
1 Einführung

1.1 Zellen reagieren spezifisch auf Signale aus ihrer Umgebung

Die grundlegende Einheit des Lebens sind Zellen, kleine membranumschlossene Kompartimente mit einer wässrigen Lösung von Nukleinsäuren, Proteinen und einer Vielzahl anderer Substanzen. Während die einfachsten Lebewesen aus einzelnen Zellen bestehen und sich durch Zweiteilung in identische Tochterzellen fortpflanzen, sind multizelluläre Lebewesen aus einem Klon organisierter Zellen aufgebaut. Diese Zellen enthalten ein einheitliches Genom, bilden jedoch charakteristische mRNAs, Proteine und Zellstrukturen aus und sind für verschiedene Funktionen spezialisiert.

Die Zellen eines Organismus existieren dabei nicht unabhängig voneinander und von ihrer Umwelt. Sie reagieren vielmehr koordiniert, situationsbedingt und zelltypspezifisch auf äußere Reize. Diese Reaktionen können z.B. in der Einleitung von Zellteilung, Zelldifferenzierung oder Zelltod bestehen. Sie können aber auch die Aktivierung energieliefernder Prozesse zur Synthese von Strukturproteinen und Enzymen involvieren sowie die Sekretion von Hormonen, Neurotransmittern oder Antikörpern bewirken.

Die Summe vieler einzelner Reaktionen dient der optimalen Ausgestaltung der Zellantwort bei veränderlichen extrazellulären und intrazellulären Bedingungen. Um diese Anpassung vornehmen zu können, bedarf es eines komplexen Abstimmungsprozesses zur Verarbeitung, Modulation und Weiterleitung der einzelnen Signale. Dabei spielen die sog. Proteinkinasen und ihre Antagonisten, die Proteinphosphatasen, eine zentrale Rolle.

Viele dieser Kinasen sind in Signalkaskaden organisiert, in denen die einzelnen Kinasen spezifisch jeweils andere, hierarchisch niedriger stehende Kinasen phosphorylieren und diese dadurch aktivieren. Das Signal wird so über eine Reihe von Phosphorylierungsschritten und eine Vielzahl von Stufen weitergegeben und führt schließlich zur Phosphorylierung und Funktionsänderung der jeweiligen Zielmoleküle.

Eine zentrale Funktion der Kaskaden ist die Verstärkung der Signale. Daneben bieten sie Integrationspunkte für verschiedene Signale und Signalwege. Gleichzeitig bilden sie umgekehrt eine einfache Möglichkeit, durch ein einzelnes äußeres Signal mehrere intrazellulärer Signalkaskaden zu aktivieren. Die einzelnen Signalwege sind vielfach miteinander vernetzt. So entsteht eine große Zahl von Kontrollpunkten, an

denen die Signale miteinander abgeglichen und verrechnet werden. Erst durch diesen Abgleich gelingt es der Zelle, ein umfassendes Abbild ihrer Umgebung zu erhalten und die optimal abgestimmte Reaktion einzuleiten.

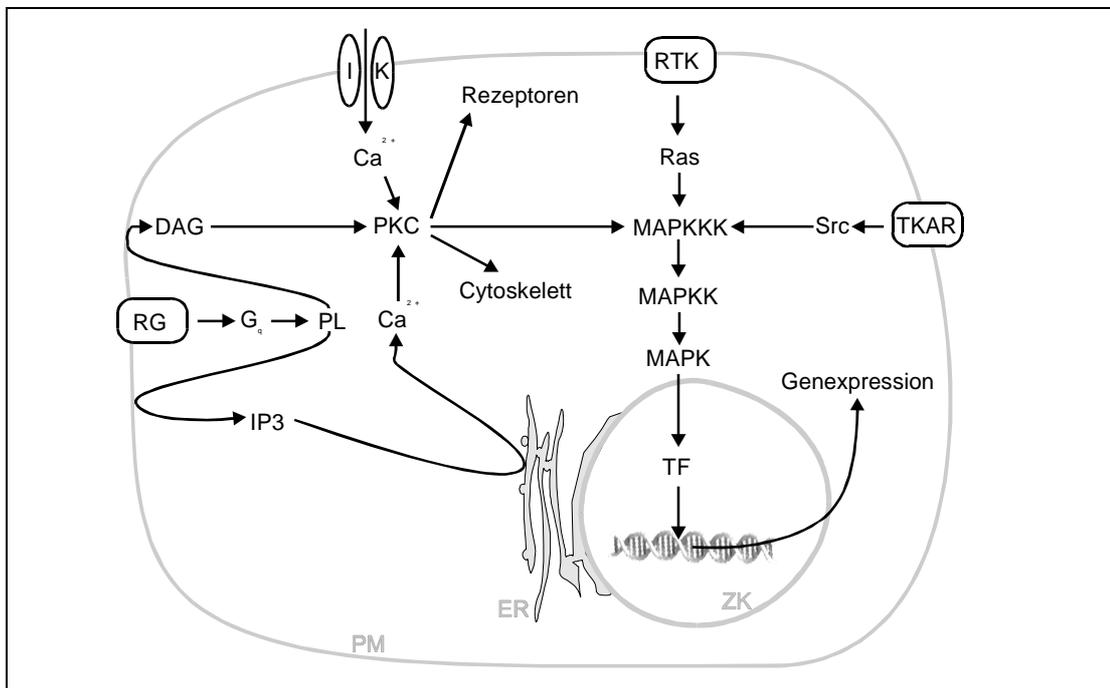


Abb. 1.1 Ausgewählte Komponenten der zellulären Signaltransduktion.

Folgende Abkürzungen werden verwendet: Diacylglycerol (DAG), Endoplasmatisches Reticulum (ER), G-Protein (G), G-Protein gekoppelter Rezeptor (RG), Inositoltrisphosphat (IP_3), Ionenkanal (IK), Kern (K), Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK), MAPK Kinase (MAPKK), MAPKK Kinase (MAPKKK), Phospholipase (PL), Plasmamembran (PM), Proteinkinase C (PKC), Rezeptor Tyrosin Kinase (RTK), Sarcoma-Protein (Src), Transkriptionsfaktor (TF), Tyrosinkinase assoziierter Rezeptor (TKAR) und Zellkern (ZK).

Die obige Abbildung zeigt beispielhaft das Zusammenspiel einiger ausgewählter Komponenten der zellulären Signaltransduktion. Innerhalb des Kinase-Phosphatase-Systems kommt Proteinkinase C (PKC) wegen ihrer weiten Verbreitung und ihrer hierarchisch hohen Stellung innerhalb der Kaskaden eine herausragende Rolle zu. Daneben gilt ihr aber vor allem aufgrund der Vielfalt der PKC-vermittelten Prozesse und der Vielzahl der Signale, die zur PKC-Aktivierung führen können, ein breites Interesse.

1.2 Die Proteinkinase C Familie

1.2.1 Primärstruktur der Proteinkinase C Isoenzyme

PKC wurde ursprünglich nicht als Enzymfamilie sondern als einzelne Kinase beschrieben, die durch Proteolyse, Phospholipide und Ca^{2+} aktivierbar ist (Inoue et al., 1977; Takai et al., 1979; Ogawa et al., 1981). Mit der Entdeckung ihrer

Aktivierbarkeit durch Phorbolster (Castagna et al., 1982; Kikkawa et al., 1983), eine Gruppe von Tumorpromotoren, entstand ein starkes Interesse an ihrer biologischen Funktion, zunächst vor allem in der Tumorgenese. In der Folge zeigte sich, dass PKC eine Familie von ubiquitären Serin-/Threonin-Kinasen bildet, die an so unterschiedlichen Prozessen wie Transkription und Proliferation (Weinstein, 1988), Differenzierung (Mischak et al., 1993), Vermittlung der Immunreaktion (Buccione et al., 1996) oder Modulation von Transportereignissen (Westermann et al., 1996) beteiligt sind. Eine umfassende Darstellung der durch PKC vermittelten Prozesse findet sich in verschiedenen Reviews (Hug und Sarré, 1993; Goodnight et al., 1994; Sim und Scott, 1999).

Heute sind elf verschiedene PKC-Isoenzyme bekannt, die von zehn verschiedenen Genen kodiert werden. Eines dieser Gene, das für PKC β I und II, wird in zwei verschiedene Isoformen gespliced. Alle Mitglieder der PKC-Familie bestehen aus einer einzelnen Polypeptidkette. Diese bildet zwei durch eine bewegliche Region (hinge region) verbundene Domänen: N-terminal befindet sich die 20 bis 70 kDa große regulatorische Domäne, C-terminal die 45 kDa große katalytisch aktive Domäne. Die Klonierung und Sequenzierung der ersten Isoenzyme zeigte vier konservierte Bereiche, die von fünf variablen Bereichen flankiert sind (Coussens et al., 1986). Diese Sequenzhomologie bildet die Grundlage für die Bezeichnung der einzelnen konstanten (C1 bis C4) und variablen Bereiche (V1 bis V5) sowie für die Unterteilung der PKC-Familie in Untergruppen:

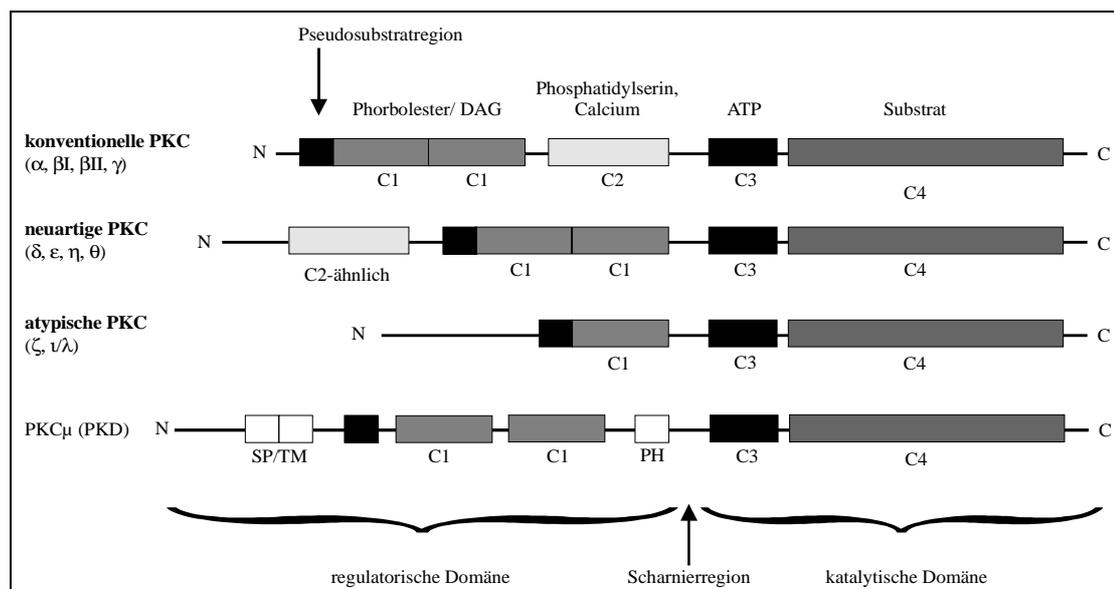


Abb. 1.2 Schematische Darstellung der Mitglieder der PKC-Familie.

DAG steht als Abkürzung für Diacylglycerol, PH für Pleckstrin Homologie, SP für Signalpeptid und TM für Transmembran (nach Newton, 1995; Newton & Johnson, 1998).

Die konstanten Bereiche der C-terminalen katalytischen Domäne aller PKC-Isoenzyme sind homolog und enthalten den ATP-Bindungsereich (C3) zusammen mit der Substratbindungsstelle (C4), die auch das aktive Zentrum enthält. Dagegen unterscheiden sich die einzelnen Bereiche der regulatorischen Domänen deutlich zwischen den einzelnen Untergruppen:

In den konventionellen PKCs (cPKC), zu denen die Isoenzyme PKC α , β I, β II und γ gehören, enthält der erste dieser Bereiche ein dupliziertes cysteinreiches Motiv (C1-C1). Dieses bildet eine doppelte Zinkfingerstruktur aus, an die Diacylglycerol (DAG) oder Phorbol ester (PMA) binden können (Bell und Burns, 1991). N-terminal an dieses schließt sich eine autoinhibitorische Pseudosubstratsequenz an (House und Kemp, 1987). Der zweite konstante Bereich (C2) enthält die Bindungsstelle für saure Lipide und Kalzium (Newton, 1995; Shao et al., 1996).

Die neuen Isoformen (nPKC) mit PKC δ , ϵ , η und θ ähneln den konventionellen Isoformen stark, weisen jedoch einen Austausch von C2- und C1-C1-Bereich auf. Dem C2-Bereich fehlen in den nPKCs außerdem die zur Ca²⁺-Bindung notwendigen Aspartatreste (Newton, 1995).

Den von PKC ι (in Maus PKC λ) und PKC ζ gebildeten atypischen Isoformen (aPKC) fehlt einer der beiden C1-Bereiche, so dass nur ein Zinkfinger ausgebildet wird und DAG sowie PMA nicht binden kann. Daneben fehlt der C2-Bereich in den aPKCs vollständig. Daher erfolgt keine Bindung von Kalzium an diese Isoenzyme.

PKC μ , auch als Proteinkinase D (PKD) bezeichnet (Johannes et al., 1994; Valverde et al., 1994), weist dagegen strukturelle Eigenarten auf, die ihre Einordnung in eine der drei Untergruppen unmöglich macht. Während die beiden C1-Bereiche auseinandergezogen sind und der C2-Bereich fehlt, kommen hier weitere Strukturelemente hinzu: N-terminal der V3-Region schließt sich eine Pleckstrin-Homologie-Domäne an, und der N-Terminus des Proteins enthält ein Signalpeptid sowie eine Transmembrandomäne.

1.2.2 Aktivierung von Proteinkinase C

Die Enzyme der ersten Gruppe, die konventionellen PKC-Isoenzyme α , β I, β II und γ , enthalten alle vier o.g. Domänen und sind daher sowohl durch DAG als auch durch Phosphatidylserin (PS) und Kalzium aktivierbar. Durch die Bindung aller drei Effektoren wird in diesen Enzymen eine Konformationsänderung induziert, die zu ihrer maximale Aktivierung führt. Dagegen sind die Mitglieder der zweiten Gruppe,

die neuen PKC-Isoenzyme, auch in der Abwesenheit von Kalzium maximal aktivierbar. Diese Aktivität beruht auf einem Aminosäureaustausch in der Kalzium-bindenden Domäne, welcher eine ständige Konformationsänderung in die aktivierte Form bewirkt (Ogita et al., 1992; Koide et al., 1992). Die atypischen PKC-Isoenzyme ζ , ι und λ , die die dritte Gruppe ausbilden, unterscheiden sich sowohl strukturell als auch in ihrer Aktivierbarkeit von den ersten beiden Gruppen. Sie enthalten nur ein einfaches cysteinreiches Motiv und sind daher nicht durch DAG oder PMA aktivierbar. Auch eine Aktivierung durch Kalzium ist bei diesen Enzymen nicht möglich. Für PKC ζ konnte aber z.B. eine starke basale Aktivität in Abwesenheit der o.g. Aktivatoren gezeigt werden, die sich durch Arachidonsäure weiter steigern ließ (Kochs et al., 1993).

Alle PKC-Isoenzyme benötigen außerdem eine initiale Phosphorylierung durch eine PKC Kinase. Auf diese folgen zwei Autophosphorylierungsschritte, wodurch die PKC-Isoenzyme schließlich in die Cofaktor-aktivierbare Form übergehen. PKC ohne die initiale Phosphorylierung bleibt auch in Gegenwart von Aktivatoren inaktiv (Cazaubon et al., 1994). Eine Aktivierung konventioneller PKC ist im folgenden modellhaft dargestellt.

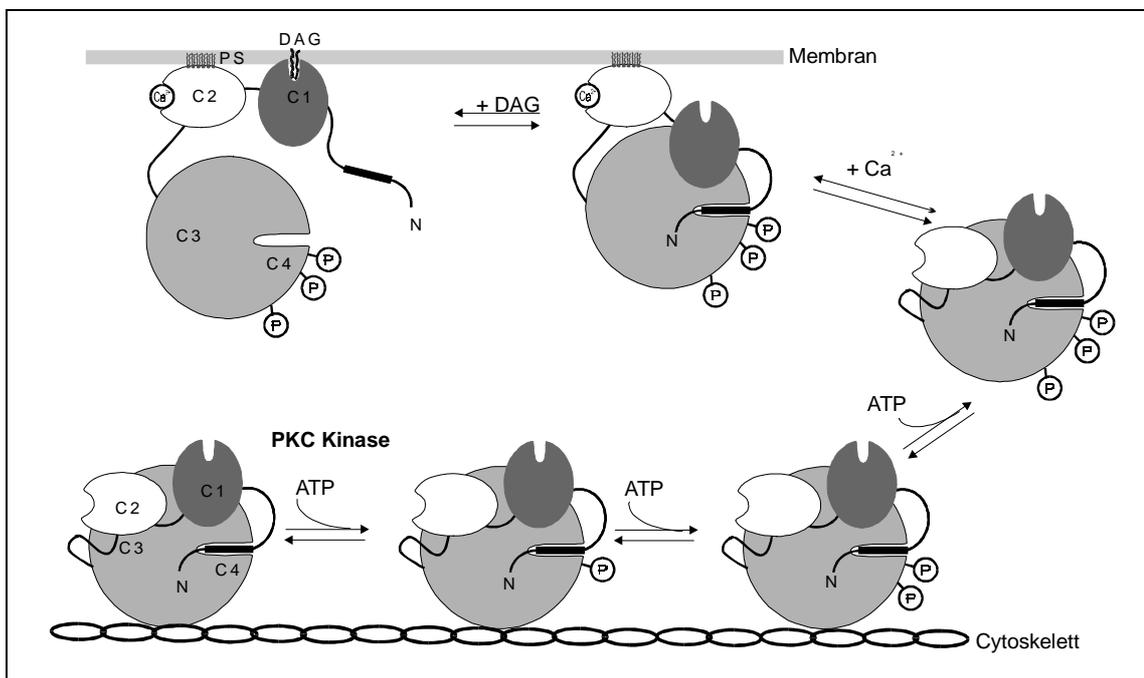


Abb. 1.3 Cofaktorabhängige Stimulierung konventioneller PKC.

Die Abkürzungen C1 bis C4 stehen für die konservierten Bereiche 1-4; der N-terminale Balken stellt die Pseudosubstratsequenz dar (verändert nach Newton, 1995).

Nach ihrer Phosphorylierung liegt unstimulierte PKC inaktiv und gefaltet vor. Die N-terminale Pseudosubstratsequenz blockiert in diesem Zustand die Region der

Substratbindung und damit das aktive Zentrum. Durch die Bindung von Serotonin und anderen Hormonen an ihre Rezeptoren wird z.B. Phospholipase C (PLC) aktiviert. Diese spaltet Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂) in DAG und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃). IP₃ setzt Kalzium aus dem Endoplasmatischen Retikulum frei, welches sich in der C2-Region an eine aspartatreiche Bindungstasche mit β -Faltblattstruktur anlagert und dort eine Konformationsänderung induziert. Durch diese Konformationsänderung wird das basische Rückgrat der β -Faltblattstruktur exponiert und eine Interaktion mit den sauren Kopfgruppen von Membranlipiden möglich. Das membranständige, aus PIP₂ freigesetzte, DAG wirkt wie ein hydrophober Anker, der an die C1-Region bindet und PKC so an der Membran hält. Durch ein Zusammenspiel dieser Faktoren wird ein partielles Auffalten der PKC induziert, das zu einer Freisetzung der Pseudosubstratsequenz führt. Die Substratbindungsstelle ist nun frei, und PKC ist aktiv. Die Aktivierung der nPKC Isoenzyme verläuft in der gleichen Form, allerdings sind diese Enzyme auch ohne Kalzium maximal aktiv.

Aktive PKC ist jedoch sehr proteaseanfällig und wird in der Folge leicht durch Ca²⁺-abhängige Proteasen wie z.B. Calpain an der Scharnierregion („hinge region“) in die regulatorische und die katalytische Domäne gespalten. Die katalytische Domäne, die auch als PKM bezeichnet wird, ist dauerhaft aktiv, wird aber so rasch abgebaut, dass bisher keine biologische Wirkung für sie deutlich wurde.

Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Bildung von PKC-Aktivatoren nach Stimulierung mit unterschiedlichen Agonisten:

Enzym	Substrat	gebildeter Mediator
Phospholipase A ₂	PC, PS	freie cis ungesättigte Fettsäuren
		Lysophosphatide
Phospholipase C	PIP ₂	DAG
		IP ₃ (und damit Ca ²⁺)
Phospholipase D	PC, PS	DAG
Spingomyelinase	Spingomyelin	Ceramid
PI 3 Kinase	PIP ₂	PIP ₃

Abb. 1.4 Auflistung der Bildung von PKC-aktivierenden Mediatoren.

(Nach Nishizuka, 1992 und Toker, 1994.) Die verwendeten Abkürzungen bedeuten Diacylglycerol (DAG), Inositoltrisphosphat (IP₃), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylinositolbisphosphat (PIP₂), Phosphatidyl-inositoltrisphosphat (PIP₃) und Phosphatidylserin (PS).

Zur Aktivierung von cPKC und nPKC wird in Experimenten daneben häufig PMA eingesetzt, der auf PKC die gleiche Wirkung wie DAG hat, aber aufgrund seiner Stabilität gegen Hydrolyse und seiner festeren Bindung zu einer stärkeren Aktivierung führt (Mosior et al., 1995).

1.2.3 Proteinkinase C in Differenzierung und Transformation

Wie bereits oben beschrieben entstand nach der 1982 von Castagna und Mitarbeitern beschriebenen Aktivierung von PKC durch Phorbolester ein großes Interesse an deren zellulären Aufgaben. Der Zusammenhang von PKC-Aktivität, Differenzierung und Tumorpromovierung wurde vor allem an Adipozyten, Fibroblasten, neuronalen Zellen und Keratinozyten untersucht:

PKC δ überexprimierende NIH 3T3 Zellen teilen sich langsamer als normale NIH 3T3 Zellen, wachsen zu geringeren Zelldichten und zeigen morphologische Veränderungen (Mischak et al., 1993b). Die Überexpression von PKC ϵ führt dagegen zu gesteigerter Teilungsrate und der Ausbildung einer erhöhten Zelldichte. Daneben wachsen diese Zellen in Weichagar und erzeugen in Nacktmäusen die Bildung subkutaner Tumoren. Beide letztgenannte Punkte sind klassische Parameter für eine onkogene Transformation. Daraus entsteht zunächst das Bild einer onkogenen Wirkung von PKC ϵ , nicht aber von PKC δ . Neben der Wirkung einer Aktivierung oder Inhibierung der einzelnen Isoformen müssen aber auch die Auswirkungen in verschiedenen Zellen und Geweben untersucht werden. So können z.B. Mäusefibroblasten durch das virale *sis*-Onkogen, das PDGF- β ähnlich ist, transformiert werden. Mäusefibroblasten, die dominant negative PKC δ überexprimierten, lassen sich dagegen nicht transformieren (Li et al., 1996).

Ein gut beschriebenes Modell zur Verknüpfung von Differenzierung und Tumorpromotion ist die maligne Transformation von Keratinozyten: Diese können in Kultur durch eine Erhöhung der Medium-Kalziumkonzentration zur Steigerung der DAG-Konzentration und der PKC-Aktivität angeregt werden. Hierdurch wird die terminale Differenzierung und die damit verbundene Apoptose eingeleitet. Dieser Prozess kann durch den Zusatz von PMA noch beschleunigt werden. PMA und damit PKC-Aktivierung führt hier also nicht zur Entartung gesunder Zellen sondern zu deren Differenzierung und später ihrem Tod. Dadurch erhalten solche Keratinozyten die Möglichkeit zu weiterer Teilung, die in diesem Status noch kontakthinhibiert sind, aber bereits nicht mehr in vollem Umfang auf Differenzierungssignale reagieren. Im Verlauf der raschen Teilung und des raschen

Wachstums solcher Zellen treten vermehrt stochastisch begründete Mutationen auf, die schließlich zu einer vollständigen malignen Transformation führen (Denning et al., 1995; Whitfield, 1992).

Weitere wichtige Funktionen für PKC bestehen daneben auch in der neuronalen Differenzierung. Diese wurden zunächst davon abgeleitet, dass das Gehirn eines der PKC-reichsten Gewebe darstellt und dass die einzelnen PKC-Isoenzyme im Verlauf der Differenzierung unterschiedlich exprimiert werden (Shimohama et al., 1991). Daneben können neuroendokrine PC12 Zellen durch Nervenwachstumsfaktor (NGF) zur Ausbildung von Dendriten angeregt werden. Dieser Prozess kann durch PMA verstärkt oder durch PKC-Inhibition vermindert werden (Hall et al., 1988). Schließlich kann auch die PMA-induzierte Aktivierung von PKC allein die Ausbildung von Neuriten bewirken (Tint et al., 1992).

Myeloide Differenzierung wird bisher zumeist in den aus einer humanen Promyelozytenleukämie isolierten HL60 Zellen untersucht (Castagna et al., 1982). Die Differenzierung dieser Zellen kann nach Beginn einer PMA-induzierten PKC-Aktivierung noch etwa für eine Stunde durch PKC-Inhibitoren umgekehrt werden. Nach dieser Zeit läuft die Differenzierung auch ohne weitere PKC-Aktivität ab (Aihira et al., 1991). Offensichtlich ist zu diesem Zeitpunkt bereits ein terminales Differenzierungsprogramm aktiviert, das die Zellen schließlich auch in die Apoptose eintreten lässt. U-937 Zellen, eine humane Leukämie-Zelllinie, dagegen differenzieren ebenfalls nach PMA-Stimulierung. Sie leiten aber keine Apoptose ein und entdifferenzieren schließlich wieder (Hass et al., 1991). Diese Zellen treten scheinbar nicht in das terminale Differenzierungsprogramm ein. Die transiente Natur ihrer Differenzierung könnte auf den Abbau von PKC nach deren Stimulierung zurückzuführen sein.

1.2.4 Isoenzym-Expression und subzelluläre Verteilung

Während sich im Gehirn eine Vielzahl von PKC-Isoenzymen nachweisen lässt, finden sich in den meisten anderen Geweben i.d.R. nur einzelne Isoenzyme. PKC δ ist ubiquitär exprimiert, und auch PKC α findet sich in nahezu allen Geweben. PKC γ wird nur im Gehirn gefunden, während PKC η in Epithel- und T-Zellen stark exprimiert wird und PKC θ in Skelettmuskel- und T-Zellen auftritt (Osada et al., 1992; Mischak et al., 1991a; Osada et al., 1993; Dlugosz et al., 1992; Wetsel et al., 1992).

Daneben wird in jüngerer Zeit auch die Lokalisation der einzelnen PKC Isoenzyme innerhalb der Zelle untersucht. Hierbei zeigt sich, dass nicht-aktivierte PKC anders als in früheren Vorstellungen nicht allein im Cytosol vorliegt, sondern auch an eine Vielzahl zellulärer Strukturen, wie z.B. Cytoskelettkomponenten, Kernhülle, Golgisystem, Endoplasmatisches Reticulum oder Plasmamembran, gebunden sein kann (Liu und Heckman, 1998). Neueste Arbeiten untersuchen auch die dynamische Verteilung und die Aktivator-induzierte Verlagerung einzelner Isoenzyme zwischen diesen Kompartimenten (Wagner et al., 2000).

Als weitere Faktoren für die subzelluläre Lokalisation der PKCs sind die sogenannten PKC-Rezeptorproteine beschrieben, die wahrscheinlich an der Verteilung von PKC beteiligt sind. Im einzelnen sind dies die „receptors of activated C kinases“ (RACKs, Mochly-Rosen et al., 1991), „protein interacting with C kinase“ (PICK1, Staudinger et al., 1995) und „a kinase anchoring protein“ (AKAP79, Klauck et al., 1996).

1.2.5 Proteinkinase C Substrate

Das einheitliche Charakteristikum für Proteinkinase C Substrate besteht in dem Sequenzmotiv RXXSXR respektive RXXTXR (X steht dabei für eine beliebige Aminosäure) und ist damit nur wenig restriktiv (Nishikawa et al., 1997). Die Substratspezifität der einzelnen Isoenzyme ist neben deren differentieller Expression und spezifischer Aktivierung eine weitere Ursache für unterschiedliche biologische Aktivitäten einzelner PKCs. Mit der Ausnahme von Raf-1 (Sozeri et al.; 1992, Kolch et al., 1993) und Glykogensynthase Kinase-3 β (GSK-3 β) (Goode et al., 1992) konnten bisher allerdings keine isoenzym-spezifischen PKC-Substrate zweifelsfrei identifiziert werden. Für Raf-1 konnte die Phosphorylierung durch Isoenzyme aus der Gruppe der cPKCs, nicht aber der nPKCs gezeigt werden. GSK-3 β , die spezifisch c-Jun phosphoryliert und dadurch inhibiert, wird ihrerseits durch eine Reihe von PKC-Enzymen phosphoryliert. Dazu gehören PKC α , PKC β I, und PKC γ , in geringerem Maß auch PKC β II, nicht aber PKC ϵ (Goode et al., 1992).

PKC Substrate werden *in vivo* i.d.R. mit PMA als Aktivator untersucht, welches innerhalb weniger Minuten zur vollständigen Aktivierung der konventionellen und neuen PKCs führt. Das unter diesen Bedingungen in den meisten Zelltypen am auffälligsten phosphorylierte und am besten untersuchte Substrat ist das 80 kDa Zytoskelettprotein MARCKS. MARCKS steht für „myristoylated alanin-rich C kinase substrate“ (Aderem, 1992; Blackshear, 1993). Es bindet vermutlich kalziumabhängig

an Calmodulin sowie Aktin und führt in letzterem Fall zu dessen Vernetzung (Hartwig et al., 1992). Phosphorylierung von MARCKS reduziert sowohl seine Affinität für Calmodulin als auch die Aktinvernetzung und könnte so als Mediator für PKC-kontrollierte Zellmotilität und Sekretion wirken.

Daneben sind auch die Zytoskelettproteine Lamin B, Vinkulin und Tau (Hocevar et al., 1993; Werth et al., 1983; Correas et al., 1992) als PKC-Substrate beschrieben. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Verknüpfung des Zytoskelettproteins Laminin mit PKC und möglichen Auswirkungen auf den Zellzyklus: Die Aktivierung von PKC β II durch Bryostatin in HL-60 Zellen führt zur Translokation des Enzyms in den Zellkern, dort wahrscheinlich zur Phosphorylierung von Lamin B und so schließlich zur Auflösung der nukleären Hülle (Hocevar et al., 1993).

Auch eine Reihe von Membranproteinen mit wichtigen Aufgaben in der Signaltransduktion sind als PKC-Substrate beschrieben. So führt z.B. eine Phosphorylierung des EGF-Rezeptors durch PKC (Hunter et al., 1984) zur Internalisierung und proteolytischen Spaltung des Rezeptors. Die Phosphorylierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren, wie z.B. des Acetylcholin-Rezeptors (Hopfield et al., 1988) oder der Photorezeptoren (Hardie et al., 1993), führt zur Desensitivierung dieser Proteine und dadurch zu einer verminderten Signalweiterleitung.

Daneben ist PKC auch an der Phosphorylierung einer Reihe intrazellulärer Signaltransduktionsproteine beteiligt. Das Tumorsuppressorprotein p53, das von PKC in der vermutlich für die Oligomerisierung und damit DNA-Bindung wichtigen Domäne phosphoryliert wird (Baudier et al., 1992), und Raf-1 Kinase, die durch PKC-Phosphorylierung aktiviert wird (Sozeri et al., 1992; Kolch et al., 1993), sind prominente Vertreter dieser Gruppe. Schließlich wurde auch I κ B als PKC Substrat beschrieben (Gosh und Baltimore, 1990). Allerdings zeigten andere Versuche, dass I κ B durch Verunreinigungen von PKC-Präparationen, wie z.B. Raf-1, phosphoryliert wurde (Janosch et al., 1992). Bei einer Zusammenfassung der bisher beschriebenen möglichen PKC-Substrate (Liu, 1996; Keenan und Kelleher, 1998) erhält man mehr als 100 Proteine, die allerdings zum überwiegenden Teil noch nicht zweifelsfrei identifiziert und bezüglich ihrer biologischen Relevanz charakterisiert sind.

Die Suche nach biologisch relevanten Phosphorylierungen konzentriert sich daher immer stärker auf *in vivo* Untersuchungen. Hier kommt z.B. die Kombination von *in vivo* Phosphorylierung, zweidimensionaler Gelelektrophorese und Methoden der Massenspektrometrie zum Einsatz. In PKC-überexprimierenden NIH 3T3 und 32D

Zellen wurden die folgenden, im ersten Teil dieser Arbeit untersuchten Proteine, als mögliche PKC-Substrate identifiziert (Dammeier, 1999):

DAP1 ist eines der durch technical knockout gefundenen „death associated proteins“ (Levy-Strumpf und Kimichi, 1998) und spielt eine wichtige Rolle in der TNF-Rezeptor 1 abhängigen Apoptose (Liou und Liou, 1999). Diff6 gehört zu den Septinen, einer Gruppe cytosolischer GTPasen (Mori et al, 1996), und könnte an der Rekrutierung von Lymphozyten im lymphatischen Gewebe beteiligt sein (Nottenburg et al. 1990). Die Protein Disulfide Isomerase (PDI) ist maßgeblich an der korrekten Faltung von Proteinen beteiligt. Cross-linking-Studien zeigen dabei, dass vor allem Tyrosin- und Tryptophanreste das Erkennungsmotiv bilden (Ruddock et al., 2000). TCTP, das „translational controlled tumor protein“, ist ein ubiquitäres Protein, dem aufgrund seiner weiten Verbreitung von höheren Pflanzen bis hin zu den Säugetieren und seiner stark konservierten Sequenz allgemeine Stoffwechselfunktionen zugeschrieben werden (Sanchez et al. 1997). Seine Deregulierung könnte aber auch an der Tumorentstehung beteiligt sein (Chung et al., 2000).

Während die meisten der o.g. Proteine unabhängig von der überexprimierten Isoform phosphoryliert werden, wird Diff6 ausschließlich in stimulierten PKC δ -überexprimierenden 32D Zellen phosphoryliert. In den stimulierten 32D und 32D PKC ϵ -Zellen sowie in den unstimulierten Zellen kommt es zu keiner Phosphorylierung (Dammeier, 1999). Für die Modifikation von Diff6 existiert daher wahrscheinlich ein PKC δ -spezifischer Weg, der möglicherweise für die Differenzierung der im folgenden Kapitel beschriebenen 32D Zellen relevant ist.

1.3 Entwicklung und Differenzierung von 32D Zellen

1.3.1 Entstehung der Blutzellen

32D Zellen, eine IL-3-abhängige myeloide Zelllinie, stellen ein weitverbreitetes Modell für myeloide Vorläuferzellen der Maus dar (Greenberger et al., 1983). Diese Zellen lassen sich nicht durch die Zugabe von Phorbol ester differenzieren, bilden aber den Phänotyp reifer Makrophagen aus, wenn sie mit dem koloniestimulierenden Faktor 1 (CSF-1) behandelt werden (Pierce et al., 1990). Wie auch die anderen Blutzellen, entstehen sie aus den pluripotenten Stammzellen im Knochenmark. Diese können unter dem Einfluß unterschiedlicher koloniebildender Faktoren in eine Reihe verschiedener Vorstufen und schließlich Zelltypen differenzieren.

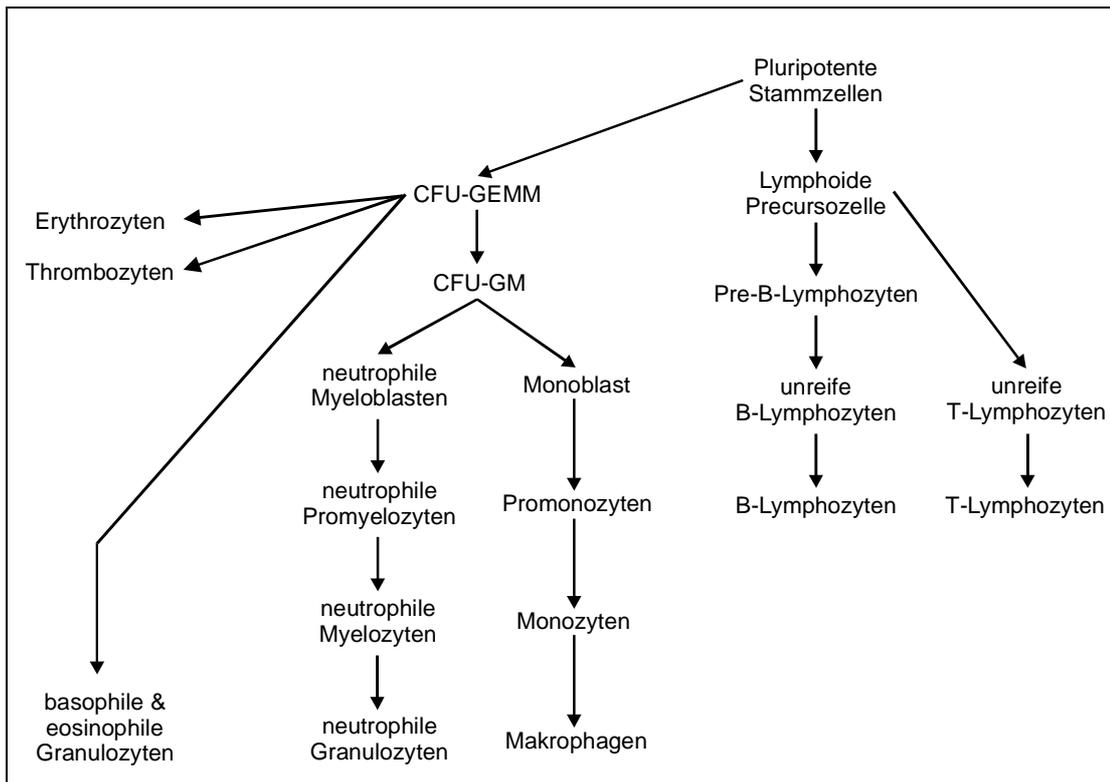


Abb. 1.5 Bildung der Blutzellen.

CFU steht für „colony-forming unit“, GEMM für „granulocyte, erythroid, macrophage, megakaryocyte“ und GM für „granulocyte macrophage“ (verändert nach Michal, 1999).

Dabei entstehen Zellen der adaptiven Immunabwehr: die Antikörper-produzierenden B-Zellen sowie die zytotoxischen und die Helfer-T-Zellen. Über einen anderen Weg entstehen dagegen Zellen, die zur nicht-adaptiven Immunabwehr beitragen. Hierzu gehören u.a. die aus den Monoblasten hervorgehenden Makrophagen und die aus den Myeloblasten gebildeten Granulozyten. Zu diesen gehören die basophilen Granulozyten, die Effektoren der allergischen Reaktionen sind, die eosinophilen Granulozyten, die vor allem Parasiten abwehren, und die neutrophilen Granulozyten, die ähnlich wie Makrophagen partikuläres Material phagozytieren.

Neutrophile Granulozyten und Makrophagen haben ähnliche Aufgaben, im Gegensatz zu den Makrophagen sind die neutrophilen Granulozyten aber fokussiert auf das Abtöten von Mikroben. Makrophagen bauen dagegen hauptsächlich geschädigte körpereigene Zellen, wie z.B. die überalterten Erythrozyten, ab.

1.3.2 Proteinkinase C-abhängige Differenzierung von 32D Zellen

Die meisten myeloiden Mauszelllinien einschließlich der 32D Zellen exprimieren keine detektierbaren oder nur sehr geringe Mengen PKC α oder PKC β , während PKC δ und PKC η i.d.R. stark exprimiert werden (Mischak et al., 1991a; Mischak et

al., 1993). Bei der Betrachtung der gewebespezifischen Expression der neun Isoenzyme liegt es nahe, unterschiedliche biologische Funktionen für die einzelnen PKCs zu vermuten und zu untersuchen.

32D Zellen in Kultur differenzieren nicht spontan und können auch nicht durch eine Stimulierung mit Phorbol ester zur Differenzierung angeregt werden, neutrophilen- oder makrophagenähnliche Charakteristika auszubilden. Die Untersuchung von PKC-abhängigen Differenzierungsprozessen in 32D Zellen wird daher mit einer Reihe von Zelllinien durchgeführt, die einzelne C Kinasen stabil überexprimieren (Mischak et al. 1993). Die meisten dieser Zellen zeigen keine Anzeichen für eine durch Phorbol ester vermittelte Differenzierung. Bei Überexpression von PKC α oder PKC δ kommt es dagegen zu deutlichen Veränderungen. Diese Zellen adhären innerhalb von 4 h nach der Stimulierung, nehmen im Volumen zu und entwickeln schließlich im Verlauf von 12 h einen Phänotyp wie neutrophile Granulozyten oder Makrophagen. Diese Zellen sind z.B. in der Lage, zur Kultur zugesetzte Hefezellen zu phagozytieren (Mischak et al., 1993). Die Überexpression von PKC α führt dabei in promyeloiden und Lymphoma-Zellen zu einer gesteigerten PKC δ -Expression (Romanova et al., 1988). In Zellen, die PKC α überexprimieren, kann es daher zu einer Überlagerung der PKC α - und PKC δ -vermittelten Effekte kommen.

Weiterhin zeigt die Überexpression von PKC δ -PKC ϵ -Chimären in 32D Zellen, dass diese Differenzierung durch die katalytische Domäne der PKC δ vermittelt wird: 32D Zellen, die eine Chimäre aus der regulatorischen Domäne von PKC ϵ und der katalytischen Domäne von PKC δ überexprimieren, adhären nach Stimulierung mit Phorbol ester und bilden einen makrophagenähnlichen Phänotyp aus. Dagegen kommt es in 32D Zellen, die eine Chimäre aus der regulatorischen Domäne von PKC δ und der katalytischen Domäne von PKC ϵ überexprimieren, zu keiner sichtbaren Reaktion der Zellen (Wang et al., 1997).

Die durch Phorbol ester differenzierbaren 32D PKC δ -Zellen stellen zusammen mit den 32D und 32D PKC ϵ -Zellen ein System dar, in dem PKC isoformspezifische Signaltransduktionswege und Differenzierungsprozesse untersucht werden können. Insbesondere die Rolle der in 32D Zellen hoch exprimierten PKC δ (Mischak et al., 1991b) kann hiermit eingehend untersucht werden. Durch einen Vergleich mit den PKC ϵ -vermittelten Prozessen können darüber hinaus Erkenntnisse über die Spezifität der einzelnen Effekte gewonnen werden.

1.4 Die Untersuchung differentieller Genexpression mit DNA Arrays

1.4.1 Die Herstellung verschiedener DNA-Array Typen

Die Entwicklung von DNA-Arrays geht zurück auf den Einsatz der „revers dot blot“ Technik. Hier werden einzelne DNA-Fragmente bekannter Sequenz auf definierte Positionen einer Nitrozellulosemembran aufgebracht und mit dem radioaktiv markierten Produkt einer reversen Transkription hybridisiert (Lennon und Lehrach, 1991). Diese Arrays werden vielfach als Makro-Arrays bezeichnet.

Durch den Einsatz von aktivierten Glasmaterialien als Träger und robotergestützter Mikrodispension wurde der Wechsel zu kleineren Formaten und einer größeren Anzahl individueller Sequenzen pro Flächeneinheit möglich. Eine Kombination aus Fluoreszenzfarbstoffen und konfokaler Mikroskopie für die Detektion verbessert daneben die Sensitivität und macht es außerdem möglich, mehrere Proben parallel auf einem Array und damit unter den exakt gleichen Hybridisierungsbedingungen zu messen. Dabei kommen mittlerweile sowohl passive Verfahren mit Mikrospritzen zum Einsatz als auch aktive Verfahren, die auf der Tintenstrahldrucker-Technologie basieren.

Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die einzelnen Arbeitsschritte, die zur Herstellung der in dieser Arbeit verwendeten cDNA-Micro-Arrays erforderlich sind (siehe hierzu auch die umfassende Protokollsammlung unter <http://www.cmgm.stanford.edu/pbrown/protocols.html>).

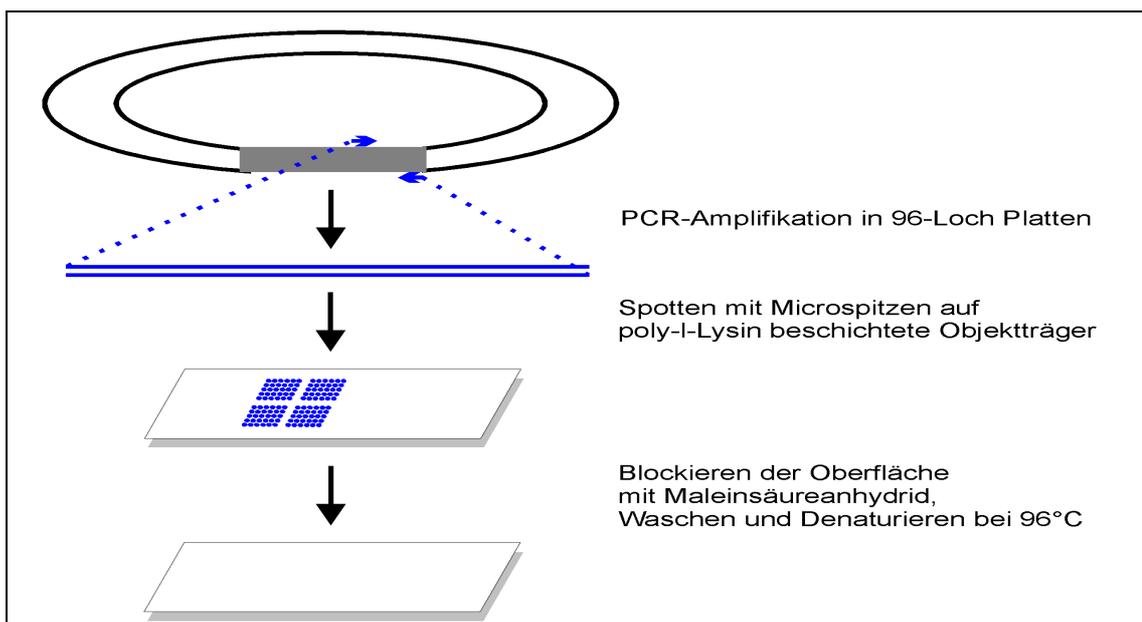


Abb. 1.6 Herstellung von cDNA-Micro-Arrays.

Als Template für die PCR dienen sequenzüberprüfte Plasmide. PCR-Produkte von 100-1.000 Bp Länge werden in 96-well Platten bei Standardbedingungen erzeugt und mittels Agarosegelelektrophorese überprüft. Pro Spot werden ca. 50 µl Lösung auf den poly-L-Lysin beschichteten Objektträger aufgebracht. Das enthaltene Wasser verdunstet sofort und lässt kleine Salzflecken zurück. Nach dem Blockieren und Waschen der Objektträger sind die Auftragungsorte nicht mehr sichtbar.

Daneben hat sich die Fotolithographie-basierte Synthese etabliert (Fodor et al., 1991, Lipshutz et al., 1999). Bei dieser werden fotoaktivierbare Linkermoleküle mit einer Maske bedeckt und durch selektive Belichtung aktiviert. Die Oberfläche wird dann mit der Lösung eines Nukleotids bedeckt, das seinerseits fotoaktivierbar ist und ausschließlich an die zuvor aktivierten Linkermoleküle bindet. Nach der Entfernung der Nukleotidlösung und Reinigung der Oberfläche schließt sich ein neuer Zyklus an. Durch den Einsatz der nächsten Fotomaske kommt es zur Deprotektion anderer Bereiche und so schließlich zur Synthese von Oligonukleotiden definierter Sequenz an definierten Positionen (Lipshutz et al., 1999). Aufgrund der Ähnlichkeit dieses Verfahrens zur Chipherstellung in der Computerindustrie werden diese Arrays auch als DNA Microchips bezeichnet. Durch die technischen Entwicklungen der Computerindustrie ist die mögliche Anzahl analysierbarer Sequenzen beliebig erweiterbar. Gegenwärtig sind Arrays mit ca. 100.000 Sequenzen pro cm² geplant, so dass bereits heute alle menschlichen Gene auf einem Array abgebildet werden könnten.

Die jüngste Entwicklung in diesem Feld sind Glasfaseroptik-basierte Arrays. Hierbei handelt es sich allerdings nicht mehr um Arrays im klassischen Sinn mit feldartig angeordneten Sequenzen: Vielmehr werden für diese Arrays individuelle Oligonukleotidsequenzen an Mikrokugeln synthetisiert und eine Vielzahl dieser Kugeln mit unterschiedlichen Sequenzen miteinander gemischt. Um später die gemessenen Signale den richtigen Mikrokugeln und damit Sequenzen zuzuordnen, ist jede Kugel darüber hinaus mit einem spezifischen Fluoreszenzcode ausgestattet (Ferguson et al.; Fulton et al., 1997). Die Kugeln lagern sich spontan und haltbar an das Ende von vorbehandelten Lichtleiterfasern an und können zur Detektion von fluoreszenzmarkierten Nucleinsäuren in Lösung eingesetzt werden. Die Hybridisierung mit den markierten Nucleinsäuren ist schnell und reversibel, so dass zukünftig die Messung großer Probenzahlen mit einzelnen dieser Arrays möglich sein wird (Walt, 2000).

Die folgende Abbildung gibt einen Überblick über die heute eingesetzten Arrayformen:

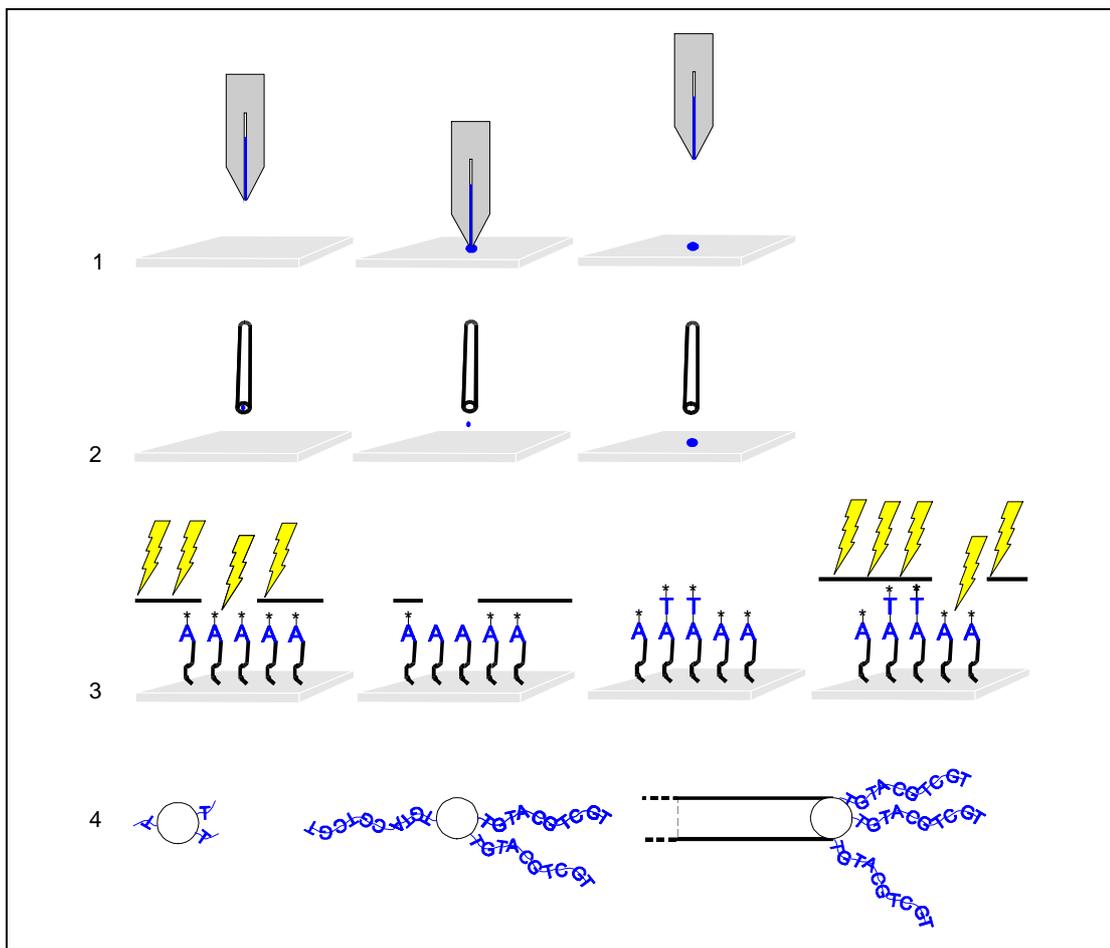


Abb. 1.7 Überblick über die verschiedenen DNA-Arrays.

Aufgeführt sind Herstellungswege für gespottete (1) und gedruckte (2) cDNA-Arrays sowie für DNA Microchips (3) und Lichtleiter-Arrays (4) (Lipshutz et al., 1999; Walt, 2000; van Hal et al., 2000).

1.4.2 Das Prinzip der cDNA-Analyse

Aus den untersuchten biologischen Proben wird Gesamt-RNA oder mRNA isoliert und in einer reversen Transkription fluoreszenzmarkiert. Hierzu werden zumeist modifizierte Nukleotide mit den Farbstoffen Cy3 und Cy5 verwendet. Alternativ kommen aber auch Fluorescein und Rhodamin zum Einsatz. Bei der Verwendung von Fluoreszenzmarkern, deren Emissionsmaxima bei unterschiedlichen Wellenlängen liegen, können mRNAs aus zwei oder mehr unterschiedlichen Proben in einem Ansatz gemessen werden. Hierzu werden die unterschiedlich markierten cDNAs in einem Hybridisierungsansatz vereinigt.

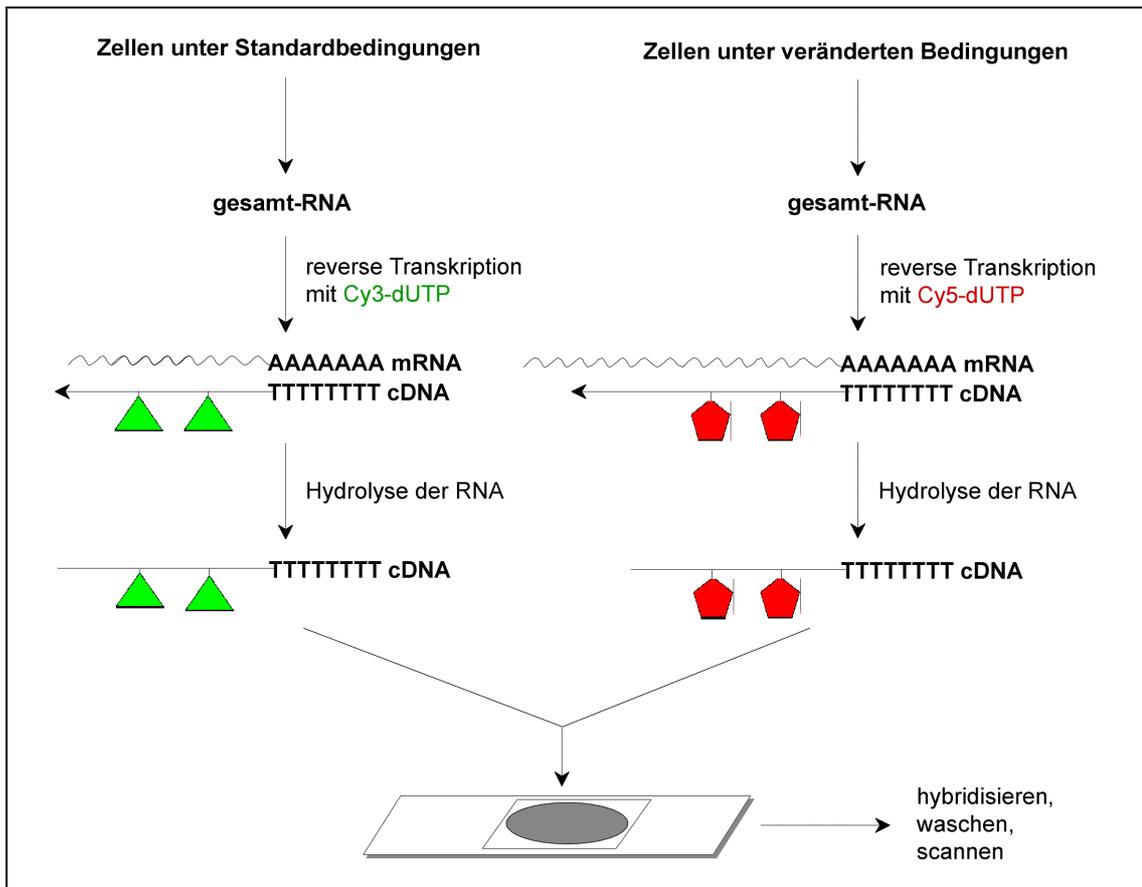


Abb. 1.8 Hybridisierung von cDNA-Arrays.

Übersicht über die einzelnen Arbeitsschritte bei der Hybridisierung mit zwei Proben unterschiedlicher Fluoreszenz.

Nach dem Hybridisieren und Waschen werden Arrays anschließend bei den relevanten Wellenlängen gescannt. Ein direkter Vergleich der Expression einzelner mRNAs zwischen den untersuchten Proben wird so möglich. Hier werden die einzelnen Messwerte für die verschiedenen Wellenlängen und damit für die jeweiligen untersuchten Proben zunächst intern kalibriert und in Graustufenbilder umgerechnet. Diese können dann überlagert, auf eine Referenz normiert und schließlich in farbige Kompositbilder umgesetzt werden. Parallel dazu werden die Einzelintensitäten und die jeweiligen Expressionsverhältnisse berechnet. Unter günstigen Bedingungen Zielsequenzen mit bis zu 300.000-fachem Expressionsunterschied detektiert werden (Lockhart et al., 1996; Johnston et al., 1998). Ein Beispiel für die Erzeugung der Kompositbilder ist im folgenden dargestellt:

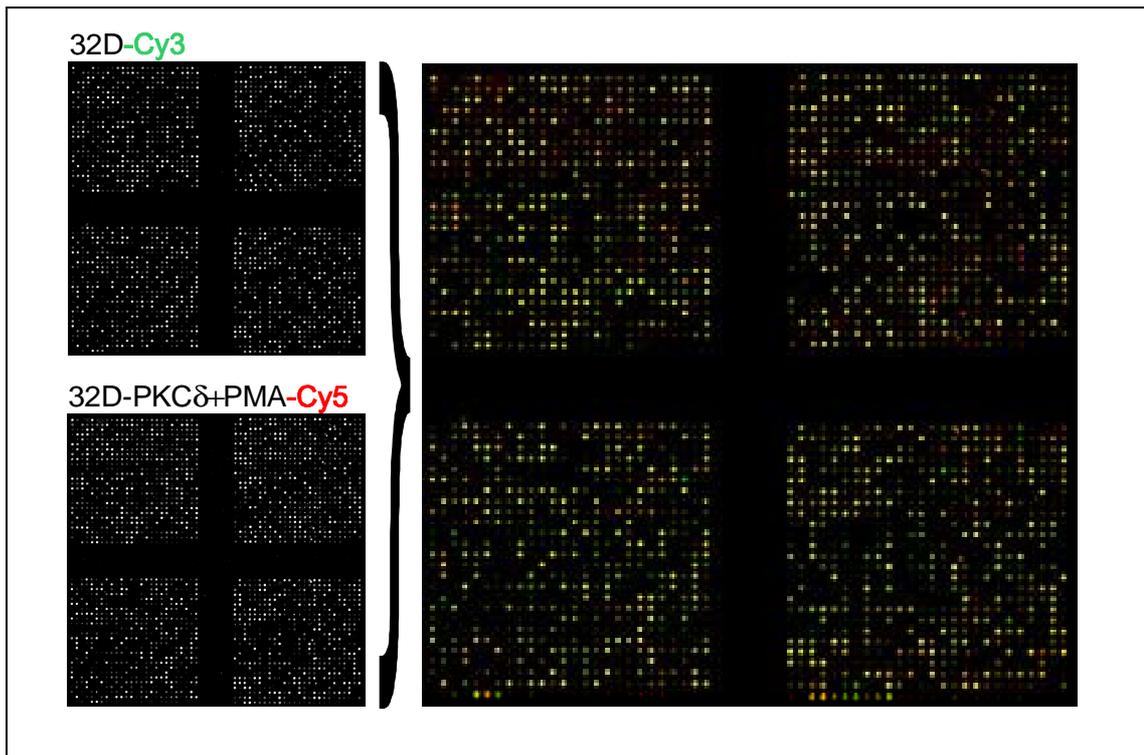


Abb. 1.9 Umwandlung der Fluoreszenzprofile.

Umwandlung der Fluoreszenzprofile von zwei unterschiedlich markierten Proben in das Kompositbild für die Hybridisierung.

Spots, deren Cy3-Signal stärker als das Cy5-Signal ist, werden im zusammengeführten Bild grün dargestellt. Ist dagegen das Cy5-Signal stärker, erscheint der Spot rot. Hieraus kann direkt abgelesen werden, in welcher der beiden RNA Präparationen die zugehörige mRNA stärker exprimiert ist. Gelbe Spots finden sich überall dort, wo die Expression und damit auch das Fluoreszenzsignal gleich stark ist. Die starken Signale und damit hellen Punkte gehen auf eine starke Expression der zugehörigen mRNAs zurück.

1.4.3 Einsatz von cDNA-Arrays in der aktuellen Forschung

1.4.3.1 Aufdecken neuer Signaltransduktionswege

Die Suche nach neuen und das bessere Verständnis der bekannten Signaltransduktionswege sind zentrale Anliegen der Forschung. Die Analyse von Transkriptom und Proteom liefert hierzu Momentaufnahmen des zellulären Geschehens.

Ein Beispiel für die Möglichkeiten der mRNA-Analyse durch cDNA-Microarrays ist die Untersuchung der Reaktion von gehungerten Fibroblasten auf serumhaltiges Medium. Diese Reaktion wird als Modell für die Wachstums- und Zellzykluskontrolle

betrachtet (Winkles, 1998). Bei der Untersuchung von rund 8.000 Genen zeigen mehr als 500 eine Änderung in ihrer Expression innerhalb von 16 h nach der Zugabe von Serum. Durch Zeitreihenuntersuchungen und Clusteranalysen ist es weiter möglich, einzelnen Gengruppen distinkte Expressionsprofile zuzuordnen. Dabei zeigt sich z.B., dass wiederholt solche Gene gemeinsam reguliert werden, deren Produkte für verschiedene Schritte eines gemeinsamen Prozesses verantwortlich sind (Vishwanath et al., 1999).

Ein anderes Beispiel ist die Erstellung von Expressionsprofilen in Hefezellen. Hier gelingt die Zuordnung bislang uncharakterisierter Gensequenzen zu Prozessen im Steroidstoffwechsel, der Proteinsynthese und der mitochondrialen Atmung (Hughes et al., 2000).

Die Untersuchung intrazellulärer Signaltransduktionswege mittels cDNA-Array ist auch ein Hauptbestandteil dieser Arbeit. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden in den jeweiligen Kapiteln dargestellt und diskutiert.

1.4.3.2 Arzneimittelforschung und Therapieüberwachung

Die Untersuchungen von erkrankten Geweben und von Medikamentenwirkungen auf das gesamte Zellgeschehen werden bisher weitgehend mit Ansätzen aus der Proteomforschung vorgenommen (Franzen et al., 1996; Alaiya et al., 1997).

Daneben kommt aber der umfassenden Untersuchung des mRNA-Bestandes der Zellen eine steigende Bedeutung zu. Hier sind vor allem die Erstellung von Wirkungs- und Toxikologieprofilen von Interesse (Nuwaysir et al., 1999). Hier werden durch Leitsubstanzen induzierte Veränderungen im Expressionsprofil mit Veränderungen verglichen, die durch bekannt toxische Substanzen verursacht werden. Potentiell toxische Kandidaten können so frühzeitig ausgeschlossen werden. Damit wird es möglich, die Forschung auf die vielversprechenderen Kandidaten zu fokussieren (Braxton und Bedilion, 1998).

Ergänzend kann auch die Wirkungsweise bereits verwendeter Medikamente genauer untersucht werden, um so eine Verbesserung der Therapie zu erreichen: In einer Kooperation mit dem Labor von Jane B. Trepel vom NIH, deren Ergebnis nicht Bestandteil dieser Arbeit ist, konnte gezeigt werden, dass das Krebsmedikament Lovastatin in den entarteten neuronalen Vorläuferzellen CHP-100 eine teilweise Revertierung bewirkte, auf die dann der Eintritt in die Apoptose der Zellen erfolgte.

Durch cDNA-Array Untersuchungen konnte hier z.B. die Induktion der S100-Expression, eines Proteinmarkers für Nervenzellen, nachgewiesen werden:

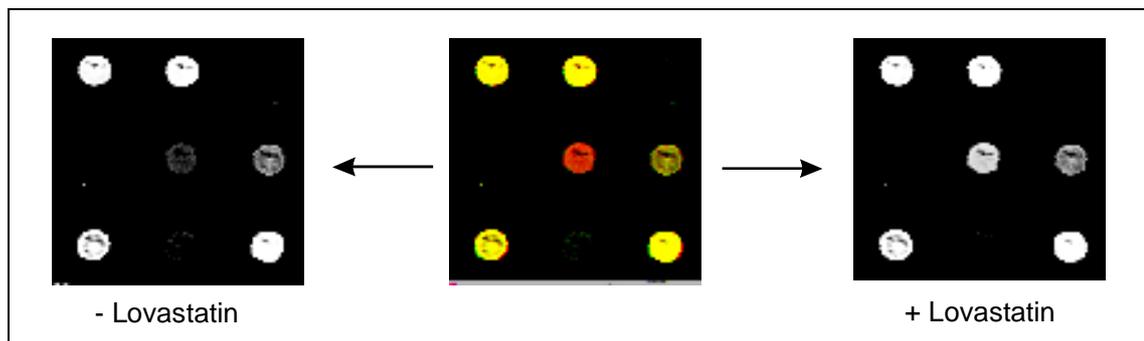


Abb. 1.10 Vergleich der S-100 Expression in CHP-100 Zellen mit cDNA-Array Analyse. Die Sequenz für den Nervenzellmarker S-100 ist im zentralen Spot aufgebracht. Zur Hybridisierung wurde Cy3-markierte cDNA aus unbehandelten Zellen und Cy5-markierte cDNA aus Lovastatinbehandelten Zellen eingesetzt.

1.4.3.3 Diagnostik

Die breite Untersuchung von Mutationen zur Abschätzung genetischer Risiken für die Entwicklung verschiedener Krankheiten wie Krebs oder cystische Fibrose (Cronin et al., 1996; Hacia et al., 1996) und die Genotypisierung anhand der bekannten Einzelnukleotid-Polymorphismen (Wang et al., 1998a) wird zur Zeit sowohl in der Wissenschaft als auch in der Gesellschaft kontrovers diskutiert (Reich, 2000).

Daneben gibt es aber vermehrt auch Untersuchungen, die die Krankheitsentwicklung zum Inhalt haben und nach neuen Ansatzpunkten für die Therapie suchen. mRNA-Untersuchungen können z.B. zur direkten Charakterisierung von Zellen oder Geweben eingesetzt werden. So gelingt es anhand von Arraydaten zwischen unterschiedlichen Leukämieformen zu unterscheiden (Golub et al., 1999). Untersuchungen an normalem und cancerogenem Colongewebe liefern ebenfalls tumorspezifische Expressionsmuster (Alan et al., 1999).

Durch die exakte Charakterisierung verschiedener Entartungsgrade z.B. von verschiedenen Krebsarten, wird es in Zukunft möglich sein, Therapieformen nach der Analyse von Patientenbiopsien auszuwählen. Neben einem verbesserten Therapieerfolg sollte dies auch zu einer Verminderung der Nebenwirkungen und zu einem zielgerichteten Einsatz monetärer Ressourcen führen.