

6 Zusammenfassung

PKC stimuliert am trans-Golgi-Netzwerk (TGN) die Bildung von konstitutiven Transportvesikeln [165]. Zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus wurden zwei Wege beschrrieben:

Zunächst wurden Bindungsproteine der PKC mit Hilfe der „overlay“-Technik analysiert. Durch hochauflösende 2D-Elektrophorese und Mikrosequenzierung wurde Golgi-assoziiertes β -Aktin als Hauptbindungsprotein von aktivierter PKC α am Golgiapparat (GA) nachgewiesen.

In weiteren Experimenten wurden Golgi-proteine an isolierten Golgizisternen oder in permeabilisierten Zellen phosphoryliert. Die erhaltenen Phosphoproteine wurden von nicht phosphorylierten Proteinen durch zweidimensionale Elektrophorese nach Hartinger et al. [259] und Görg et al. [260,303] getrennt. Proteine, deren Phosphorylierung durch Calphostin C, Ro 31-8220 und Gö 6976 gehemmt werden konnte, wurden sequenziert. Von den identifizierten in-vitro-PKC-Substraten MARCKS, MacMARCKS, der regulatorischen leichten Kette des Myosinkomplexes 2A, Cytokeratin 8 und Cytokeratin 18 konnte auch deren in-situ-Phosphorylierung in permeabilisierten Zellen nachgewiesen. Damit ist eine biologische Relevanz der Phosphorylierung dieser Proteine wahrscheinlich.

Zusätzlich konnten die bekannten Golgi-assoziierten Proteine wie Rab6, Rab8 und Synaptobrevin 2 identifiziert und andere wie Annexin IV, Profilin I, Rab7, GRP 78 und Endobrevin erstmals am GA nachgewiesen werden.

Der Einfluß von Annexin IV und Profilin I auf die in-vitro-Vesikelbiogenese wurde überprüft: Während ein Annexin IV-spezifischer Antikörper die Verpackung von HSPG im zellfreien System nicht beeinflusste [371], konnte durch Zusatz von spezifischem Profilin I-Antikörper die Vesikelbildung gehemmt werden [368]. Profilin I wurde daneben auch biochemisch in post-Golgi-Vesikelfractionen nachgewiesen, was die oben gemachte Aussage unterstützt.

Die Identifizierung der hauptsächlichen PKC-Substrate MARCKS, MacMARCKS und der regulatorischen leichten Kette des Myosinkomplexes 2A deutet auf einen neuen Signaltransduktionsweg hin, durch den PKC die Vesikelbildung am TGN steuern könnte.