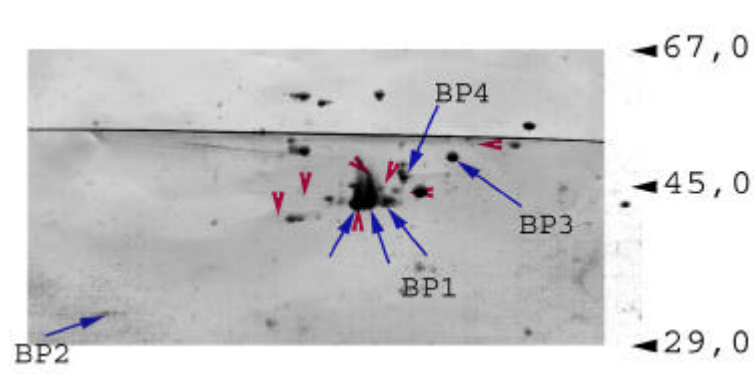


Abb. 34: Ausschnitt der Overlay-Assay PMA-aktivierter GST-PKC α an zweidimensional aufgetrennten Golgimembranproteinen

Die Abbildung zeigt die DAB-Anfärbung der Bindungsproteine im 2D-Overlayassay.

Hohle Pfeilspitzen kennzeichnen die durch PKC vor dem Overlay-Bindungsversuch in-vitro-phosphorylierten Golgiproteine. Pfeile markieren die GST-PKC α -Bindungsproteine.

Der Bindungsassay zeigt nach Immundetektion von gebundener GST-PKC α im wesentlichen ein Bindungsprotein mit ca. 44 kD (s. Abb. 34, BP1). Dieser Proteindoppelfleck im sauren pI-Bereich besitzt nach den erhaltenen Ergebnissen von allen Golgiproteinen die höchste Bindungsaffinität für GST-PKC α und konnte nach massenspektroskopischer Peptidsequenzierung als β -Aktin (ActB) identifiziert werden (s. Tab. 14, BP1). In Gegenwart von Ro 31-8220 bindet GST-PKC α zwar noch an BP1, das Bindungssignal beträgt aber nur 10 % des Bindungssignals, das in Gegenwart von PMA erhalten wird (nicht gezeigt). Andere Bindungsproteine, die in Abb. 34A mit der Bezeichnung BP2 – BP4 gekennzeichnet sind, lassen sich erst durch Chemilumineszenzdetektion sichtbar machen. Eine Analyse der Spezifität dieser schwachen Bindungen wurde nicht ausgeführt. Der Nachweis des β -Aktin (ActB) als Hauptbindungsprotein von GST-PKC α könnte als Identifikation eines neuen Golgi-assoziierten RACKs (**R**eceptor of **a**ctivated **C**-**K**inase) interpretiert werden, insbesondere wenn man die um 90 % verminderte Bindung von GST-PKC α an β -Aktin in Gegenwart von Ro 31-8220 berücksichtigt. Folgende Beobachtungen in der Literatur unterstützen diese Einordnung:

In vitro bindet PKC β II als PMA-aktiviertes Enzym an Aktin [365]. Desgleichen dient zumindest in isolierten Nervenenden filamentöses Aktin als PKC-Bindungsprotein und Chaperon der aktivierten PKC ϵ [366].

In vivo transloziert PKC β II nach PMA-Stimulation an das Aktin-Cytoskelett [365]. Bei einer undifferenzierten humanen Darmkrebszelllinie führt die TPA-Behandlung zur Ausbildung von Lamellen, die Aktin- und PKC α enthalten und im weiteren Verlauf der Einwirkung des

Phorbolesters zur Zellausbreitung auf dem Substratum und zu einer „normalen“ Epithel-Morphologie [367].

Aus den beschriebenen in-vivo-Untersuchungen läßt sich nicht ablesen, ob PKC direkt mit dem Aktin-Cytoskelett in Wechselwirkung tritt oder an Aktin-assoziierte Proteine bindet. Durch die hier durchgeführten in-vitro-Experimente ist jedoch klar, daß Aktin selbst in der Lage ist, PKC zu binden und die Einordnung als RACK für PKC α seine Berechtigung hat.

5.11 Einfluß von Golgi-assoziierten Proteinen und potentiellen PKC-Substraten auf den Vesikeltransport am TGN

Da die Vesikelbildung am TGN nicht molekular rekonstruiert werden kann, kann der Einfluß von potentiellen PKC-Substraten und Golgi-assoziierten Proteinen nur durch indirekte Methoden überprüft werden:

- intrazelluläre Lokalisation der Proteine durch spezifische Antikörper mittels Immunfluoreszenz und „Laser scanning“-Mikroskopie
- Biochemischer Nachweis in Vesikelfractionen
- Immundepletierung der Proteine und Bestimmung der resultierenden in-vitro-Vesikelbiogenese
- Zusatz von spezifischen Antikörpern im in-vitro-Vesikelbiogenese-Assay

Da nicht für alle identifizierten Proteine spezifische Antikörper in ausreichenden Mengen zur Verfügung standen, wurden die Untersuchungen exemplarisch für Profilin I und Annexin IV durchgeführt.

5.11.1 Intrazelluläre Lokalisation von Profilin I und Annexin IV

Bei immuncytochemischen Untersuchungen an HepG2-Zellen zeigte sich, daß die Hauptmenge von **Profilin I** im Cytoplasma vorliegt und nur ein Teil an Membranen bindet (nicht gezeigt). Die Färbung des cytoplasmatischen Profilin I überlagert die des an den Golgi gebundenen Profilin I und

verhindert eine exakte Kolo­kalisierung mit dem Golgimarkerprotein TGN38. In der Brustkrebszelllinie MT-1, die nur geringe Mengen an Profilin I exprimiert, ließ sich dagegen eine Kolo­kalisierung zwischen TGN38 und Profilin I nachweisen (s. Abb. 35).

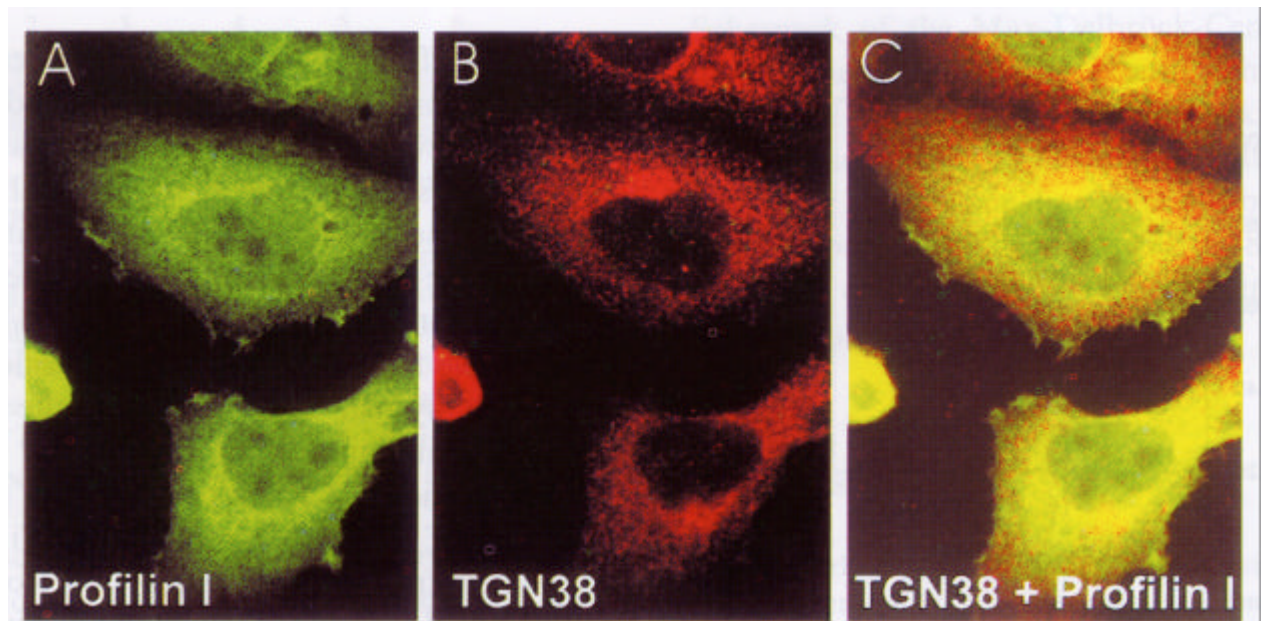


Abb. 35: Immunfluoreszenz­anfärbung von Profilin I (A, grün), TGN38 (B, rot) und deren Überlagerung (C, gelb) in Digitonin-permeabilisierten MT-1 Zellen [368]

Die Kolo­kalisierung mit TGN38 weist auf eine Bindung am GA und am TGN hin [368] und bestätigt damit den massenspektroskopischen (s. Tab. 6, 1) sowie den immunologischen Nachweis (s. Kap. 5.9.4.2, Abb. 33) von Profilin I als Golgi-assoziiertes Protein. Zusätzlich ließ sich durch die Immunfluoreszenz noch ein punktuell cytosolischer Nachweis erbringen, der auf eine Assoziation an Transportvesikel hindeuten könnte.

Annexin IV ist immunocytochemisch an der Plasmamembran und im Cytoplasma von HepG2-Zellen nachzuweisen [369]. Desweiteren läßt sich eine Immunfärbung im perinuklearen Bereich beobachten, die z.T. mit der von TGN38 kolo­kalisiert und damit die Bindung von Annexin IV an GA und TGN bestätigt [369].

5.11.2 Nachweis von Profilin I und Annexin IV als Bestandteil von post-Golgi-Vesikeln

Zum Nachweis von Profilin I und Annexin IV als Komponenten der post-Golgi-Vesikel wurden in vitro gebildete Vesikel in Gegenwart von GTP und GTP γ S isoliert und durch Geschwindigkeits-Zentrifugation im Saccharosegradienten fraktioniert (Abb. 36).

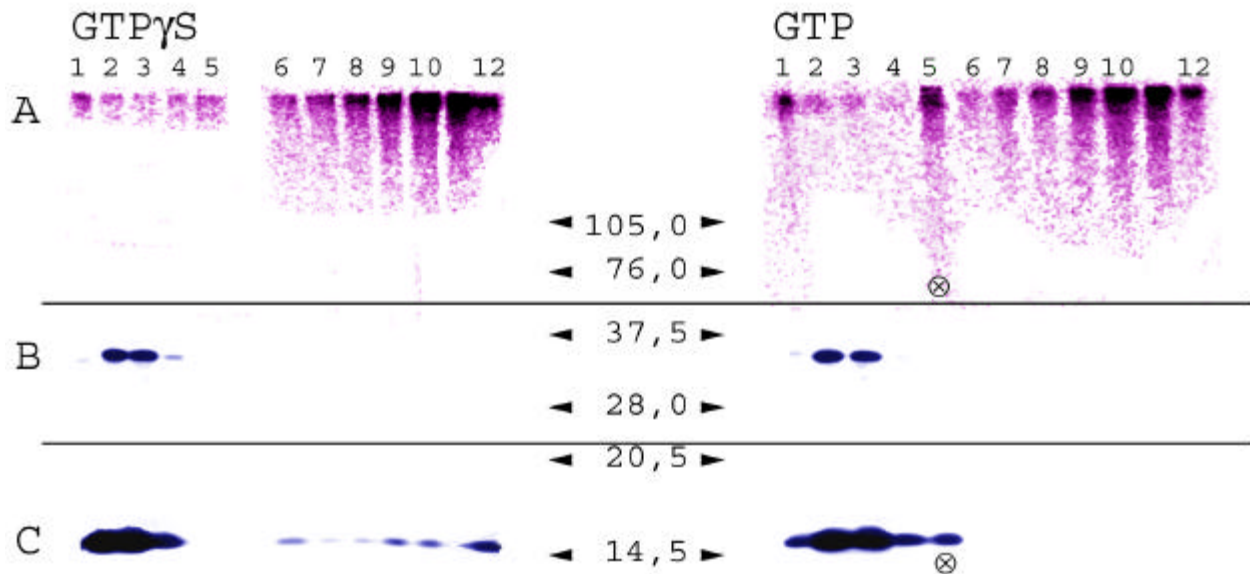


Abb. 36: Nachweis von Annexin IV, Profilin I und $[^{35}\text{S}]$ -HSPG in den Vesikelfractionen der präparativen *in-vitro*-Vesikelbiogenese nach deren Auftrennung durch Geschwindigkeits-Gradientenzentrifugation

A: $[^{35}\text{S}]$ -HSPG Markierung in den Fraktionen des Geschwindigkeitsgradienten.

B: Nachweis von Annexin IV.

C: Nachweis von Profilin I.

⊗: Kollokalisierung von Profilin I und HSPG in Gegenwart von GTP.

Die Dichte der Fraktionen nimmt von Fraktion 1 (0,25 M Saccharose) zu Fraktion 12 (1,2 M Saccharose) kontinuierlich zu.

Annexin IV und Profilin I werden in den leichten Fraktionen 2-4 des Geschwindigkeitsgradienten als lösliche Proteine nachgewiesen (s. Abb. 36). Aufgrund des Gehaltes an $[^{35}\text{S}]$ -markierten HSPG wurden die Fraktionen 6 bis 12 als Vesikelfractionen identifiziert. In diesen Fraktionen (6-12) zeigt Profilin I in Gegenwart von GTP γ S auch eine gute Kollokalisierung mit HSPG.

In Gegenwart von GTP tritt eine derartige Kollokalisierung zwischen Profilin I und HSPG nur bei Fraktion 5 (s. Abb. 36, ⊗) auf. Ob diese Kollokalisierung wie auch die Kollokalisierung von Profilin I und HSPG in den Fraktionen 6 bis 12 der Abb. 36C auf eine Vesikelbildung zurückzuführen oder alternativ durch die Entstehung von unspezifischen Proteinkomplexen zu erklären ist, die nach Erfahrung des Arbeitskreises unter den gewählten Versuchsbedingungen cosedimentieren und elektronenmikroskopisch von Vesikeln unterschieden werden können [295], mußte anders geklärt werden (s.u.).

Die Kollokalisierung von Annexin IV mit der HSPG-Markierung in den Fraktionen 2 und 3 (s. Abb. 36A und B) ist dagegen gering und deutet wohl auf lösliches HSPG hin.

Um Proteinkomplexe aufgrund ihrer höheren Dichte abzutrennen, wurde eine isopyknische Zentrifugation der *in vitro* gebildeten Vesikel angewendet (s. Abb. 37).

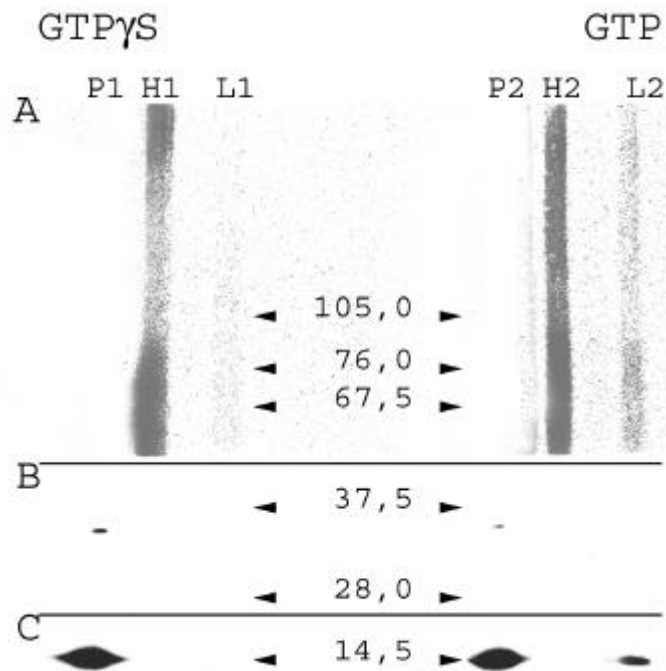


Abb. 37: Nachweis von Profilin I (C), Annexin IV (B) und [³⁵S]-HSPG (A) in den Fraktionen der in-vitro-Vesikelbiogenese nach Abtrennung unspezifischer Proteinkomplexe durch isopyknische Zentrifugation

A: [³⁵S]-HSPG-Detektion durch Phosphoimaging.

B: Chemilumineszenzdetektion von Annexin IV.

C: Chemilumineszenznachweis von Profilin I.

P1 und P2 bezeichnen die Proteinpellets mit $\rho > 1,5$ M Saccharose in HME.

H1 und H2 bezeichnen die Vesikelfraktion der Dichte $\rho = 1,4$ M Saccharose in HME sowie L1 und L2 die Vesikelfraktionen mit $\rho = 1,2$ M Saccharose in HME.

Eine Kolokalisation von HSPG und Profilin I ist in der leichten Vesikelfraktion in Gegenwart von GTP (s. Abb. 37, Spur L2) weiterhin möglich. In Gegenwart von GTP γ S ist Profilin I aber weder in der schweren Vesikelfraktion S1 noch in der leichten Vesikelfraktion L1 nachzuweisen. Ob Profilin I in Gegenwart von GTP γ S nicht an Vesikel binden kann oder bevorzugt mit unspezifischen Proteinkomplexen assoziiert und abzentrifugiert wird, konnte nicht geklärt werden.

Annexin IV läßt sich nach isopyknischer Zentrifugation in keiner Vesikelfraktion mehr nachweisen, stattdessen sedimentiert es im Pellet des isopyknischen Gradienten (s. Abb. 37, Spur P1 und P2).

Aus den Versuchen folgt, daß die Kolokalisation zwischen Profilin I und HSPG in der leichten Vesikelfraktion des Geschwindigkeitsgradienten in Anwesenheit von GTP (s. Abb. 36, Spur 5), durch die Kolokalisation beider Stoffe in der leichten Vesikelfraktion des isopyknischen Gradienten (s. Abb. 37, Spur L2) bestätigt wird. Damit ist auch biochemisch nachgewiesen, daß Profilin I an post-Golgi-Vesikeln bindet und als Vesikel-assoziiertes Protein vielleicht sogar die Funktion eines Hüllproteins ausübt.

Desweiteren zeigen die Versuche daß Annexin IV offenbar kein Vesikel-assoziiertes Protein ist (s. Abb. 37). Obwohl die Bindung von GAGs an Annexin IV bei in vitro Experimenten [370] beschrieben wurde und dies darauf hin deutet, daß Annexin IV möglicherweise mit sulfatierten HSPG im GA interagieren könnte, waren Versuche, derartige Komplexe mit Annexin IV-spezifischen Antikörpern in Golgi-Extrakten zu präzipitieren, nicht erfolgreich. Die Funktion des Golgi-gebundenen Annexin IV bleibt daher zur Zeit unklar.

5.11.3 Einfluß der Profilin I- und Annexin IV-spezifischen Antikörper auf die in-vitro-Vesikelbiogenese

Es wurde der Einfluß von cytosolischem und Golgi-assoziiertem Profilin I auf die Vesikelbildung am TGN untersucht [368]. Dazu wurde Profilin I aus dem Cytosol von HepG2-Zellen gewonnen und die zellfreie Vesikelbiogenese in Abwesenheit und nach Zusatz von Profilin I (Cytosol) bestimmt. Die Experimente ergaben, daß weder die Depletierung von Profilin I noch der Zusatz von zusätzlichem Profilin I einen Einfluß auf die in-vitro-Vesikelbiogenese hatten [368]. In einem weiteren Ansatz, in dem die Rolle des Golgi-gebundenen Profilin I bestimmt werden sollte, wurden die angereicherten Golgimembranen vor der in-vitro-Vesikelbiogenese mit steigenden Mengen an monoklonalem anti-Profilin I inkubiert. Es konnte dabei eine dosisabhängige Reduktion der Vesikelbildung beobachtet werden, die sich durch Zusatz von Profilin I aufheben ließ (s. Abb. 38), was einer Maskierung des anti-Profilin I-Antikörpers entspricht.

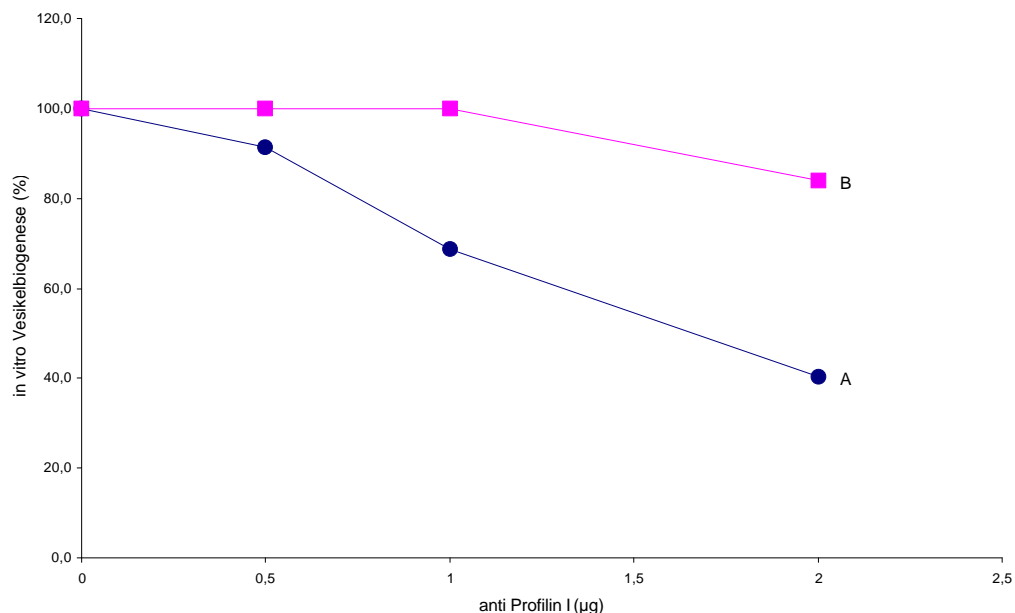


Abb. 38: Effekt der Inkubation von isolierten Golgimembranen mit steigenden Mengen an anti-Profilin I (A) sowie einem Gemisch aus anti-Profilin I und 10 µg/ml Profilin I (B) auf die zellfreie in-vitro-Vesikelbiogenese in Gegenwart von Cytosol und Nukleotiden [368]

Besonders die Ergebnisse der Hemmversuche lassen den Schluß zu, daß an die Golgimembranen gebundenes Profilin I für die Bildung von konstitutiven Transportvesikeln notwendig ist.

Durch Zugabe von Annexin IV-spezifischen Antikörpern zu dem zellfreien

Vesikelbiogenesystem nach Tooze und Huttner [254] sollte der Einfluß von Annexin IV auf die Verpackung von sulfatiertem HSPG in Transportvesikeln untersucht werden. Es konnte jedoch in keinem Fall die Effizienz der Verpackung verringert oder erhöht werden [368]. Die Ergebnisse demonstrieren, daß Annexin IV nicht für die Bildung von Vesikeln benötigt wird.