

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Untersuchungen zum Mechanismus der
PKD-vermittelten EGF Rezeptor-
Transmodulation

Christina Besir
aus
Hannover

München 2002

Erklärung:

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Horst Domdey betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung:

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 02.08.2002

Christina Besir, geb. Bauer

Dissertation eingereicht am: 02.08.2002

Erster Gutachter: Prof. Dr. Axel Ullrich

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Horst Domdey

Mündliche Prüfung am: 27.01.2003

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | EINLEITUNG | 1 |
| 1.1 | Signalvermittlung durch Rezeptortyrosinkinasen | 2 |
| 1.1.1 | Aufbau und Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen..... | 2 |
| 1.1.2 | Der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und die EGF Rezeptorfamilie..... | 5 |
| 1.1.3 | Der Blutplättchen-abgeleitete Wachstumsfaktor (PDGF) und die PDGF Rezeptorfamilie | 7 |
| 1.1.4 | Substrate von Rezeptortyrosinkinasen | 9 |
| 1.2 | Signalübertragung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren | 12 |
| 1.2.1 | Heterotrimäre G-Proteine | 12 |
| 1.2.2 | Effektormoleküle von heterotrimären G-Proteinen und ihre Signalwirkung..... | 13 |
| 1.3 | Signalvermittlung durch Serin-/Threoninkinasen | 15 |
| 1.3.1 | MAP Kinasekaskaden und die Regulation der Genexpression..... | 15 |
| 1.3.2 | Die Phosphoinositidkaskade und die Proteinkinase C (PKC) Familie | 17 |
| 1.3.3 | Proteinkinase D | 20 |
| 1.3.3.1 | Aktivierung und Regulation von PKD | 20 |
| 1.3.3.2 | Substratproteine und Signalwege von PKD | 22 |
| 1.4 | Transmodulation des EGF Rezeptors | 24 |
| 1.5 | Transaktivierung..... | 27 |
| 1.6 | Zielsetzung | 28 |
| 2 | MATERIAL UND METHODEN | 29 |
| 2.1 | Bezugsquellennachweis..... | 29 |
| 2.1.1 | Chemikalien | 29 |
| 2.1.2 | Enzyme..... | 30 |
| 2.1.3 | Radiochemikalien..... | 30 |
| 2.1.4 | „Kits“ und Sonstiges | 30 |
| 2.1.5 | Wachstumsfaktoren und andere Liganden | 31 |
| 2.1.6 | Medien und Puffer..... | 31 |
| 2.1.7 | Zellkulturmedien | 31 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.1.8 | Stammlösungen und häufig verwendete Puffer | 32 |
| 2.1.9 | Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper | 33 |
| 2.1.9.1 | Bakterienstämme | 33 |
| 2.1.9.2 | Zelllinien | 33 |
| 2.1.9.3 | Antikörper | 34 |
| 2.1.10 | Plasmide und Oligonukleotide | 35 |
| 2.1.10.1 | Ausgangsvektoren | 35 |
| 2.1.10.2 | Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmidkonstrukte | 36 |
| 2.1.10.3 | Wichtige Oligonukleotide | 37 |
| 2.2 | Molekularbiologische Methoden..... | 38 |
| 2.2.1 | Plasmidpräparation für analytische Zwecke | 38 |
| 2.2.2 | Plasmidpräparation für präparative Zwecke..... | 38 |
| 2.2.3 | Enzymatische Behandlung von DNA | 38 |
| 2.2.3.1 | Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen..... | 38 |
| 2.2.3.2 | Dephosphorylierung von 5'-Enden | 38 |
| 2.2.3.3 | Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase..... | 39 |
| 2.2.4 | Gelelektrophorese von DNA..... | 39 |
| 2.2.5 | Isolierung von DNA-Fragmenten..... | 39 |
| 2.2.6 | DNA-Transfer in <i>E.coli</i> Bakterien | 39 |
| 2.2.6.1 | Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> Bakterien | 39 |
| 2.2.6.2 | Transformation von kompetenten <i>E.coli</i> Bakterien | 39 |
| 2.2.6.3 | Dauerkulturen von <i>E.coli</i> Bakterien..... | 39 |
| 2.2.7 | Gezielte Mutagenese von DNA..... | 39 |
| 2.2.7.1 | Herstellung von Uracilhaltiger, einzelsträngiger pcDNA3 DNA | 40 |
| 2.2.7.2 | Synthese des mutierten Stranges | 40 |
| 2.2.8 | Sequenzierung | 40 |
| 2.2.9 | Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR | 40 |
| 2.2.9.1 | PCR-Amplifikation von DNA und cDNA Fragmenten | 40 |
| 2.2.9.2 | Aufreinigung von PCR-Produkten | 41 |
| 2.2.9.3 | Klonierung von PCR-Produkten | 41 |
| 2.3 | Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen | 42 |
| 2.3.1 | Allgemeine Zellkulturtechniken..... | 42 |
| 2.3.2 | Mykoplasmentest | 42 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 2.3.3 | Kalziumphosphat-Transfektion | 42 |
| 2.3.4 | Lipofectamine®-Transfektion von Cos7-Zellen | 42 |
| 2.3.5 | Bestimmung der Transfektionseffizienz | 43 |
| 2.3.6 | Retroviraler Gentransfer in Rat1-Fibroblasten..... | 43 |
| 2.4 | Proteinanalytische Methoden..... | 44 |
| 2.4.1 | Expression und Aufreinigung eines Glutathion-S-Transferase (GST)- Fusionsproteins..... | 44 |
| 2.4.1.1 | Expression eines GST-Fusionsproteins in Bakterien..... | 44 |
| 2.4.1.2 | Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sepharose | 44 |
| 2.4.2 | Triton X100-Lyse von Zellen..... | 45 |
| 2.4.3 | Proteinbestimmung..... | 45 |
| 2.4.4 | Immunpräzipitation von Proteinen..... | 45 |
| 2.4.5 | In vitro-Assoziation mit GST-Fusionsprotein..... | 46 |
| 2.4.6 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) | 46 |
| 2.4.7 | Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen | 46 |
| 2.4.8 | Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran..... | 46 |
| 2.4.9 | Immundetektion (Immunoblot-Analyse)..... | 47 |
| 2.5 | Zellbiochemische und -biologische Untersuchungen | 48 |
| 2.5.1 | Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine | 48 |
| 2.5.2 | Bestimmung der katalytischen Aktivität von Serin-/Threoninkinasen durch <i>in vitro</i> Kinaseassays..... | 48 |
| 2.5.2.1 | In vitro Kinasereaktion mit immunpräzipitierter JNK-MAP Kinase..... | 49 |
| 2.5.2.2 | In vitro Kinasereaktion mit immunpräzipitierter Erk-MAP Kinase..... | 49 |
| 2.5.2.3 | In vitro Kinasereaktion mit immunpräzipitierter Proteinkinase D..... | 49 |
| 3 | ERGEBNISSE | 50 |
| 3.1 | PKD-vermittelte EGF Rezeptortransmodulation und Inhibition des EGF-induzierten JNK-Signalweges | 50 |
| 3.1.1 | Aktivierung der PKD durch verschiedene Liganden in Rat1-Zellen | 50 |
| 3.1.2 | Herstellung einer dominant-negativen PKD-Mutante und ihre Verifizierung in verschiedenen Zellsystemen..... | 52 |

| | | |
|------------|---|-----------|
| 3.1.2.1 | Suppression der PDGF- und TPA-induzierten PKD-Aktivität in HEK 293-Zellen durch die dominant-negative PKD-Mutante K612M/D727A | 52 |
| 3.1.2.2 | Aktivität von PKD-wt und der PKD-KMDA-Mutante in Cos7-Zellen | 55 |
| 3.1.2.3 | Suppression der PKD-Aktivität durch KMDA in Rat1-Zellen | 56 |
| 3.1.3 | Suppression der EGF Rezeptor-Threoninphosphorylierung in Gegenwart der PKD-Mutante KMDA | 58 |
| 3.1.4 | Effekt von PKD auf die EGF-induzierte JNK-Aktivierung | 61 |
| 3.1.4.1 | Inhibition des JNK-Signalweges durch PDGF-induzierte PKD in Rat1-Zellen ... | 61 |
| 3.1.4.2 | Inhibition des JNK-Signalweges durch Endothelin-induzierte PKD in Rat1-Zellen..... | 63 |
| 3.1.4.3 | Wirkung der LPA-induzierten PKD auf den JNK-Signalweg in Rat1-Zellen | 65 |
| 3.2 | Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptors durch den PDGF Rezeptor | 68 |
| 3.3 | Assoziation von PKD mit dem PDGF Rezeptor und seinen Substraten | 72 |
| 3.3.1 | Interaktion von PKD mit tyrosinphosphorylierten Proteinen in verschiedenen Mausfibroblasten-Zelllinien | 72 |
| 3.3.2 | Interaktion von PKD mit dem PDGF Rezeptor in Rat1-Zellen | 77 |
| 3.3.3 | Interaktion von PKD mit dem PDGF Rezeptor in humanen Glioblastomzellen | 80 |
| 3.3.4 | Interaktion von PKD mit dem PDGF Rezeptor in transfizierten 293 Zellen | 83 |
| 3.3.4.1 | Interaktion von endogener und transfizierter PKD mit transfiziertem PDGF Rezeptor | 83 |
| 3.3.4.2 | Kopräzipitation von PKD und der PKD-Mutante K612M mit dem PDGF Rezeptor und von dem PDGF Rezeptor mit PKD | 85 |
| 3.3.4.3 | Kopräzipitation von tag-PDGF Rezeptor-Konstrukten mit PKD | 86 |
| 3.3.5 | Identifizierung der Binderegionen für die Assoziation von PKD und dem PDGF Rezeptor | 88 |
| 3.3.5.1 | Identifizierung PKD-bindender Regionen des PDGF Rezeptors | 89 |
| 3.3.5.2 | Identifizierung PDGF Rezeptor-bindender Regionen von PKD | 90 |
| 3.3.6 | Wechselwirkung von PKD mit PLC γ und Syk | 92 |
| 3.3.6.1 | Interaktion von PKD mit PLC γ in HEK 293-Zellen | 92 |
| 3.3.6.2 | Interaktion von PKD mit PLC γ in Rat1-Fibroblasten, 3T3 L1-Fibroblasten und Glioblastomzellen | 93 |

| | | |
|------------|--|------------|
| 3.3.6.3 | Interaktion von PKD mit Syk in HEK 293-Zellen..... | 94 |
| 4 | DISKUSSION | 96 |
| 4.1 | Transmodulation des EGF Rezeptors durch PKD..... | 96 |
| 4.2 | JNK-Inhibition durch PKD..... | 97 |
| 4.3 | PKC-vermittelte Transaktivierung des EGF Rezeptors..... | 99 |
| 4.4 | Assoziation von PKD mit dem PDGF Rezeptor und seinen Substraten | 101 |
| 5 | ZUSAMMENFASSUNG | 106 |
| 6 | LITERATURVERZEICHNIS | 107 |
| 7 | ABKÜRZUNGEN | 130 |
| 8 | LEBENS LAUF | 133 |

1 EINLEITUNG

Für die Entwicklung und den Erhalt eines vielzelligen Organismus bedarf es eines komplexen Kommunikationssystems. Jede Zelle muss die Möglichkeit der interzellulären Kommunikation besitzen, um auf verschiedenste Signale mit entsprechenden intrazellulären Programmen reagieren zu können.

Die interzelluläre Kommunikation ermöglicht eine Vielzahl von Zellfunktionen, wie z.B. Zellstoffwechsel, Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose, ebenso wie Zellbewegung, Adhäsion, die Organisation des Zytoskeletts und der extrazellulären Matrix.

Eine wichtige Rolle bei der Signalvermittlung spielen hierbei Hormone, Zytokine, Wachstums- und Differenzierungsfaktoren. Die Bindung dieser Liganden an spezifische Rezeptoren löst die Aktivierung bestimmter intrazellulärer Signalkaskaden aus, die, durch Regulation der Genexpression, zur Beeinflussung oder auch Auslösung biochemischer und physiologischer Vorgänge führen.

Wie wichtig diese fein aufeinander abgestimmten Mechanismen für einen Organismus sind, wird bei Fehlregulationen ersichtlich, die Störungen in den Signalabläufen hervorrufen und zu Krankheiten wie z.B. Krebs führen können (Alroy und Yarden, 1997; Laird und Shalloway, 1997).

Eine der Hauptklassen der zellmembranständigen Rezeptoren sind die Rezeptortyrosinkinasen (RTK_n), deren intrinsische Tyrosinkinaseaktivität entscheidend für die Vermittlung extrazellulärer Signale ist (van der Geer *et al.*, 1994). Eine weitere Klasse bilden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR_n), die im Gegensatz zu den RTK_n keine eigene Kinaseaktivität besitzen, sondern ein Signal nach Bindung ihres Liganden über die Interaktion mit heterotrimären G-Proteinen ins Zellinnere weiterleiten (Coughlin, 1994; Gutkind, 1998).

Für die Signalweitergabe in der Zelle steht eine breite Palette an zytoplasmatischen Proteinen zur Verfügung, darunter vornehmlich Tyrosin- oder Serin/Threoninkinasen, die ihre zellulären Substrate kovalent modifizieren, sowie Adapterproteine ohne Enzymaktivität. Zu den bekanntesten Signalketten solcher Proteine zählen die MAP Kinasekaskade und die Phosphoinositidkaskade.

So wird ein zelluläres Signal von einem Membranrezeptor entweder auf direktem Wege oder, nach neueren Erkenntnissen, auch über die Transaktivierung oder Transmodulation weiterer Membranrezeptorkinasen zum Zellkern weitergeleitet.

1.1 Signalvermittlung durch Rezeptortyrosinkinasen

Die häufigste Art der Signalweiterleitung wird durch transiente Phosphorylierungen von Proteinen vermittelt, die in der Zelle hauptsächlich an Serin-, Threonin- und Tyrosinresten stattfinden. Obwohl letztere nur mit einem Anteil von 0,05 % bis 0,1 % an der Gesamtyrosinphosphorylierung in der Zelle beteiligt sind, ist die reversible Tyrosinphosphorylierung trotzdem eine der wichtigsten regulatorischen Mechanismen für die Steuerung von intrazellulären Signalkaskaden und den daraus resultierenden physiologischen Vorgängen (Hunter und Sefton, 1980; Hunter, 1995).

Für die Regulation der reversiblen Tyrosinphosphorylierung ist das Zusammenwirken zweier Klassen von Enzymen erforderlich: Proteintyrosinkinasen (PTKn) übertragen Phosphat auf Tyrosinreste, während Proteintyrosinphosphatasen (PTPn) Phosphat von Tyrosinresten entfernen (Sun, 1994; Streuli, 1996). Beide Proteinklassen liegen in der Zelle entweder in membranständiger oder in zytosolischer Form vor.

Für diese Arbeit sind besonders einige Mitglieder der Familie der membranständigen Proteintyrosinkinasen von Wichtigkeit, welche in nachstehenden Kapiteln vorgestellt werden.

1.1.1 Aufbau und Aktivierung der Rezeptortyrosinkinasen

Rezeptortyrosinkinasen setzen sich aus einer glykosylierten, extrazellulären Domäne und einem zytosomatischen Anteil zusammen, die durch eine einspännig in der Membran verankerten helikalen Domäne verbunden sind. Der extrazelluläre Anteil der verschiedenen RTKn ist für die Ligandenbindung verantwortlich und zeichnet sich durch eine Vielfalt unterschiedlicher Sequenzmotive aus. Diese strukturellen Unterschiede werden zur Einteilung und Zusammenfassung der bislang 50 bekannten RTKn in 19 verschiedene Unterfamilien verwendet (Plowman *et al.*, 1994; van der Geer *et al.*, 1994), die in Abb. 1.1 aufgeführt sind. So besitzt die Familie der EGF (epidermal growth factor) Rezeptoren der Unterfamilie I zwei cysteinreiche Regionen in ihrem extrazellulären Bereich, während Mitglieder der PDGF (platelet-derived growth factor) Rezeptorfamilie der Unterfamilie III sich dort durch ihre fünf Immunglobulin-ähnlichen Domänen auszeichnen.

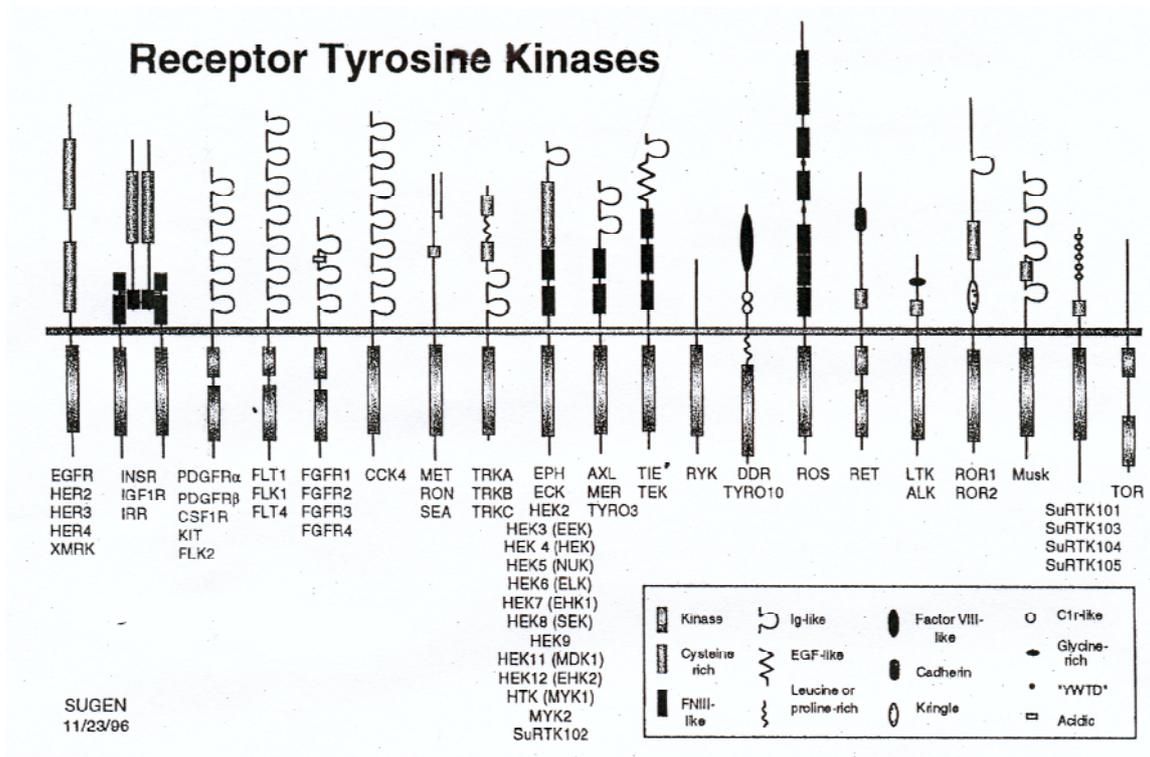


Abb. 1.1: Die Rezeptortyrosinkinase-Unterfamilien. Die Abbildung zeigt die 20 Subklassen, in welche Rezeptortyrosinkinasen auf Grund von Sequenzvergleichen der extrazellulären Domäne eingeteilt wurden (SUGEN, 1996).

Der zytoplasmatische Bereich der RTKn wird durch drei verschiedene Abschnitte definiert: Die Juxtamembranregion, die sich unmittelbar an die Transmembrandomäne anschließt, die Kinasedomäne und der carboxyterminale Bereich (Ullrich und Schlessinger, 1990). Die ca. 250-300 lange, bei allen RTKn hochkonservierte Kinasedomäne besitzt eine ATP-Bindungsstelle und katalysiert die Autophosphorylierung des Rezeptors, sowie die Tyrosinphosphorylierung ihrer Substrate (Schlessinger, 1988; Yarden und Ullrich, 1988).

Bei den Mitgliedern der FGF (fibroblast growth factor) und PDGF (platelet-derived growth factor) Rezeptorfamilien ist die Kinasedomäne durch eine Insertionssequenz unterbrochen, die mehrere Autophosphorylierungs- und Substratbindungsmotive aufweist (Malarkey *et al.*, 1995). Diese finden sich in der Regel auch im wenig konservierten carboxyterminalen Bereich. Bei diesen Motiven handelt es sich um hochspezifische Bindungsstellen für Substratproteine, andererseits kann die Autophosphorylierung spezifischer Tyrosinreste auch zur katalytischen Aktivität des Rezeptors beitragen (Margolis *et al.*, 1989; Margolis *et al.*, 1990). Die Vielfalt der Möglichkeiten, die sich durch die Phosphorylierung von Tyrosinresten für die Bindung von Substratproteinen ergibt, ist am Beispiel des PDGFβ Rezeptors in Abb. 1.2 dargestellt.

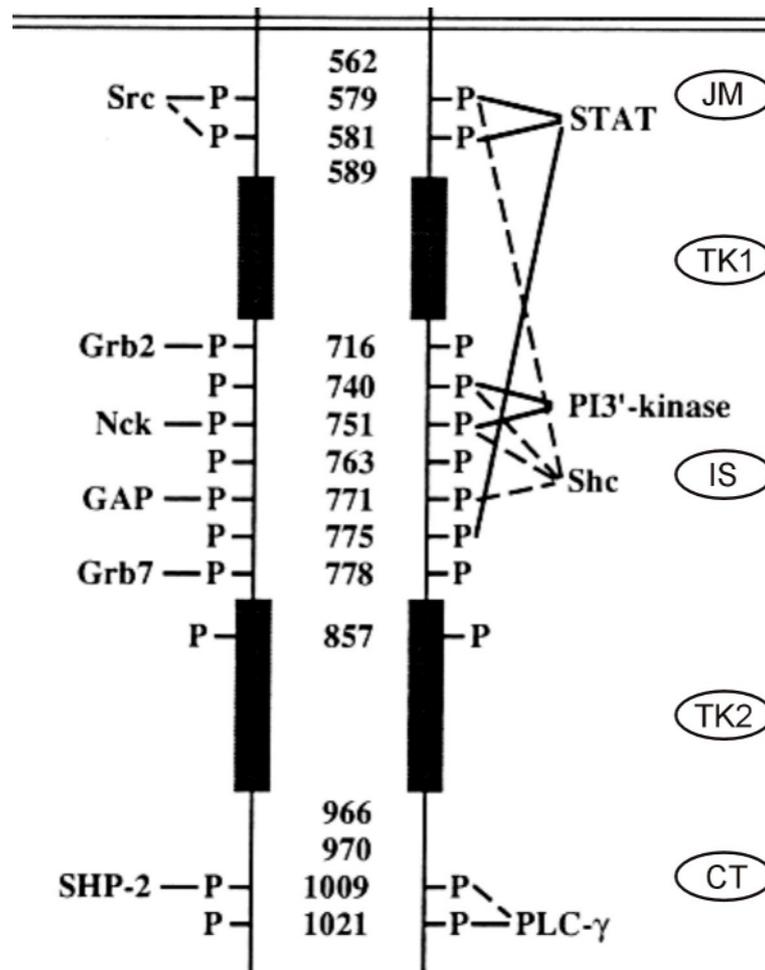


Abb. 1.2: Tyrosinphosphorylierungsstellen des PDGF β Rezeptors. Der PDGF Rezeptor wird nach Aktivierung an zahlreichen Tyrosinresten in der JM-Region, der IS und dem CT autophosphoryliert und ist so in der Lage, mit einer Vielfalt von Substratproteinen über ihre SH2 (Src-Homologie 2)-Domänen zu interagieren. Abk: CT: Carboxyterminus; IS: Insertionssequenz; JM: Juxtamembranregion; TK1: Tyrosinkinasedomäne 1; TK2: Tyrosinkinasedomäne 2 (nach Heldin, 1997).

Der Aktivierung von RTK α n liegt in der Regel die Dimerisierung von zwei Rezeptormonomeren zu Grunde, ein Mechanismus, der immer noch nicht exakt verstanden ist, obwohl er bereits vor über 10 Jahren anhand der Dimerisierung des EGF Rezeptors nach Stimulation durch monomere EGF-Liganden beschrieben wurde (Yarden und Schlessinger, 1987). Einzelne Rezeptormoleküle mit geringer Affinität für ihren Liganden befinden sich mit Rezeptordimeren, welche ihren Liganden mit hoher Affinität binden, in einem Reaktionsgleichgewicht. Das bisher wichtigste Modell beschreibt eine ligandeninduzierte Konformationsänderung (Greenfield *et al.*, 1989), die das Reaktionsgleichgewicht zugunsten der dimeren Form verschiebt, wohingegen ein weiteres für die Rolle von bivalenten Liganden, wie z.B. PDGF oder EGF, plädiert, die zwei Rezeptormoleküle binden und so Rezeptorkomplexe bilden (Gullick, 1994; Tzahar *et al.*, 1997).

In jedem Fall führt die Rezeptordimerisierung durch ihre intrinsische Tyrosinkinaseaktivität zur gegenseitigen intermolekularen *trans*-Phosphorylierung der Rezeptoren an zytoplasmatischen

Tyrosinresten (Ullrich und Schlessinger, 1990; Lemmon und Schlessinger, 1994) und somit zur Bindung und Tyrosinphosphorylierung von Substratproteinen.

Neben der Bildung von Homodimeren kann Ligandenstimulation auch die Heterodimerisierung von RTKn induzieren (Lemmon und Schlessinger, 1994). Dies wurde sowohl innerhalb einer Unterfamilie, wie z.B. bei der EGF, PDGF und FGF Rezeptorfamilie (Wallasch *et al.*, 1995) als auch familienübergreifend gezeigt. So sind zusätzlich Assoziationen des EGF Rezeptors mit den PDGF Rezeptor (Habib *et al.*, 1998) und von HER2 mit dem IL-6 Rezeptor bekannt (Qiu *et al.*, 1998).

Bei den Liganden der RTKn handelt es sich vorwiegend um Wachstums- oder Differenzierungsfaktoren. Des weiteren können RTKn auch unabhängig von Liganden aktiviert werden. So ist z.B. die Inaktivierung von antagonistisch wirkenden PTPasen ausreichend, um die Tyrosinphosphorylierung von RTKn zu induzieren (Jallal *et al.*, 1992). Ebenso kann zellulärer Stress wie UV-Bestrahlung oder osmotischer Schock die Aktivierung von RTKn zur Folge haben (King *et al.*, 1989; Sachsenmaier *et al.*, 1994).

1.1.2 Der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) und die EGF Rezeptorfamilie

EGF wurde als erstes mitogenes Polypeptid aus den Speicheldrüsen der männlichen Maus isoliert (Cohen und Elliott, 1963; Savage *et al.*, 1972) und ist der Prototyp einer großen Familie EGF-ähnlicher Wachstumsfaktoren. Sie alle besitzen eine oder mehrere EGF-ähnliche Domänen, die drei biologisch wichtige Disulfidbrücken enthalten (Engel, 1989; Massague und Pandiella, 1993). Außerdem werden sie als transmembrane Vorläuferproteine synthetisiert, aus welchen durch proteolytische Spaltung mittels Metalloproteasen die biologisch aktiven Liganden extrazellulär freigesetzt werden (Massague und Pandiella, 1993), und von denen die wichtigsten in Abb. 1.3 dargestellt sind.

Die spezifischen Rezeptoren für diese Liganden gehören zu der RTK Unterfamilie Typ I, die aus vier Mitgliedern besteht: Dem EGF-Rezeptor (HER, ErbB1) (Ullrich *et al.*, 1984), HER2 (ErbB2/neu) (Coussens *et al.*, 1985), HER3 (ErbB3) (Kraus *et al.*, 1989) und HER4 (ErbB4) (Plowman *et al.*, 1993). Aufgrund ihrer Affinität zu den Liganden werden diese in drei Gruppen eingeteilt: EGF, TGF- α (transforming growth factor- α) und Amphiregulin binden nur den EGF Rezeptor (HER), die *neu*-Differenzierungsfaktoren (NDFn), auch Neureguline (NRGe) oder Hereguline genannt, binden nur HER3 und HER4, und Betazellulin (BTC), Epiregulin und der Heparin-bindende EGF-ähnliche Wachstumsfaktor (HB-EGF) binden den EGF Rezeptor und HER4 (Riese und Stern, 1998).

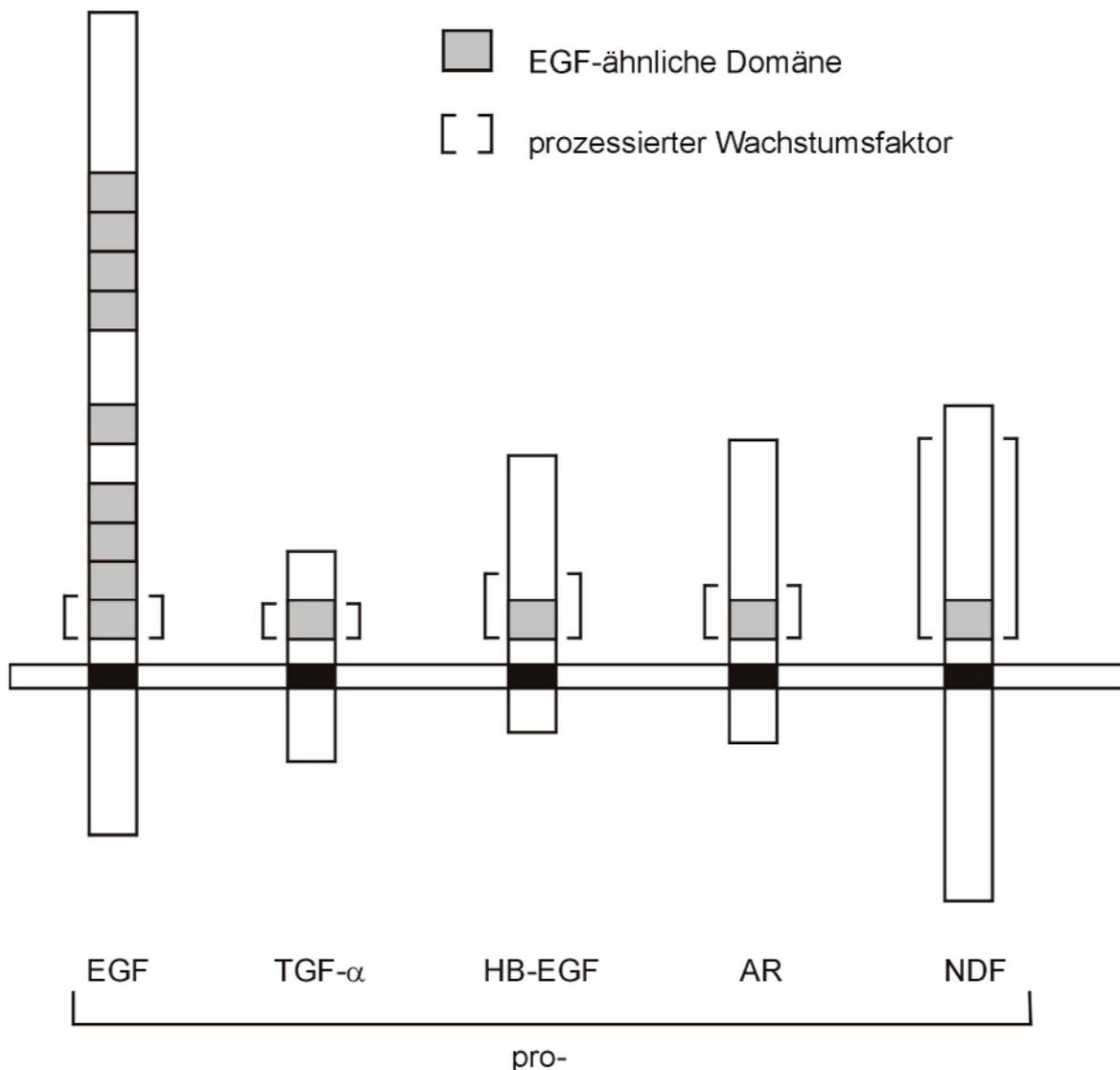


Abb. 1.3: Die Familie der EGF-ähnlichen Liganden. Die Abbildung zeigt die wichtigsten Mitglieder der EGF-ähnlichen Ligandenfamilie und den Bereich, der nach proteolytischer Spaltung freigesetzt wird. Abk.: AR: Amphiregulin; EGF: Epidermal growth factor; HB-EGF: Heparin-binding EGF-like growth factor; NDF: Neu-differentiation factor; TGF- α : Transforming growth factor- α .

Für HER2 ist bisher kein Ligand identifiziert worden, und aus dem Grund ist es auf die Assoziation mit den anderen Rezeptortypen angewiesen, um seine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität zu entfalten (Tzahar *et al.*, 1996). Bei der Heterodimerisierung stellt es in der EGF Rezeptorfamilie den bevorzugten Partner dar (Graus-Porta *et al.*, 1997), vor allem für HER3, das umgekehrt zwar Liganden binden kann, aber aufgrund von Punktmutationen in der ansonsten hochkonservierten Kinasedomäne einer enzymatisch aktiven katalytischen Domäne entbehrt (Guy *et al.*, 1994).

Aufgrund der Möglichkeit zur Heterodimerisierung und Einbeziehung verschiedener zytosolischer Substrate ergibt sich durch Aktivierung mit verschiedenen Liganden ein komplexes Netzwerk an Signalübertragungskaskaden. Weil jeder der acht verschiedenen EGF-ähnlichen Ligan-

den die Bildung eines bestimmten Rezeptorhomo- bzw. -heterodimers besonders begünstigt, ist das sich daraus ergebende Spektrum an biologischen Antworten entsprechend vielfältig (Alroy und Yarden, 1997; Riese und Stern, 1998).

Da Wachstumsfaktoren wie EGF in erster Linie mitogene Signale vermitteln, sind die Mitglieder dieser Rezeptorfamilie unter anderem mit der Entstehung von Krebs beim Menschen in Zusammenhang gebracht worden (Ullrich *et al.*, 1984; Pierce *et al.*, 1991; Lemoine *et al.*, 1992). So findet sich eine erhöhte Genaktivität der EGFRn bei Brust-, Blasen-, Magen- und Lungenkarzinomen (Prigent und Lemoine, 1992). Eine besonders wichtige Rolle spielt die Amplifikation und/oder erhöhte Aktivität des *her2*-Gens in Ovarial- und Brustkarzinomen, in denen sie mit einer schlechten Überlebensprognose der betroffenen Patienten in Verbindung steht (Slamon *et al.*, 1987; Slamon *et al.*, 1989). Diese Erkenntnis führte schließlich zu einer erfolgreichen Anwendung eines monoklonalen Antikörpers (Herceptin) gegen HER2 bei Patientinnen mit Brustkrebs in fortgeschrittenem Stadium (Goldenberg, 1999).

1.1.3 Der Blutplättchen-abgeleitete Wachstumsfaktor (PDGF) und die PDGF Rezeptorfamilie

PDGF wurde in menschlichen Blutplättchen für Fibroblasten (Ross *et al.*, 1974), glatte Muskelzellen (Kohler und Lipton, 1974) und Gliazellen entdeckt (Westermarck und Wasteson, 1976). Mittlerweile weiß man, dass sich die Expression dieses Wachstumsfaktors und seiner Rezeptoren auch auf viele andere Gewebezelltypen erstreckt, die im Verband vorliegen (Raines und Ross, 1993).

Inzwischen wurden vier verschiedene PDGF-Ketten charakterisiert: PDGF-A und -B (Doolittle *et al.*, 1983; Waterfield *et al.*, 1983; Betsholtz *et al.*, 1986), -C (Ding *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000) und -D (Bergsten *et al.*, 2001; LaRochelle *et al.*, 2001). In aktiver Form existiert PDGF in homo- bzw. heterodimeren Isoformen, die wichtigsten sind PDGF-AA, PDGF-AB und PDGF-BB genannt, welche mittels Disulfidbrücken aus den zwei homologen Polypeptidketten A und B gebildet werden (Heldin und Westermarck, 1991). PDGF spielt wie EGF eine wichtige Rolle in der Zellproliferation und Transformation, darüber hinaus in der Organisierung des Zytoskeletts und der Migration (Heldin und Westermarck, 1999), wobei letztere von physiologischer Wichtigkeit für Prozesse wie Wundheilung und Embryonalentwicklung ist (Ross *et al.*, 1990; Heldin und Westermarck, 1999).

Die PDGF-Isoformen binden mit verschiedenen Affinitäten an zwei PDGF Rezeptortypen, die der RTK Unterfamilie III zugeordnet werden: Der PDGF α Rezeptor (Claesson-Welsh *et al.*,

1989; Claesson-Welsh *et al.*, 1989) weist eine hohe Affinität für alle Isoformen auf, der PDGF β Rezeptor (Claesson-Welsh *et al.*, 1988) hingegen nur für die B-Kette, wobei er mit sehr hoher Affinität die BB-Form und mit niedriger Affinität die AB-Form bindet (Claesson-Welsh, 1994). Darüber hinaus können die PDGF-CC- bzw. die -DD-Isoform an den PDGF α Rezeptor bzw. - β Rezeptor binden (Li *et al.*, 2000; LaRoche *et al.*, 2001).

Neben den beiden PDGF Rezeptoren wurden drei weitere, ihnen homologe RTKs gefunden: Der Rezeptor für den Stammzellen-Faktor (SCF), c-kit genannt (Yarden *et al.*, 1987; Qiu *et al.*, 1988; Blume-Jensen *et al.*, 1991), der *colony*-stimulierende Faktor-1 (CSF-1) Rezeptor (Rettenmier *et al.*, 1986; Yeung *et al.*, 1987) und der Fötale-Leber-Kinase-2 (Flk-2) Rezeptor (Rosnet *et al.*, 1993; Hannum *et al.*, 1994).

Durch die Ligandenbindung können sich für die PDGF Rezeptoren alle drei möglichen Formen der Rezeptordimerisierung ergeben (Claesson-Welsh und Heldin, 1989; Heldin *et al.*, 1989; Seifert *et al.*, 1989), welche in jedem Fall zu oben beschriebener Konformationsänderung und anschließender Transphosphorylierung führt (Kelly *et al.*, 1991).

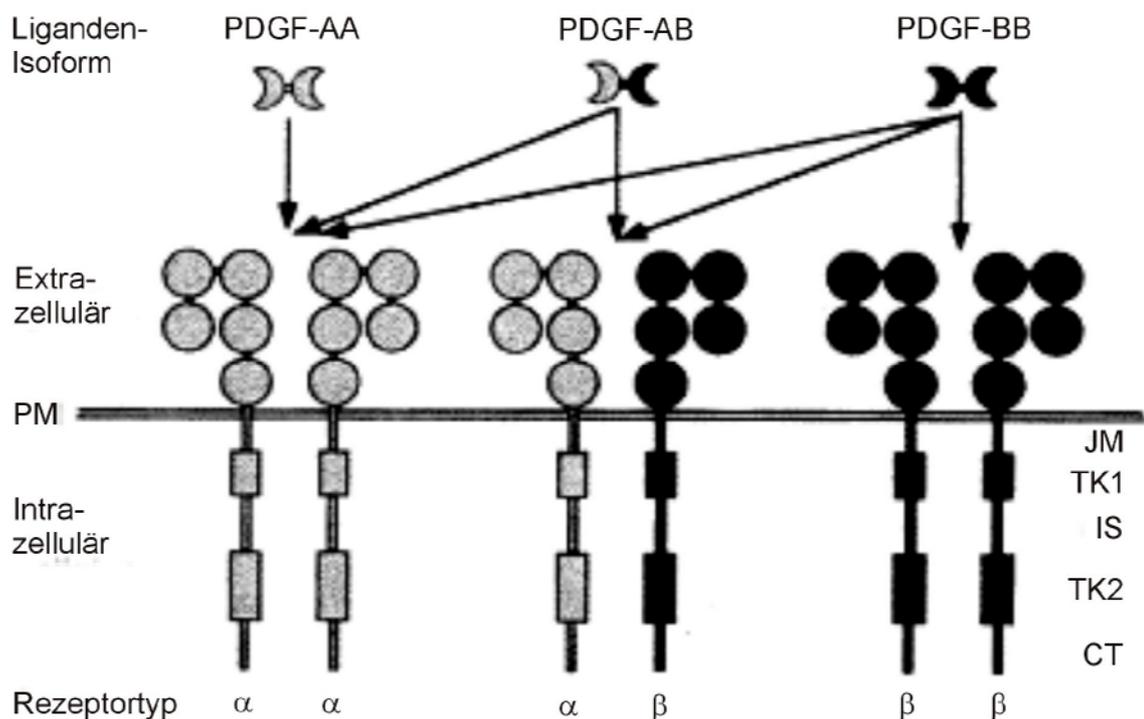


Abb. 1.4: Die wichtigen PDGF-Isoformen und Affinität zu ihren Rezeptoren. Die Pfeile zeigen die Spezifität der Bindung von den PDGF-Isoformen an die PDGF α und - β Rezeptoren. Abhängig von der PDGF-Isoform ergeben sich verschiedene Rezeptordimere. Abk.: CT: Carboxyterminus; IS: Insertionssequenz; JM: Juxtamembranregion; PM: Plasmamembran; TK1: Tyrosinkinasedomäne 1; TK2: Tyrosinkinasedomäne 2 (nach Claesson-Welsh, 1994).

1.1.4 Substrate von Rezeptortyrosinkinasen

Nach ihrer Aktivierung initiieren RTKs durch die Assoziation mit spezifischen Proteinen intrazelluläre Signalkaskaden und geben dadurch den externen Stimulus an zytoplasmatische oder Zellkern-lokalisierte Zielproteine weiter. Die Bindung von interagierenden Proteinen erfolgt dabei vielfach an spezifische Phosphotyrosinreste durch SH2 (src homology-2)-Domänen (Mayer und Baltimore, 1993; Pawson, 1995), oder auch durch PTB (phosphotyrosine binding)-Bindungsmotive (Kavanaugh *et al.*, 1995). Die Selektivität dieser Interaktionen wird hierbei durch die SH2- oder PTB-Domäne und die das phosphorylierte Tyrosin umgebenden Aminosäuren bedingt (Songyang *et al.*, 1993; van der Geer *et al.*, 1995). Weiterhin besitzen viele Signalproteine auch SH3 (src homology-3)-Domänen, welche an prolinreiche Regionen in Proteinen binden können (Yu *et al.*, 1994), sowie PH (Pleckstrin homology)-Bindungsmotive, welche mit verschiedenen Phospholipiden und den G $\beta\gamma$ -Dimeren aus heterotrimeren G-Proteinen wechselwirken können (Shaw, 1996; Franke *et al.*, 1997). Viele Signalproteine enthalten mehrere Bindungsmodule und können damit zur Bildung multimerer Signalkomplexe beitragen (Pawson und Scott, 1997).

Aufgrund ihrer Primärstruktur lassen sich Proteine mit SH2-Domänen in zwei Klassen einteilen (Boonstra *et al.*, 1995). Zum Typ I gehören Proteine, die eine Kinaseaktivität aufweisen.

Ein wichtiger Vertreter dieser Klasse ist die Phosphoinositid-spezifische Phospholipase C γ (PLC γ), die neben einer SH3-Domäne zwei SH2-Domänen aufweist, mit denen sie an spezifische phosphorylierte Tyrosinreste von RTKs, wie z.B. dem EGF Rezeptor oder dem PDGF Rezeptor bindet. Dieses Enzym leitet die wichtige Phosphoinositidkaskade ein, indem es die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP $_2$) katalysiert (Wahl und Carpenter, 1991).

Die α - und β -Form der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-Kinase), die sich jeweils aus einer regulatorischen p85- und einer katalytischen p110-Untereinheit zusammensetzen (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997), interagieren besonders mit dem PDGF und dem Insulinrezeptor, (Hayashi *et al.*, 1992; Kavanaugh *et al.*, 1992). Die Bindung erfolgt über die SH2-Domänen der p85-Untereinheit, welche daraufhin von den aktivierten RTKs tyrosinphosphoryliert wird und nun wiederum verstärkt die D-3'-Hydroxyloposition von Phosphatidylinositolen phosphoryliert (Cooper und Kashishian, 1993). *In vivo* scheint dabei o.g. PIP $_2$ das bevorzugte Zielprotein zu sein, dem, in Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PI-3,4,5-P $_3$) umgewandelt, eine mitogene Funktion zukommt (Soltoff *et al.*, 1992).

Die zytoplasmatische Proteintyrosinphosphatase (PTP) SHP-2 (SH2-containing PTP-2) bindet ebenfalls an den PDGF-Rezeptor und wird in Folge dessen tyrosinphosphoryliert (Vogel *et al.*, 1993). Obwohl tyrosinphosphoryliertes SHP-2 mit Grb2 interagieren kann (Stein-Gerlach *et al.*, 1995), hat die katalytische Aktivität von SHP-2, im Gegensatz zu anderen Tyrosinphosphatasen, bei der mitogenen Signalantwort noch eine wenig verstandene, positive Funktion (Bennett *et al.*, 1996).

Signalproteine mit SH2-Domänen des Typs II haben keine enzymatische Aktivität und fungieren als Adapterproteine, um Proteinkinasen miteinander zu verkoppeln.

Ein wichtiger Vertreter dieser Signalproteine, die bei der mitogenen Signalübertragung von Bedeutung sind, ist das Adapterprotein Grb2 (growth factor receptor binding protein 2) (Lowenstein *et al.*, 1992). Mit Hilfe seiner SH2-Domäne kann Grb2 mit autophosphorylierten RTKs, wie z.B. dem EGF Rezeptor oder dem PDGF Rezeptor, aber auch mit Phosphotyrosinen von anderen Adapterproteinen wie SHC und Gab1 interagieren. Über seine SH3-Motive bindet Grb2 den Guaninnukleotidaustauschfaktor Sos (son of sevenless), wodurch nach RTK-Aktivierung eine Translokation von Sos zur Zellmembran in die Nähe des kleinen G-Proteins Ras hervorgerufen wird (Rozakis-Adcock *et al.*, 1993; Holgado-Madruga *et al.*, 1996). Der von Sos katalysierte GTP/GDP-Austausch von Ras führt zu dessen Aktivierung und Einleitung der MAP Kinasekaskade, die eine zentrale Bedeutung in der Regulation der Zellproliferation hat (Downward, 1997). Wichtig für die hierbei erforderliche Membranlokalisation von Sos ist, neben der Prolin-reichen Grb2-Bindungsstelle, auch eine PH-Domäne im aminoterminalen Bereich.

Weitere wichtige Adapterproteine ohne katalytische Aktivität stellen die SHC-Proteine dar, von denen auf Proteinebene drei Isoformen mit Molekulargewichten von 46 kDa, 52 kDa und 66 kDa exprimiert werden. Alle SHC-Isoformen weisen eine carboxyterminale SH2-Domäne, einen zentralen Kollagen-homologen Bereich, sowie eine aminoternale PTB-Domäne auf (Pelicci *et al.*, 1992; Migliaccio *et al.*, 1997). Nach Aktivierung verschiedener RTKs binden SHC-Proteine mit Hilfe ihrer SH2- bzw. PTB-Domänen an Phosphotyrosine der RTKs und werden von diesen an mehreren Stellen tyrosinphosphoryliert (Bonfini *et al.*, 1996). Tyrosinphosphorylierte SHC-Proteine interagieren mit der SH2-Domäne des Adapterproteins Grb2. RTKs, welche keine Grb2-, dafür aber eine SHC-Bindungsstelle besitzen, können somit durch Rekrutierung eines SHC-Grb2-Komplexes die Aktivierung von Ras vermitteln (Rozakis-Adcock *et al.*, 1992).

Darüber hinaus wird nach Aktivierung des EGF Rezeptors das Multiadapterprotein Gab1 (Grb2 associated binder 1) an zahlreichen Tyrosinresten phosphoryliert. Dadurch werden neue Bindungsstellen für andere RTK-Substratproteine, wie z.B. Grb2, PI-3-Kinase oder SHP-2 geschaf-

fen, und der so entstandene Multiproteinkomplex scheint die Zellproliferation in positiver Weise zu regulieren. Gab1 verfügt außerdem über eine prolinreiche Domäne, die MBD (c-Met binding domain), mit welcher das Multiadapterprotein an die tyrosinphosphorylierte RTK c-Met binden kann (Holgado-Madruga *et al.*, 1996; Weidner *et al.*, 1996).

Die hier aufgeführten Substratproteine werden oftmals von unterschiedlichen RTKs gebunden und an Tyrosinresten phosphoryliert, allerdings variiert die Affinität dieser Interaktionen in Abhängigkeit des RTK-Typs beträchtlich (Obermeier *et al.*, 1996). Diese Tatsache, sowieso das Expressionsniveau der RTKs und ihren Substraten, die Lokalisation der beteiligten Moleküle und der Einfluss negativ-regulatorischer Elemente, wie z.B. PTPn, ermöglichen nach Bindung eines bestimmten RTK-Liganden die Aktivierung zellspezifischer intrazellulärer Programme und deren nachfolgende physiologische Prozesse.

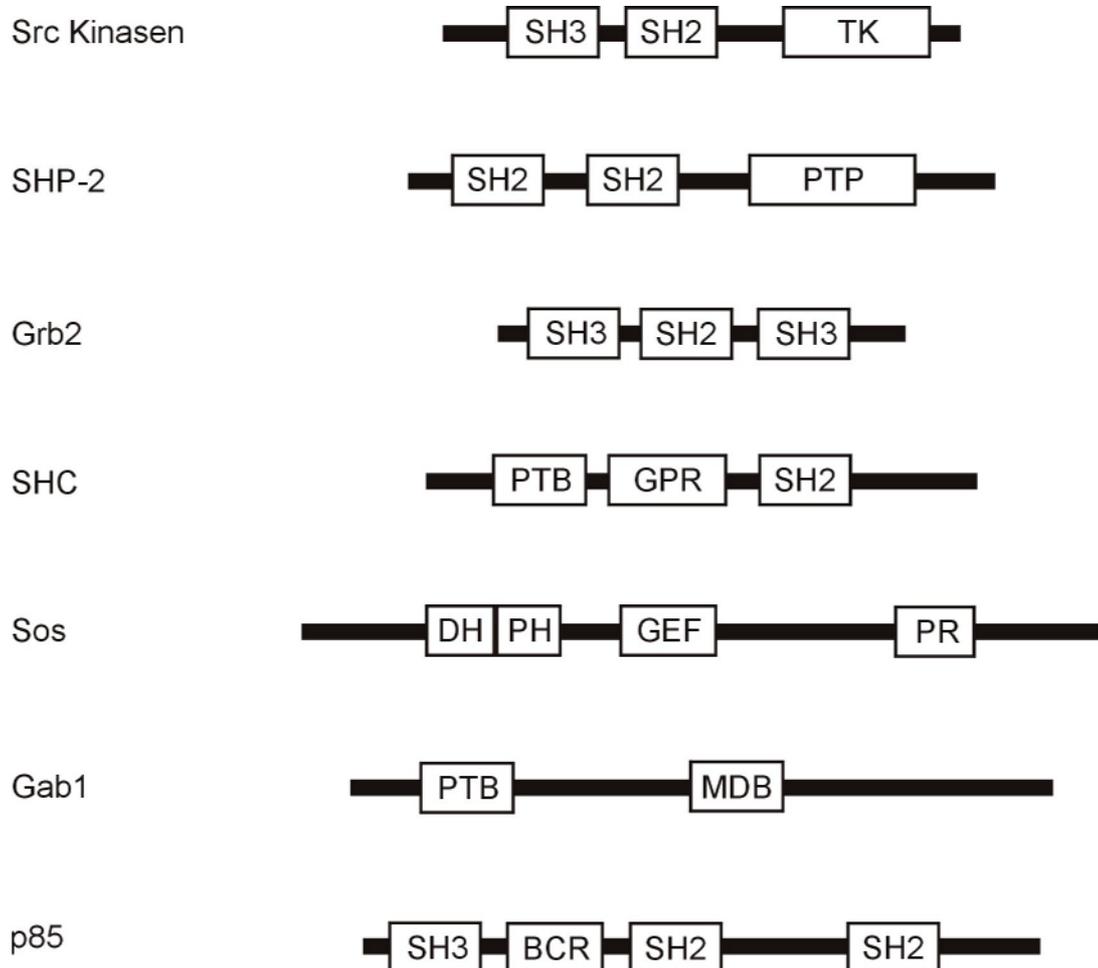


Abb. 1.5: Strukturmerkmale einiger Signalübertragungsproteine. Die verschiedenen Rechtecke repräsentieren konservierte funktionelle Domänen. Abk.: BCR: Domäne mit Homologie zum GEF Bcr; DH: Dbl-Homologie-Domäne; GEF: katalytische Domäne von Guaninnukleotidaustauschfaktoren; GPR: Glyzin/Prolinreiche Domäne; MDB: c-Met-bindende Domäne; PH: Pleckstrin-Homologie-Domäne; PR: Prolinreiche Domäne; PTB: Phosphotyrosinbindungs-Domäne; PTP: PTPase-Domäne; SH2: Src-Homologie-Domäne 2; SH3: Src-Homologie-Domäne 3; TK: Tyrosinkinase-Domäne (weitere Abkürzungen im Text).

1.2 Signalübertragung durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

Mit über 1000 verschiedenen Transmembranmolekülen bilden die G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRn) die größte Gruppe unter den Zelloberflächenrezeptoren, die in der Lage sind, auf verschiedene Neurotransmitter, Hormone, Duft- und Geschmacksstoffe, Photonen und Wachstumsfaktoren zu reagieren (Watson und Arkinstall, 1994; Gutkind, 1998).

Nahezu alle GPCRn weisen das gleiche strukturelle Grundprinzip auf, bei dem sieben Transmembranhelices abwechselnd durch intra- bzw. extrazelluläre Schleifen miteinander verbunden sind (Dohlman *et al.*, 1987).

Bei Aktivierung durchlaufen zwei der intrazellulären Schleifen eine Konformationsänderung, durch die eine Interaktion mit heterotrimären G-Proteinen ermöglicht wird, wie sie am Beispiel des Photorezeptors Rhodopsin als erstes gezeigt wurde (Farrens *et al.*, 1996; Bourne, 1997).

1.2.1 Heterotrimäre G-Proteine

Die heterotrimären G-Proteine gehören zu einer Familie von GTPasen, die sich aus α -, β -, und γ -Untereinheiten zusammensetzen. Während die α -Untereinheit GTP binden und hydrolysieren kann, bilden die β - und γ -Untereinheiten ein funktionelles Dimer (Bourne, 1997). Derzeit sind die Gene von 16 $G\alpha$ -Untereinheiten bekannt, die sich aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in vier Klassen einteilen lassen: $G\alpha_s$, $G\alpha_{i/z}$, $G\alpha_q$ und $G\alpha_{12/13}$ (Strathmann und Simon, 1991; Dhanasekaran *et al.*, 1998; Hurowitz *et al.*, 2000). Darüber hinaus wurden bisher 5 β - und 11 γ -Untereinheiten gefunden, die in bestimmten Kombinationen funktionelle Dimere bilden können (Schneider *et al.*, 1997; Hurowitz *et al.*, 2000).

In unstimulierten Zellen liegt die $G\alpha$ -Untereinheit an GDP gebunden und mit dem $\beta\gamma$ -Dimer assoziiert vor. Die Aktivierung eines Sieben-Transmembran-Rezeptors führt zu dessen Interaktion mit dem inaktiven G-Protein und katalysiert den GDP/GTP-Austausch in der $G\alpha$ -Untereinheit. In Folge dieser Aktivierung löst sich $G\alpha$ vom Rezeptor und der $\beta\gamma$ -Untereinheit, woraufhin sowohl $G\alpha$ -GTP als auch $G\beta\gamma$ mit ihren zellulären Effektoren wechselwirken können (Conklin und Bourne, 1993; van Biesen *et al.*, 1996; Gutkind, 1998). Aufgrund von aminoterminalen Lipid-Ankern der $G\alpha$ - und $G\gamma$ -Untereinheiten verbleiben $G\alpha$ -GTP und $G\beta\gamma$ nach der Aktivierung überwiegend an der Plasmamembran (Wedegaertner *et al.*, 1993). Erst nach der GTP-Hydrolyse, welche durch die $G\alpha$ -Untereinheit katalysiert wird, reassoziieren $G\alpha$ und $G\beta\gamma$ zum inaktiven heterotrimären G-Protein (Hepler und Gilman, 1992).

| Unterfamilie | G α | Effektormolekül | PTX-Sensitivität | Vorkommen |
|--------------|--|--|--|--|
| s | α_s α_{olf} | AC-Aktivierung AC-Aktivierung | | ubiquitär Geruchszellen |
| i/o/t | $\alpha_{i1}, \alpha_{i2}, \alpha_{i3}$ α_o α_z α_{t1}, α_{t2} α_{gust} | AC-Inhibition Inaktivierung von Ca ²⁺ -Kanälen AC-Inhibition Aktivierung der cGMP-PDE PDE-Aktivierung | sensitiv sensitiv sensitiv sensitiv | ubiquitär Gehirn Gehirn Retina Geschmacksknospen |
| q | $\alpha_q, \alpha_{11}, \alpha_{14}, \alpha_{15}, \alpha_{16}$ | PLC β -Aktivierung | | ubiquitär |
| 12/13 | α_{12}, α_{13} | Ausbildung von Fokalkontakten | | ubiquitär |

Tabelle 1.1: Die Familie der G α -Untereinheiten in Säugern. Abk.: AC: Adenylatzyklase; cGMP: zyklisches Guaninmonophosphat; PDE: Phosphodiesterase; PLC: Phospholipase C; PTX: Pertussistoxin.

1.2.2 Effektormoleküle von heterotrimären G-Proteinen und ihre Signalwirkung

Die Aktivierung heterotrimärer G-Proteine führt zu vielfältigen intrazellulären Signalantworten, welche durch Interaktion der G α - und G $\beta\gamma$ -Untereinheiten mit Effektormolekülen, wie z.B. Adenylatzyklasen, Phosphodiesterasen, Phospholipasen, Ionenkanälen und Kinasen zustande kommen (Conklin und Bourne, 1993; van Biesen *et al.*, 1996; Gutkind, 1998).

Ein wichtiger zellulärer Botenstoff, der von vielen Hormonen wie Glukagon und Adrenalin als Mediator von zellulären Signalantworten benutzt wird, ist cAMP (zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat). Die Regulation der zellulären cAMP-Konzentration kann durch G α_s und G α_i -Proteine erfolgen und wird z.B. durch den G $_s$ -gekoppelten β -adrenergen Rezeptor vermittelt. Die stimulierte G α_s -Untereinheit interagiert mit den Adenylatzyklasen und induziert die Synthese von cAMP, wodurch cAMP-aktivierte Proteinkinasen stimuliert werden (Levitzki, 1988). Diese G α_s -induzierte cAMP-Synthese kann durch Aktivierung der α -Untereinheit der G $_i$ - und G $_z$ -Proteine inhibiert werden (Wong *et al.*, 1991; Wong *et al.*, 1992). Während sich der negativ regulatorische Effekt von G α_i nur auf bestimmte Adenylatzyklasen beschränkt (Taussig *et al.*, 1993), werden durch G α_s in Säugerzellen alle sechs verschiedenen Adenylatzyklasen (Typ I-VI) stimuliert (Tang und Gilman, 1992).

Die Phosphoinositidkaskade ist ein weiterer intrazellulärer Signalweg, der durch Aktivierung von GPCRn induziert wird und eine Vielzahl von Hormon- und Neurotransmitter-stimulierten Signalantworten auslöst. Bei dieser Kaskade wird Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) hydrolytisch zu den wichtigen sekundären Botenstoffen Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP₃) und 1,2-Diazylglyzerin (DAG) abgebaut (Berridge und Irvine, 1989; Berridge, 1993). Die Spaltung von PIP₂ wird von verschiedenen Phosphoinositid-Phospholipasen C (PLC Typ β , γ , δ) katalysiert (Cockcroft und Thomas, 1992), wobei die Isoenzyme der PLC β direkt sowohl durch G α -Untereinheiten der G_q-Klasse (Smrcka *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1993) als auch durch G $\beta\gamma$ -Untereinheiten der Pertussistoxin-sensitiven G_i-Klasse (Katz *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1993) reguliert werden. Im Gegensatz zu den GPCRn koppeln RTKs über PLC γ an den IP₃/DAG-Signalweg (van der Geer *et al.*, 1994).

Weiterhin haben GPCRn eine große Bedeutung bei der Regulation und Modulation von zahlreichen Ionenkanälen, welche die Membrandurchlässigkeit für K⁺-, Na⁺-, Ca²⁺- und Cl⁻-Ionen kontrollieren (Jan und Jan, 1997). Daneben werden auch zytoskelettale Veränderungen durch Aktin-stressfaserbildung und damit einhergehende Ausbildung von Fokalkontakten durch Stimulation der heterotrimären G-Proteine G₁₂ und G₁₃ über deren α -Untereinheiten vermittelt (Buhl *et al.*, 1995).

In den letzten Jahren wurden viele Liganden von GPCRn aller Klassen mit einer Zunahme des Zellwachstums, meist durch Aktivierung der ERK/MAP Kinasekaskade (Dhanasekaran *et al.*, 1998; Gutkind, 1998), aber auch mit Tumorentstehung oder -wachstum in Verbindung gebracht. Thrombin und Lysophosphatidylsäure (LPA) induzieren z.B. die Proliferation von Fibroblasten und anderen Zelllinien (LaMorte *et al.*, 1993; Dhanasekaran *et al.*, 1998); außerdem wirkt LPA in vielen Ovarialkarzinomzelllinien als starkes Mitogen, während Neuropeptide wie Bombesin und Bradykinin die Zellproliferation bei kleinzelligem Lungenkrebs anregen (Sethi *et al.*, 1992; Xu *et al.*, 1995). Bestimmte aktivierende Mutationen in GPCRn, wie beim α 1B-adrenergen Rezeptor, induzieren bereits in Abwesenheit des entsprechenden Liganden unkontrolliertes Wachstum (Allen *et al.*, 1991; Gutkind *et al.*, 1991), ebenso verfügen die meisten konstitutiv aktiven G α -Untereinheiten, besonders G α ₁₂ und G α ₁₃, über ein gewisses onkogenes Potential (Lyons *et al.*, 1990).

1.3 Signalvermittlung durch Serin-/Threoninkinasen

Wie bereits erwähnt, stellt die Tyrosinphosphorylierung in der Zelle einen wichtigen, aber doch nur kleinen Anteil der Gesamtphosphorylierung dar. Die weitaus größere Anzahl an reversiblen Phosphorylierungen wird durch eine weitere große Familie der Proteinkinasen, den Serin/Threoninkinasen katalysiert. Genau wie bei den Tyrosinkinasen sind auch hier als regulatorische Gegenspieler spezifische Proteinphosphatasen erforderlich.

In nachstehenden Abschnitten werden die zwei wichtigsten intrazellulären Signalwege, sowie die jeweilig involvierte Familie der Serin/Threoninkinasen vorgestellt.

1.3.1 MAP Kinasekaskaden und die Regulation der Genexpression

Nach der Stimulation von RTK_n spielt die Grb2/Sos-vermittelte Aktivierung von Ras eine zentrale Rolle in der mitogenen Signalantwort (Downward, 1997). Membranassoziiertes und aktiviertes Ras führt zur Interaktion mit der Serin-/Threoninkinase Raf-1 und somit zur Translokation von Raf-1 zur Plasmamembran, wodurch Raf-1 phosphoryliert und aktiviert wird (Morrison und Cutler, 1997; Barnard *et al.*, 1998). Anschließend werden die Threonin/Tyrosinkinasen MEK1 und MEK2 (MAPK/ERK Kinasen) durch aktiviertes Raf-1 an bestimmten Serinresten phosphoryliert, wodurch diese aktiviert werden und nachfolgend die MAP Kinasen (mitogen activated protein kinase) ERK1 und ERK2 (extracellular regulated kinase) durch Modifikation des regulatorisch wichtigen TEY-Motivs aktivieren (Robinson und Cobb, 1997).

Parallel zur ERK/MAP Kinasekaskade gibt es in höheren eukaryontischen Systemen noch andere MAP Kinasekaskaden, die je nach Stimulus die Signalübertragung in den Zellkern übernehmen. Es handelt sich dabei um die zu den ERK1 und ERK2 homologen Kinasen JNK1 und JNK2 (c-Jun N-terminale Kinase 1 und 2), und die nach ihrer scheinbaren Molekülmasse bezeichneten p38-Kinasen (Dhanasekaran und Premkumar Reddy, 1998). Während ERK1/2 in der Regel nach Stimulation mit Liganden für RTK_n oder GPCR_n aktiviert werden, wird die Aktivität von JNK1/2 und p38-Kinasen durch zellulären Stress in Form von UV-Bestrahlung, osmotischem Schock oder proteininflammatorischen Zytokinen, aber kaum durch Wachstumsfaktoren induziert (Derijard *et al.*, 1994; Su und Karin, 1996).

Einmal aktiviert, wandern die ERK- und JNK-MAP Kinasen in den Zellkern, wo sie die Transkription von *c-Jun* und *c-fos* regulieren, indem sie bestimmte Transkriptionsfaktoren (TF_n) durch Serin-/Threoninphosphorylierung modifizieren (Treisman, 1996; Robinson und Cobb, 1997).

Aktiviert JNKs assoziieren mit dem TF c-Jun und phosphorylieren diesen im aminoterminalen Bereich an zwei Serinresten (Hibi *et al.*, 1993). Dadurch kann c-Jun mit dem TF ATF2, welcher ebenfalls von den JNKs phosphoryliert wird, einen weiteren heterodimeren AP1-Komplex eingehen. Dieser bindet daraufhin an ein Promotorelement des *c-Jun*-Gens und verstärkt dessen Transkription (Su und Karin, 1996).

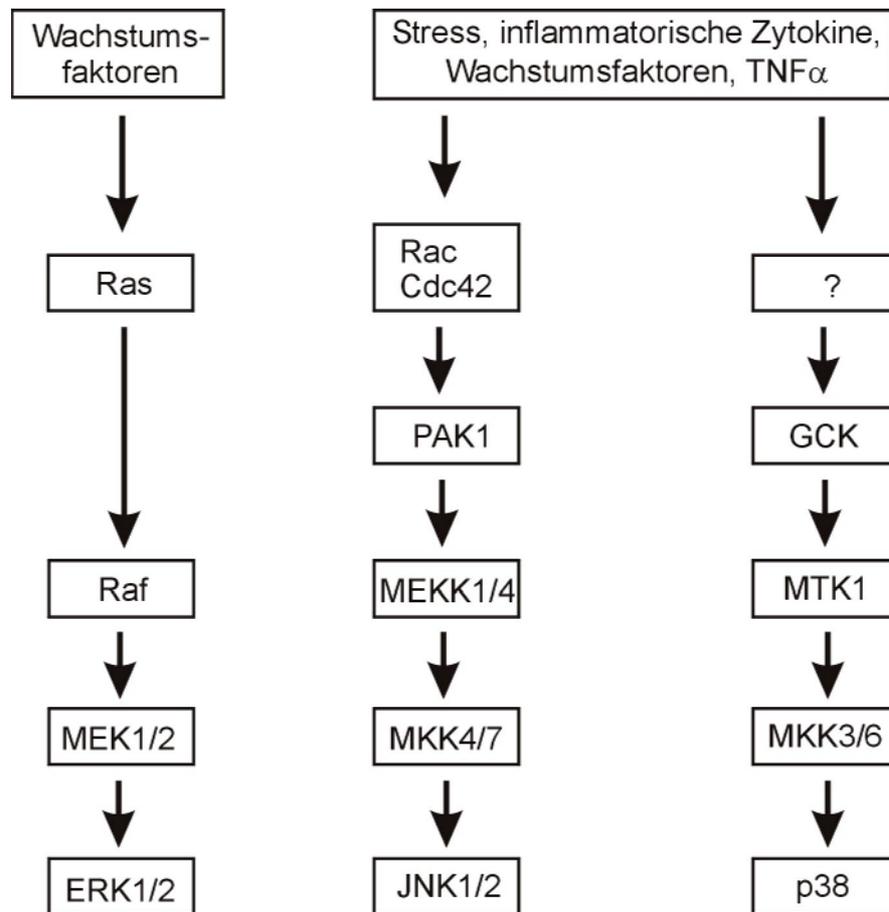


Abb. 1.6: Die verschiedenen MAP Kinase-Signalwege. Schematische Darstellung der MAP Kinasekaskaden, die zur Aktivierung der MAP Kinasen ERK1/2 und JNK1/2 führen; sie sind derzeit am besten charakterisiert. Die Kinasen, die p38-Aktivität induzieren, sind nur zum Teil identifiziert (modifiziert nach Dhanasekaran und Premkumar Reddy, 1998).

Wesentlich komplexer wird der *c-fos*-Promotor reguliert (Abb. 1.7). Hierfür sind drei für seine Aktivität wichtige Promotorelemente von besonderer Bedeutung. Das SRE (serum response element) bindet den TF SRF (serum response faktor), der wiederum die Anlagerung des TF's Elk-1 fördert. Zusammen bilden sie bereits im Ruhezustand einen ternären Komplex (TCF, ternary complex formation) aus DNA, SRF und Elk-1. Elk-1 kann sowohl durch ERKs als auch durch JNKs phosphoryliert und aktiviert werden und so die Transkription des *c-fos*-Gens in

Gang setzen. Alternativ dazu können die kleinen G-Proteine RhoA, Rac1 und Cdc42 die Transkription direkt über SRF initiieren (Hill *et al.*, 1995; Karin *et al.*, 1997).

Darüber hinaus kann der *c-fos*-Promotor durch Ca^{2+} und cAMP über das CRE (cAMP responsive element), sowie durch Bindung mit STAT (signal transducers and activators of transcription)-TFn an das SIE (sis-inducible element) aktiviert werden (Hill und Treisman, 1995; Su und Karin, 1996).

Die Transkription der *immediate early* Gene *c-fos* und *c-Jun* führt schließlich zur Expression der TFn c-Fos und c-Jun. Sie bilden einen heterodimeren Komplex, welcher zur der AP-1 (activating protein-1)-Familie der TFn gehört und an der Regulation der Transkription zahlreicher Proteine beteiligt ist (Lengyel *et al.*, 1995; Karin *et al.*, 1997).

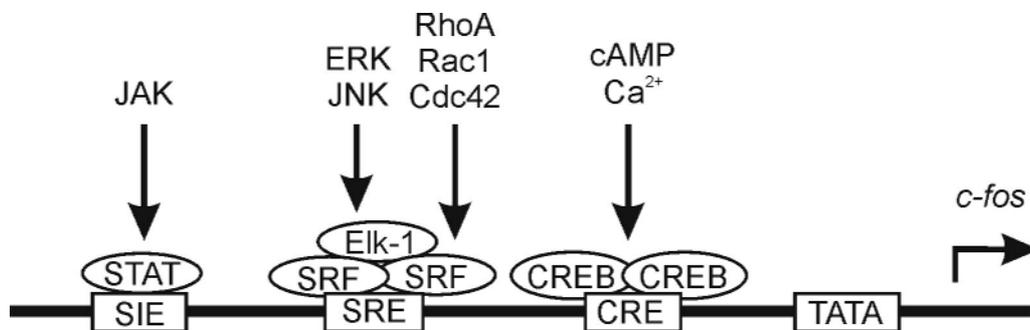


Abb. 1.7: Die komplexe Regulation des *c-fos*-Promotors. Der *c-fos*-Promotor wird von verschiedenen Signalwegen reguliert. Abk.: CREB: CRE-bindendes Protein; JAK: Janus Kinase; weitere Abkürzungen im Text. Rechteck: DNA-Element; Kreis: TF (modifiziert nach Su und Karin, 1996).

1.3.2 Die Phosphoinositidkaskade und die Proteinkinase C (PKC) Familie

Ebenfalls eine zentrale Funktion bei der Signalvermittlung in Zellen nimmt die Phosphoinositidkaskade ein, welche sowohl durch RTK_n über PLC γ als auch durch GPCR_n über PLC β eingeleitet werden kann.

Beide Enzyme katalysieren die hydrolytische Spaltung von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂), wobei die sekundären Botenstoffe Diazylglyzerin (DAG) und Inositol-1,4,5-triphosphat (IP₃) freigesetzt werden (Nishizuka, 1992).

Das lösliche IP₃ setzt Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) ins Zytosol frei (Berridge und Irvine, 1989; Berridge, 1993), wo es in der Regel durch den intrazellulären Ca^{2+} -Rezeptor Calmodulin gebunden wird (O'Neil und DeGrado, 1990). Dieser Komplex bindet an Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige (CaM) Serin/Threoninkinasen, welche die meisten Ca^{2+} -induzierten Effekte in Zellen vermitteln (Gerday *et al.*, 1988).

Ca^{2+} bindet darüber hinaus direkt an eine weitere Klasse der Serin/Threoninkinasen, welche außerdem das Hauptsubstrat für DAG darstellen. Es handelt sich hierbei um die Familie der Proteinkinase C (PKC). In Säugerzellen besteht sie aus bislang 12 Isoformen, die sich in Struktur, enzymatischer Aktivität, zellulärer Lokalisation, Gewebeexpression und Substratspezifität unterscheiden (Nishizuka, 1992; Hug und Sarre, 1993; Newton, 1995). Auf natürlichem Wege werden klassische PKCs, wie bereits erwähnt, durch Ca^{2+} und DAG aktiviert (Asaoka *et al.*, 1992), jedoch auch durch Arachidonsäure oder Phosphatidylserin (Asaoka *et al.*, 1992; Nishizuka, 1992). Die Tatsache, dass sich die Aktivierung durch DAG mit Tumorpromotoren wie Phorbol-12-myristat-13-azetat (PMA) substituieren lässt, deutet auf eine Rolle der PKCs bei der Krebsentstehung hin.

Aufgrund ihrer strukturbedingten unterschiedlichen Arten der Aktivierung werden die PKCs in drei Gruppen unterteilt:

1. Die klassischen oder auch konventionellen PKCs (cPKCs: α , $\beta 1$, $\beta 2$ und γ) besitzen neben der katalytischen C3-Domäne eine C1-Domäne, die eine Pseudosubstratstelle und zwei benachbarte cysteinreiche Zinkfinger-Regionen aufweist und verantwortlich für die Bindung von DAG und Phorbolestern ist. Die C2-Domäne vermittelt die Aktivierung durch Ca^{2+} .
2. Den neuen oder *novel* PKCs (nPKCs: δ , ϵ , η und θ) fehlt diese Domäne, somit sind sie Ca^{2+} -unabhängig.
3. Die atypischen PKCs (aPKCs: ζ , ι und λ) besitzen ebenfalls keine C2-Domäne und weisen nur eine der zwei cysteinreichen Domänen auf. Somit verlieren sie zusätzlich die Fähigkeit, DAG oder Phorbolester zu binden, jedoch lassen sie sich z.B. durch eine Kombination von PI-3,4,5-P_3 , Phosphatidylserin und Phosphatidylethanolamin stimulieren (Nakanishi *et al.*, 1993).

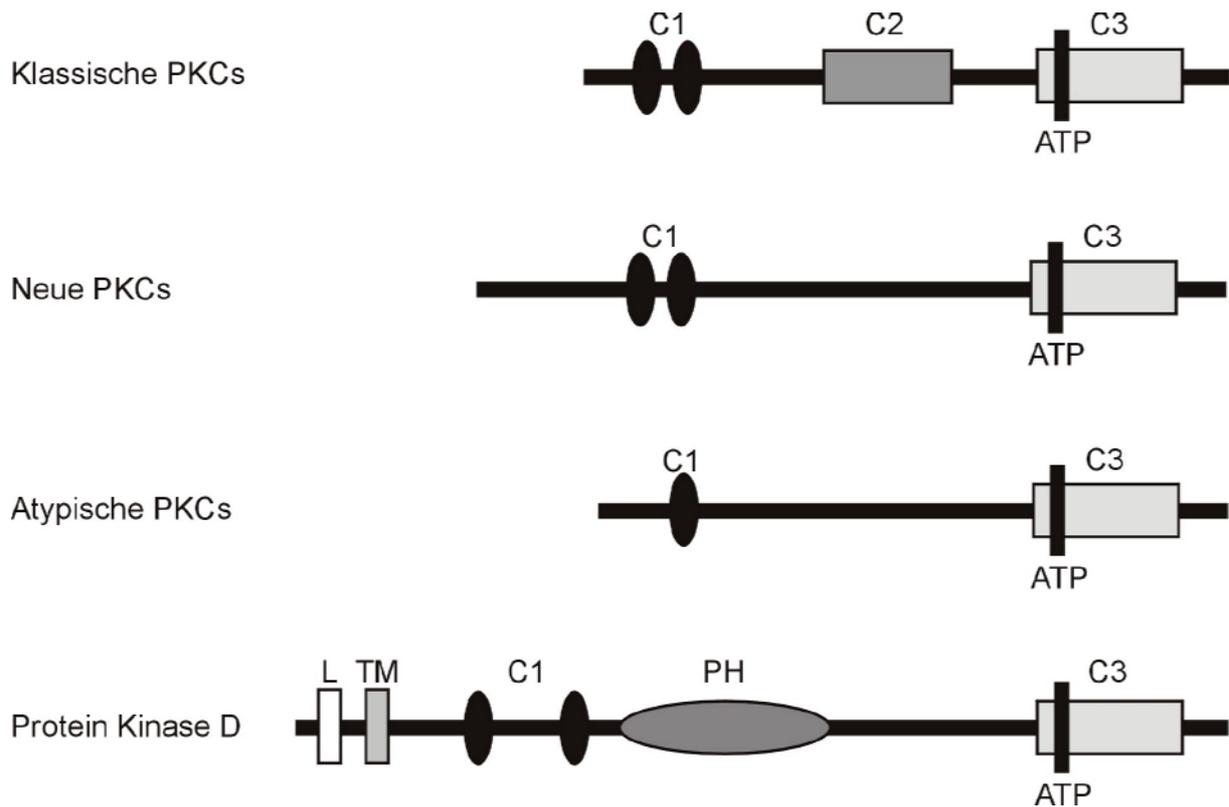


Abb. 1.8: Die Proteinkinase C Familie und ihre Strukturmerkmale. Proteinkinase D ist nur entfernt mit dieser Familie verwandt. Abk.: C1: Cysteinreiche Regionen; C2: Ca²⁺-bindende Domäne; C3: Kinasedomäne mit ATP-Konsensus; PH: Pleckstrin-Homologie-Domäne; L: Leitsequenz; TM: Mutmaßliche Transmembranregion.

In der intrazellulären Signalübermittlung übernehmen die PKCs eine sehr wichtige Rolle, indem sie eine Vielzahl von zellulären Substraten wie z.B. Wachstumsfaktorrezeptoren, Ionenkanäle und -pumpen, Transkriptions- und Translationsfaktoren an Serin- und Threoninresten reversibel phosphorylieren (Pearson und Kemp, 1991; Hug und Sarre, 1993) und so den Anstieg der Transkription spezifischer Gene bewirken. Dies geschieht z.B. durch ihre Verbindung zur MAP Kinasekaskade, indem sie die jeweilige MAP Kinase direkt phosphorylieren (Hunter und Karin, 1992). Außerdem modifizieren sie das inhibitorische Protein I κ -B, wodurch der Transkriptionsfaktor NF- κ B freigesetzt wird und in den Zellkern einwandert (Hunter und Karin, 1992; Liou und Baltimore, 1993).

Ein weiteres Substrat der PKCs ist die Proteinkinase D, deren Signalvermittlung im Mittelpunkt dieser Arbeit steht.

1.3.3 Proteinkinase D

Die humane Serin-/Threoninkinase Proteinkinase D wurde anfangs als PKC μ klassifiziert (Johannes *et al.*, 1994), obwohl sie, wie ihr Maus-Homolog (Valverde *et al.*, 1994) lediglich entfernt mit der PKC Familie verwandt ist und zusammen mit den kürzlich charakterisierten Isoformen PKC ν (Hayashi *et al.*, 1999) und PKD2 (Sturany *et al.*, 2001) eine eigene Familie bildet. So besitzt PKD zwei cysteinreiche Motive, jedoch mit größerem Abstand zueinander als die der PKCs, die Homologie zur regulatorischen Domäne der klassischen und neuen PKCs aufweisen und Phorbolster und DAG binden können (Johannes *et al.*, 1995; Van Lint *et al.*, 1995). Hierbei wurde festgestellt, dass das Cys2-Motiv, im Gegensatz zum Cys1-Motiv, den Großteil an Phorbolestern bindet (Iglesias *et al.*, 1998).

Hingegen weist PKD neben einem, im Vergleich zu den PKCs, höheren Molekulargewicht zusätzlich eine Transmembranregion, ein Membranlokalisierungssignal und eine PH-Domäne auf, Merkmale, die auf Assoziation mit membranständigen Strukturen hinweisen. Tatsächlich wird PKD nach Zellaufschluss vorwiegend in der Membranfraktion gefunden (Johannes *et al.*, 1995; Van Lint *et al.*, 1995). Die katalytische Domäne von PKD ist entfernt verwandt mit Ca²⁺-abhängigen Kinasen und zeigt sehr wenig Homologie zur hochkonservierten Kinasedomäne der PKCs (Valverde *et al.*, 1994), eine Sequenz mit Homologie zum Pseudosubstrat-Motiv der PKCs vor der cysteinreichen Region existiert überhaupt nicht (Van Lint *et al.*, 1995). Jedes Mitglied der PKC-Familie hat seine individuelle Substratspezifität, doch weisen sie eine große Anzahl gemeinsamer Substrate auf, wie z.B. MBP (myelin basic protein), Histon IIS und Protamin (Nishikawa *et al.*, 1997). PKD jedoch teilt ihre Affinität zu basischen Resten nicht und bevorzugt Substrate wie das GS (glycogen synthase-derived)-Peptid oder Synthide 2, und phosphoryliert sie ausschließlich an Serinresten in nicht-basischer Umgebung (Dieterich *et al.*, 1996; Nishikawa *et al.*, 1997).

1.3.3.1 Aktivierung und Regulation von PKD

Von PKD selbst sind bis jetzt auch lediglich Serinreste als Phosphorylierungsstellen bekannt, deren Charakter jedoch noch diskutiert wird. So wurden Serin 744 und Serin 748 der Maus-PKD als kritische Reste in der Aktivierungsschleife von PKD entdeckt, die durch PKCs transphosphoryliert werden und so die Aktivierung von PKD vermitteln (Iglesias *et al.*, 1998; Waldron *et al.*, 1999; Waldron *et al.*, 2001). Serin 916 dagegen wird als Folge der PKD-Aktivierung autophosphoryliert (Matthews *et al.*, 1999). Andere Experimente wiederum ermittelten vier Au-

tophosphorylierungsstellen, unter ihnen die Serine 744 und 748 der Aktivierungsschleife, denen jegliche Beteiligung bei *in vivo* Vorgängen abgesprochen wird, und einen Serinrest an Position 255, der durch PKCs transphosphoryliert wird und kritisch für die PKD-Aktivierung ist (Vertommen *et al.*, 2000).

PKD wird durch eine Vielzahl von Agenzien und Rezeptortypen über eine stets PKC-abhängige Signalübertragung aktiviert. Dies konnte *in vivo* mit DAG und Phorbolestern gezeigt werden, außerdem wurden in Experimenten mit diversen, konstitutiv aktiven nPKC-Mutanten PKC ϵ und PKC η , sowie PKC θ als mögliche Kandidaten für diese Aktivierung identifiziert (Zugaza *et al.*, 1996; Yuan *et al.*, 2002), darüber hinaus wurde die Assoziation von PKC η mit der PH-Domäne von PKD nachgewiesen (Waldron *et al.*, 1999). Weiterhin wird PKD auch direkt durch Phorbol-ester oder DAG stimuliert, die gleichzeitig PKCs aktivieren, woraus sich ein dualer Aktivierungsmechanismus für PKD ergibt, der sich verstärkend auf ihre Aktivierung auswirkt (Rozengurt *et al.*, 1997).

Neben der Induzierung der PKD-Aktivität durch Phorbol-ester und durch das natürliche makrozyklische Lakton Bryostatin-1 (Matthews *et al.*, 1997) wurden viele Membranrezeptor-vermittelte PKC-abhängige Aktivierungsmechanismen für PKD gefunden.

Zum Beispiel wurde neben der PKD-Aktivierung durch Antigenrezeptoren (Matthews *et al.*, 2000) gezeigt, dass der Wachstumsfaktor PDGF PKD über die Aktivierung der Phospholipase C γ und über PKCs stimuliert (Van Lint *et al.*, 1998).

Die GPCRn sind eine weitere Klasse von Membranrezeptoren, die PKD aktivieren. So können Liganden wie Bombesin, Vasopressin, Endothelin und Bradykinin, aber auch Gastrin und CCK-8 (cholestocystokinin octapeptide), sowie Norepinephrin, deren Rezeptoren G α_q -Protein-vermittelte PLC β -Aktivierung bewirken, PKD aktivieren (Zugaza *et al.*, 1997; Haworth *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 2000; Chiu und Rozengurt, 2001). Daneben aktiviert Lysophosphatidylsäure (LPA), die mannigfaltige Signale über verschiedene G-Proteine vermittelt, PKD zusätzlich über einen G $_i$ -abhängigen Signalweg (Paolucci *et al.*, 2000; Chiu und Rozengurt, 2001). Des Weiteren wurde gezeigt, dass Bombesin-induzierte Aktivierung der G α_q - und G α_{13} -Untereinheiten, über Vermittlung durch das kleine G-Protein Rho, zur PKD-Aktivierung führt (Yuan *et al.*, 2001).

Neben der Aktivierung von PKD durch Liganden ist auch die Induzierung durch oxidativen Stress möglich, der PKD in Form von H $_2$ O $_2$ über verschiedene Src-abhängige, sowie Src-unabhängige Signalwege stimuliert (Waldron und Rozengurt, 2000).

Außer den Aktivatoren von PKD wurden eine Reihe PKD-regulierende Faktoren gefunden. So kommt neben zahlreichen Inhibitoren (Johannes *et al.*, 1995; Gschwendt *et al.*, 1996), wie z.B.

Resveratrol (Haworth und Avkiran, 2001) der eigenen cysteinreichen Region und der PH-Domäne eine negativ-regulierende Funktion zu (Iglesias und Rozengurt, 1998; Iglesias und Rozengurt, 1999). In einem Modell wird die Blockade der sauren C1-Region von PKD durch basische Peptide, Proteine oder intramolekular durch eine basische Domäne beschrieben, die durch 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA) in Gegenwart von Phosphatidylserin (PS) oder Heparin wieder aufgehoben werden kann (Gschwendt *et al.*, 1997). Auch die 14-3-3-Proteine, die mit Ras und Cbl interagieren, binden direkt an die C1-Region von PKD und bewirken eine Negativregulation von PKD *in vitro* (Hausser *et al.*, 1999). Das multifunktionelle Chaperon-Protein p32, das auch andere PKCs bindet, hingegen ist mit PKD konstitutiv an mitochondrialen Membranen assoziiert und blockiert sterisch ihre Kinasedomäne (Storz *et al.*, 2000).

1.3.3.2 Substratproteine und Signalwege von PKD

In letzter Zeit wurde die Wichtigkeit von PKD in vielen Signalwegen und biologischen Antworten gefunden. So wurde Kidins220 (kinase D-interacting substrate of 220 kDa), ein integrales Membranprotein, das im Gehirn und neuroendokrinen Zellen exprimiert wird, als das erste physiologische Substrat für PKD entdeckt (Iglesias *et al.*, 2000). Ein weiteres Substrat stellt das Ras-Effektorprotein Rin-1 dar, das, von PKD phosphoryliert, zum Zielprotein für 14-3-3-Proteine wird und so zur Zelltransformation beiträgt (Wang *et al.*, 2002). Weitere Beispiele, in denen PKD Zellproliferation vermittelt, sind bekannt, wie z.B. in NIH 3T3-Fibroblasten oder in Maus-Karzinomen (Rennecke *et al.*, 1999). Ebenso potenziert PKD die DNA-Synthese und das Zellwachstum Phorbolster- oder G-Protein-vermittelt in Swiss 3T3 Zellen (Zhukova *et al.*, 2001). Kürzlich konnte in Übereinstimmung damit die direkte Aktivierung der MAP Kinasekaskade durch PKD und die damit verbundene SRE-vermittelte Genexpression durch den ternären Elk-1-Komplex gezeigt werden (Hausser *et al.*, 2001). Auch wurde ein positiver Effekt auf die NF- κ B-abhängige Genexpression festgestellt, welche Zellen weniger anfällig für die Tumornekrose-Faktor (TNF)-vermittelte Apoptose macht (Johannes *et al.*, 1998). Weitere Verbindungen zur Krebsentstehung finden sich bei der PKC-abhängigen Aktivierung von PKD durch Phorbolster im kleinzelligen Lungenkrebs (Paolucci und Rozengurt, 1999), der Involvierung von PKD in einen Invadopodia-Komplex während der Zellinvasion (Bowden *et al.*, 1999), sowie bei der β_1 -Integrin-vermittelten Adhäsion von Brustkrebszellen an Typ IV-Kollagen, was zur Metastasierung der Zellen führt. Hierbei wird β_1 -Integrin durch PKC ϵ und PKD aktiviert, welche durch mehrfach-*cis*-ungesättigte Fettsäuren (wie z.B. Arachidonsäure oder Linolsäure) stimuliert wurden (Palmantier *et al.*, 2001).

Auf der anderen Seite scheint PKD ebenso in apoptotische Antworten verwickelt zu sein. So wurde in Glioblastoma-Zellen gezeigt, dass die Apoptose-vermittelnde Caspase-3 PKD spaltet, wobei deren Kinasedomäne freigesetzt und aktiviert wird, was eine erhöhte Sensitivität von Zellen gegenüber antikanzerogenen Agenzien zur Folge hat (Haussermann *et al.*, 1999; Endo *et al.*, 2000). Ebenso können Glukokortikoide in unselektionierten Thymozyten eine Translokation von cPKCs, nPKCs und PKD zur Plasmamembran auslösen und eine PKC θ -abhängige Apoptose auslösen (Asada *et al.*, 1998), welche als Aktivator von PKD deren Teilnahme nahelegt.

Auch eine Reihe anderer Beispiele von PKD-Signalen in immunologischen Prozessen ist bekannt. So assoziiert PKD mit dem B-Zellrezeptorkomplex (BCR) und bindet PLC γ und die zytosolische Tyrosinkinase Syk. Nach PLC γ -Aktivierung von PKD durch BCR-induziertes Syk inhibiert sie die Syk-vermittelte Phosphorylierung von PLC γ , wodurch PKD eine negativ-regulierende Rückkopplungs-Funktion auf den BCR zugeschrieben wird (Sidorenko *et al.*, 1996). Das Mitglied einer weiteren Tyrosinkinase-Familie, die Tec-Kinase Bruton's Tyrosinkinase (Btk), die eine Rolle in der B-Zellentwicklung und -aktivierung, sowie in der Fc ϵ -Rezeptor-I-vermittelten Mastzellendegranulation spielt, ist mit ihrer PH-Domäne konstitutiv an die C1- und die C3-Region von PKD gebunden (Johannes *et al.*, 1999). Eine andere Verbindung des Fc ϵ -Rezeptors zu PKD wurde bei ihrer Involvierung bei der durch ihn vermittelten Aktivierung der NADPH-Oxidase in neutrophilen Zellen gezeigt (Davidson-Moncada *et al.*, 2002).

Weitere negativ-regulatorische Funktionen von PKD zeigen sich in ihrem Einfluss auf die Aktivität des Na⁺-/H⁺-Austauschers (Haworth *et al.*, 1999) oder der Inhibition der Glukagon-stimulierten cAMP-Produktion in Cos7-Zellen (Tobias *et al.*, 1997). In Makrophagen hingegen bewirkt PKD von letzterem das genaue Gegenteil (Lin und Chen, 1998).

Außerdem inhibiert PKD durch Transmodulation des EGF Rezeptors an zwei Threoninresten den JNK-Signalweg (Bagowski *et al.*, 1999), indem die EGF-induzierte c-Jun-Phosphorylierung an Serin 63 unterdrückt wird (Hurd und Rozengurt, 2001). Diese Inhibition wird im Komplex mit PKC η vermittelt, welcher die gleichzeitige Aktivierung der MAP Kinase ERK auslöst (Brändlin *et al.*, 2002).

Die bereits oben erwähnte Assoziation mit verschiedenen intrazellulären Kompartimenten spielt ebenfalls eine wichtige Rolle bei der Signalvermittlung von PKD. Neben der Lokalisierung von PKD an der Mitochondrienmembran (Storz *et al.*, 2000) und G-Protein-vermittelt im Zellkern (Rey *et al.*, 2001) wurde Translokation von PKD zur Plasmamembran durch Phorbol-12,13-dibutyrate (PDB)-Stimulation (Matthews *et al.*, 1999), Antigenrezeptor-Aktivierung (Matthews *et*

al., 2000) und Bombesin-vermittelte GPCR-Aktivierung (Rey *et al.*, 2001) gezeigt. Dort assoziiert PKD mit den Lipidkinasen Phosphatidylinositol-4-Kinase (PI-4-Kinase) Typ II und Phosphatidylinositol-4-phosphat-5-Kinase (PI-4-P-5-Kinase) Typ I, was eine Funktion für PKD in der Anordnung spezifischer Phosphatidylinositol-phosphorylierender Enzyme impliziert (Nishikawa *et al.*, 1998).

Am meisten wird jedoch über die Lokalisation von PKD am Golgi-Apparat berichtet, welche durch die G $\beta\gamma$ -Einheit von G-Proteinen oder durch DAG vermittelt wird (Jamora *et al.*, 1999; Baron und Malhotra, 2002). Nach der Bindung von PKD an das *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN), für die die Cys1-Domäne der cysteinreichen Region und die Phosphorylierung der Serine in der Aktivierungsschleife unerlässlich sind (Maeda *et al.*, 2001; Rey und Rozengurt, 2001; Hausser *et al.*, 2002), reguliert sie dort die Abschnürung von Vesikeln, die speziell für den Transport von Proteinen zur Zelloberfläche bestimmt sind (Liljedahl *et al.*, 2001; Baron und Malhotra, 2002). Unklar bleibt, wie PKD die Abschnürung der Vesikel vermittelt. Zur Diskussion stehen zwei Signalwege über Phospholipase D (PLD) oder Sphingomyelin (SM)-Synthase, von denen bekannt ist, dass sie bei der Abschnürung von Vesikeln mitwirken, und die beide zur Produktion von DAG führen (Bankaitis, 2002). Andere Untersuchungen weisen PKD eine Lokalisation in der Kernregion des Golgi-Kompartimentes zu, wo sie in basale Transportprozesse, zelluläre Sulfataufnahme und Golgi-spezifische Glykosaminoglykan-Sulfatierung involviert ist (Prestle *et al.*, 1996).

1.4 Transmodulation des EGF Rezeptors

Neben der Transaktivierung von RTKs durch die Aktion von z.B. G-Protein-gekoppelten Rezeptoren, der eine positiv regulatorische Funktion zugrunde liegt, ist als weitere Form der RTK-Modifikation eine negativ regulatorische Transmodulation durch Phosphorylierung von Serin-/Threoninresten am Rezeptor bekannt, welche ebenfalls durch Membranrezeptoren oder andere intrazelluläre Vorgänge hervorgerufen wird.

Das am besten untersuchte Beispiel für die Rezeptortransmodulation ist der EGF Rezeptor. Bereits in den frühen Achtzigern wurden die drei Mechanismen der Negativregulation entdeckt: Die Inhibition der hochaffinen EGF-Ligandenbindung an den Rezeptor, die Inhibition der EGF-stimulierten Tyrosinkinaseaktivität und eine Steigerung der Serin-/Threoninphosphorylierung (Friedman *et al.*, 1984; Hunter *et al.*, 1984). Diese Vorgänge werden durch PKCs vermittelt, nachdem ihre Aktivität durch PDGF, EGF, Phorbolester oder eine Reihe anderer Stimuli induziert worden ist. Auch eine PKC-unabhängige Transmodulation durch Thapsigargin ist bekannt (Friedman *et al.*, 1989).

Es wurden bereits zahlreiche Serin-/Threoninreste im Zuge der EGF Rezeptortransmodulation identifiziert. So werden die Serine 1046 und 1047 von der Calmodulin-abhängigen (CaM) Kinase II phosphoryliert, was eine Verminderung der EGF-induzierten Tyrosinkinaseaktivität zur Folge hat. Dies könnte ein Beispiel für einen Rückkopplungsmechanismus sein, da EGF eine zytosolische Ca^{2+} -Erhöhung bewirkt, welche die Aktivierung der CaM Kinase II nach sich zieht (Countaway *et al.*, 1992).

Als weitere Beispiele für diese Art der Regulation dienen die Phosphorylierung des EGF Rezeptors durch die cAMP-abhängige Kinase (PKA) an mehreren Serinresten (Barbier *et al.*, 1999) und die EGF-aktivierte zyklinabhängige Kinase $\text{p34}^{\text{cdc}2}$ an Serin 1002, welche jeweils eine Verminderung der induzierten Kinaseaktivität bewirken. (Kuppuswamy *et al.*, 1993). Zusätzlich zur herabgesetzten Kinaseaktivität wird die Endozytose des Rezeptors durch seine Phosphorylierung an Serin 671 und Threonin 669 vermittelt (Heisermann und Gill, 1988; Heisermann *et al.*, 1990).

Dieser Threoninrest wurde als Hauptphosphorylierungsstelle nach der Stimulation mit Phorbolestern ermittelt (Heisermann und Gill, 1988), außerdem ist er ein Substrat für MAP Kinasen (Northwood *et al.*, 1991; Takishima *et al.*, 1991). Threonin 654 ist ein wichtiges Substrat für PKCs und führt zur Reduzierung der Tyrosinkinaseaktivität des EGF Rezeptors (Hunter *et al.*, 1984; Davis und Czech, 1985).

Später wurde gezeigt, dass die Doppelphosphorylierung des EGF Rezeptors an diesen beiden Resten erforderlich, aber auch ausreichend ist, um den wichtigen JNK-Signalweg in Rat1-Zellen negativ zu regulieren. Wie schon erwähnt, fungiert PKD hierbei als Vermittler der PKC-abhängigen EGF Rezeptortransmodulation durch den PDGF Rezeptor (Bagowski *et al.*, 1999).

Weiterhin wurden die verschiedenen Mechanismen der EGF Rezeptortransmodulation nach ihren zeitlichen Verläufen eingeordnet. So beobachtet man innerhalb von Minuten eine Abnahme der Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptors und von HER2 durch Phorbol-12-myristat-13-azetat (PMA), während die vom PDGF Rezeptor und vom Insulinrezeptor unter diesen Bedingungen gesteigert wird. Hingegen führt eine längere Stimulation von $\text{PKC}\alpha$ mit PMA zu ihrer Translokation an die Membran und zu stabilen Komplexen dieser PKC-Isoform mit allen untersuchten Rezeptoren. Dieses Ereignis führt zur Serin-/Threoninphosphorylierung der RTKn und anschließender Rezeptordegradation. Eine Rolle für $\text{PLC}\gamma$ in dieser PKC-vermittelten Negativregulierung von RTKn wurde ebenfalls nachgewiesen (Seedorf *et al.*, 1995).

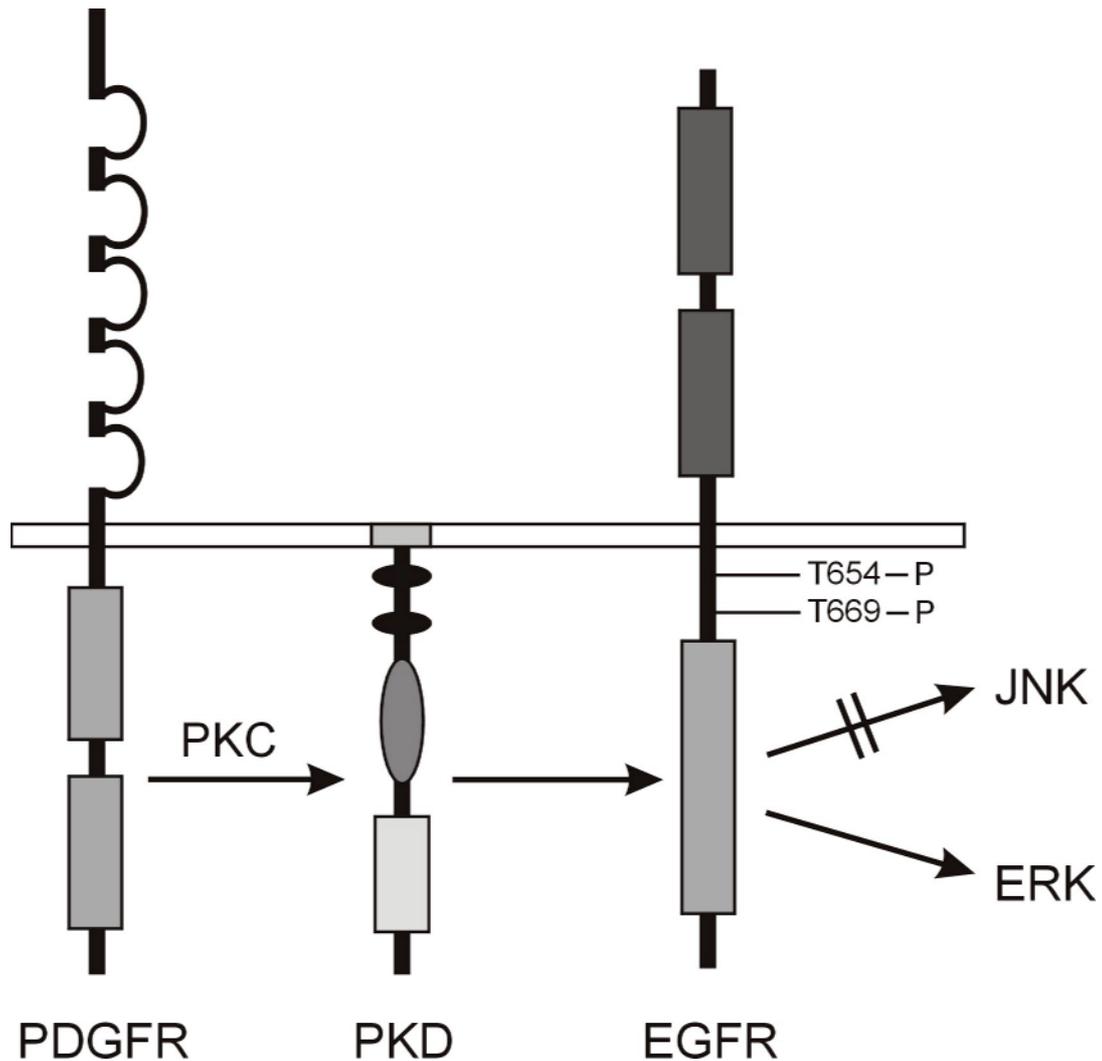


Abb. 1.9: Modell für die PDGF-induzierte Suppression der EGF-abhängigen JNK-Aktivierung. PDGF stimuliert die Serin-/Threoninphosphorylierung und die Aktivierung von PKD in einem Prozess, der von PKCs vermittelt wird. Die PDGF-induzierte Aktivierung von PKD führt zur Transmodulation des EGF Rezeptors und zur Phosphorylierung des EGF Rezeptors an zwei kritischen Threoninresten in der Juxtamembranregion (T654 und T669). Der doppelt phosphorylierte EGF Rezeptor inhibiert die EGF-abhängige JNK-Aktivierung, wohingegen die ERK-Aktivierung unbeeinträchtigt bleibt. Diese Suppression des JNK MAP Kinase-Weges führt zur Inhibition der EGF-abhängigen Transkription und Aktivierung des Transkriptionsfaktors c-Jun, zu einer Reduktion des transformierenden Potentials des EGF Rezeptors und zur Inhibition des JNK-abhängigen Teil des Zellwachstums.

1.5 Transaktivierung

Neben der oben beschriebenen Aktivierung von RTKs durch ihre spezifischen Liganden können RTKs auch ligandenunabhängig aktiviert werden. Zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre beschreiben die Tyrosinphosphorylierung von RTKs als Antwort auf verschiedene Formen von zellulärem Stress, wie z.B. hyperosmotischem Schock, Behandlung mit UV-Licht und verschiedenen Oxidantien, wie Wasserstoffperoxid (King *et al.*, 1989; Miller *et al.*, 1994; Sachsenmaier *et al.*, 1994; Coffey *et al.*, 1995; Huang *et al.*, 1996; Knebel *et al.*, 1996). Außerdem ist die Inaktivierung antagonistisch wirkender PTPasen ausreichend, um die Tyrosinphosphorylierung von RTKs zu induzieren (Jallat *et al.*, 1992). Weiterhin lagen Daten vor, die zeigten, dass die Aktivierung spannungsabhängiger Kalziumkanäle durch Membrandepolarisation bei Zellen der PC12 Pheochromocytoma-Zelllinie die Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptors induziert (Rosen und Greenberg, 1996).

Interessanterweise konnte ein Signalaustausch zwischen GPCRn und dem EGF Rezeptor demonstriert werden. Stimulation von Rat1-Fibroblasten mit Endothelin-1 (ET-1) und Thrombin, Agonisten von GPCRn, führte zur transienten Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptors. Um diesen Vorgang von der ligandeninduzierten EGF Rezeptor-Tyrosinphosphorylierung zu unterscheiden, wurde der Begriff Transaktivierung verwendet (Daub *et al.*, 1996). Später wurde gezeigt, dass die Transaktivierung des EGF Rezeptors in Cos7-Zellen durch den EGF-ähnlichen Liganden HB-EGF hervorgerufen wird, nachdem er durch GPCRn-induzierte Metalloproteasen aus seinem Vorläuferprotein prozessiert wurde. Das über Transaktivierung zu vermittelnde Signal der GPCRn wird dabei vom Liganden über den Rezeptor zunächst in die Zelle geleitet, woraus die Aktivierung der extrazellulären Metalloproteasen und Bindung von HB-EGF an den EGF Rezeptor resultiert, welcher das Signal wieder ins Zellinnere leitet (Prenzel *et al.*, 1999).

Neben der EGF Rezeptor-Transaktivierung wurde auch Angiotensin II-induzierte PDGF Rezeptor- und Thrombin-stimulierte IGF-1 (Insulin-like growth factor 1) Rezeptor-Tyrosinphosphorylierung in glatten Muskelzellen der Ratte nachgewiesen (Linseman *et al.*, 1995; Rao *et al.*, 1995).

1.6 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Rolle von Proteinkinase D (PKD) für den Mechanismus der PDGF-induzierten EGF Rezeptortransmodulation detaillierter untersucht werden, nachdem bereits ein Einfluss von PKD auf diesen Prozess nachgewiesen worden war (Bagowski *et al.*, 1999). Neben dem Einfluss von Rezeptortyrosinkinasen sollte ebenso die Wirkung von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCRn) auf die Inhibition der EGF-induzierten JNK-Aktivierung untersucht werden, ein Effekt, der durch die Transmodulation verursacht wird, und über den die Transkription bestimmter Gene selektiv reguliert werden kann. So sollte geprüft werden, ob es einen Mechanismus gibt, durch welchen GPCRn neben der bekannten Transaktivierung (Daub *et al.*, 1996) ebenso eine Transmodulation des EGF Rezeptors bewirken können. Darüber hinaus sollten mögliche zelluläre Wechselwirkungspartner von PKD identifiziert und ihre Rolle bei der EGF Rezeptortransmodulation näher untersucht werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Bezugsquellennachweis

2.1.1 Chemikalien

| | |
|---|---------------------------|
| Acrylamid | Serva, Heidelberg |
| AG 1296 | Calbiochem, Bad Soden |
| AG 1478 | P. Hirth, SUGEN |
| Agar | Difco, Detroit |
| Agarose | BRL, Eggenstein |
| Ampicillin | Boehringer, Mannheim |
| Aprotinin | Sigma, Taufkirchen |
| APS (Ammoniumperoxodisulfat) | Bio-Rad, München |
| ATP (Adenosintriphosphat) | Pharmacia, Freiburg |
| Bisacrylamid | Roth, Karlsruhe |
| Bromphenolblau | Sigma, Taufkirchen |
| BSA (Rinderserumalbumin) | Sigma, Taufkirchen |
| Chloroquin | Sigma, Taufkirchen |
| Coomassie G250 | Serva, Heidelberg |
| Desoxynukleotide (dG/A/T/CTP) | Boehringer, Mannheim |
| Didesoxynukleotide (ddG/A/T/CTP) | Pharmacia, Freiburg |
| Dimethyldichlorsilan | Sigma, Taufkirchen |
| DTT (Dithiothreitol) | Sigma, Taufkirchen |
| Ethidiumbromid | Sigma, Taufkirchen |
| Geneticin (G418) | Gibco, Eggenstein |
| GF109203X | LC Laboratories, Grünberg |
| Glutathion-Sepharose | Pharmacia, Freiburg |
| HEPES (4-2-Hydroxyethyl-1-piperazin-ethansulfonsäure) | Serva, Heidelberg |
| L-Glutamin | Gibco, Eggenstein |
| Histon H1 (aus Kalbthymus) | Sigma, Taufkirchen |
| IPTG (Isopropyl- β -thiogalactopyranid) | Biomol, Hamburg |
| Lipofectamine® | Gibco, Eggenstein |
| Lysozym | Sigma, Taufkirchen |
| MBP (myelin basic protein) | Sigma, Taufkirchen |
| Mineralöl | Sigma, Taufkirchen |
| Natriumazid | Serva, Heidelberg |
| Natriumfluorid | Sigma, Taufkirchen |
| Natriumorthovanadat | Aldrich, Steinheim |
| Phenol | Roth, Karlsruhe |
| PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid) | Sigma, Taufkirchen |
| Polybren (Hexadimethrinbromid) | Sigma, Taufkirchen |
| Polyethylenglycol 4000 | Serva, Heidelberg |
| Ponceau S | Sigma, Taufkirchen |

| | |
|--|--------------------|
| Protein-A-Sepharose | Pharmacia-Freiburg |
| Protein-G-Sepharose | Pharmacia-Freiburg |
| SDS (Natriumdodecylsulfat) | Roth, Karlsruhe |
| Sorbitol | Sigma, Taufkirchen |
| TEMED (N,N,N',N'-Tetraethylmethyldiamin) | Serva, Heidelberg |
| TPA (Tetradekanoyl-phorbol-13-azetat) | Sigma, Taufkirchen |
| Triton X-100 | Serva, Heidelberg |
| Tween 20 | Sigma, Taufkirchen |
| Tween 40 | Sigma, Taufkirchen |
| Xylencyanol | Merck, Darmstadt |

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden in analysenreiner Qualität von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

2.1.2 Enzyme

| | |
|-------------------------|----------------------|
| Alkalische Phosphatase | Boehringer, Mannheim |
| Proteinase K | Sigma, Taufkirchen |
| PCR-Beats | Pharmacia, Freiburg |
| Restriktionsenzyme | Pharmacia, Freiburg |
| | Boehringer, Mannheim |
| | Biolabs, England |
| T4-DNA-Ligase | Boehringer, Mannheim |
| T7-DNA-Polymerase | Pharmacia, Freiburg |
| Taq-DNA-Polymerase | Boehringer, Mannheim |
| Trypsin, TPCK-behandelt | Sigma, Taufkirchen |

2.1.3 Radiochemikalien

| | |
|------------------------------------|---------------|
| [γ - ³² P]-ATP | >5000 Ci/mmol |
| [α - ³⁵ S]-dATP | >1000 Ci/mmol |

Alle Radiochemikalien wurden von der Firma NEN (Brüssel) bezogen und vor Ablauf der ersten Halbwertszeit eingesetzt.

2.1.4 „Kits“ und Sonstiges

| | |
|--|------------------------|
| ECL Kit | NEN, Brüssel |
| Filterpapier 3MM | Whatman, USA |
| Hyperfilm MB | Amersham, Braunschweig |
| Kodak X-omat AR | Kodak, Stuttgart |
| Kulturgefäße, Plastik | Greiner, Solingen |
| | Nunclon, Dänemark |
| | Falcon, U.K. |
| Micro BCA Protein Assay Kit | Pierce, USA |
| Parafilm | Dynatech, Denkendorf |
| Poly Prep [®] Chromatographiesäulen | Bio-Rad, München |
| Dowex AG1-X8 | Bio-Rad, München |
| Protein A-Sepharose | Pharmacia, Freiburg |

| | |
|---------------------------------------|-----------------------------|
| Protein G-Sepharose | Pharmacia, Freiburg |
| Glutathion-Sepharose | Pharmacia, Freiburg |
| QIAEX II Gel Extraction Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAquick PCR Purification Kit | Qiagen, Hilden |
| QIAGEN Plasmid Maxi Kit | Qiagen, Hilden |
| Random Primed DNA Labeling Kit | Pharmacia, Freiburg |
| Roti-Quick-Kit | Roth, Karlsruhe |
| Sephadex G-50 (DNA Qualität) | Pharmacia, Freiburg |
| SpinBind PCR Purification System | Biozym, Oldendorf |
| Sterilfilter 0.22 µm, Zelluloseacetat | Nalge Company, USA |
| Sterilfilter 0.45 µm, Zelluloseacetat | Nalge Company, USA |
| T7 Sequencing Kit | Pharmacia, Freiburg |
| Zellulosenitrat 0.45 µm | Schleicher & Schüll, Dassel |

2.1.5 Wachstumsfaktoren und andere Liganden

| | |
|----------------|---------------------------|
| Angiotensin II | Sigma, Taufkirchen |
| Bombesin | Sigma, Taufkirchen |
| Bradykinin | Calbiochem, Bad Soden |
| Carbachol | Sigma, Taufkirchen |
| EGF (Maus) | Toyoba, Japan |
| Endothelin-1 | Calbiochem, Bad Soden |
| LPA | Sigma, Taufkirchen |
| Neurotensin | Calbiochem-Novabiochem-AG |
| PDGF-BB | Boehringer, Mannheim |
| Thrombin | Sigma, Taufkirchen |

2.1.6 Medien und Puffer

Medium für *E.coli* Bakterien

| | | | |
|-----------|-----|---|-------------|
| LB-Medium | 1,0 | % | Trypton |
| | 0,5 | % | Hefeextrakt |
| | 1,0 | % | NaCl |
| | | | pH 7,2 |

Bei Bedarf wurden dem Medium nach dem Autoklavieren folgende Antibiotika zugesetzt:

| | | |
|-----------------|-----|-------|
| Ampicillin | 100 | µg/ml |
| Kanamycin | 100 | µg/ml |
| Chloramphenicol | 30 | µg/ml |

Zur Herstellung fester Nährböden wurde dem Medium 1,5% Agar zugesetzt.

2.1.7 Zellkulturmedien

Alle Zellkulturmedien sowie alle Zusätze wurden von der Firma Gibco (Eggenstein) bezogen, fötales Kälberserum stammte von der Firma Sigma (Taufkirchen).

2. Material und Methoden

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 4,5 mg/ml Glukose, 5 % oder 10 % FCS, 2 mM Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat.

RPMI 1640, 10 % FCS, 2 mM Glutamin

Einfriermedium: 90 % FCS, 10 % DMSO.

2.1.8 Stammlösungen und häufig verwendete Puffer

Die hier aufgeführten Lösungen wurden mit bidestilliertem Wasser angesetzt.

| | | |
|-------------------------|--|--|
| BBS (2x) | 50 mM 280 mM 1,5 mM | BES NaCl Na ₂ HPO ₄ pH 6.96 (NaOH) |
| DNA-Auftragspuffer (6x) | 0,25 % 0,25 % 30,0 % 100,0 mM | Bromphenolblau Xylencyanol Glyzerin EDTA pH 8,0 |
| Laemmli-Puffer (2x) | 187,5 mM 6,0 % 30,0 % 0,01 % 5,0 % | Tris/HCl pH 6,8 SDS Glyzerin Bromphenolblau β-Mercaptoethanol |
| NET (10x) | 150,0 mM 5 mM 50 mM 0,05 % | NaCl EDTA Tris Triton X-100 pH 7,4 (HCl) |
| PBS | 13,7 mM 2,7 mM 80,9 mM 1,5 mM | NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄ pH 7,4 (HCl) |
| SD-Transblot | 50,0 mM 40,0 mM 20,0 % 0,004 % | Tris/HCl pH 7,5 Glycin Methanol SDS |
| TAE (10x) | 400 mM 10 mM | Tris/Acetat EDTA pH 8,0 (Eisessig) |
| TE | 10,0 mM 1,0 mM | Tris/HCl pH 8,0 EDTA pH 8,0 |

| | | |
|-----------------------|--------------------------------|----------------------------------|
| Tris-Glycin-SDS (10x) | 248,0 mM 1918,0 mM 1,0 % | Tris/HCl pH 7,5 Glycin SDS |
|-----------------------|--------------------------------|----------------------------------|

2.1.9 Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper

Im folgenden sind die verwendeten Bakterienstämme, Zelllinien und Antikörper unter Angabe ihrer Eigenschaften und Referenzen tabellarisch aufgeführt.

2.1.9.1 Bakterienstämme

| Stamm | Eigenschaften | Referenz |
|---------------------|--|-----------------------------|
| DH5 α | <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-, m k+), <i>gyrA96, recA1, relA1/F' proAB+</i> , <i>supE44, lambda-thi-1</i> , <i>delta(lacZYA-argF)U169, F'phi80dlacZ</i> DeltaM15, F-, Lambda-, <i>phoA lacIqZ Tn10(tetr)</i> | Genentech, San Francisco |
| <i>E.coli</i> CJ236 | F', <i>dut, ung, thi, relA</i> ; pCJ105(Cm ^r) | Kunkel, 1985 |

2.1.9.2 Zelllinien

| Zelllinie | Ursprung | Referenz |
|------------|---|---------------------|
| 3T3 L1 | embryonale Mausfibroblasten | SUGEN/ATCC |
| A 172 | humane Glioblastomzellen | SUGEN |
| Cos7 | immortalisierte Nierenfibroblasten der grünen Meerkatze | ATCC CRL-1651 |
| HEK 293 | humane embryonale Nierenfibroblasten, transformiert | ATCC CRL-1573 |
| NIH3T3 cl7 | immortalisierte Mausfibroblasten | ATCC CRL-1658 |
| Phoenix E | modifizierte HEK293 Linie zur Produktion von helfervirusfreien, ekotrophen Retroviren | Nolan Lab, Stanford |
| Rat1 | immortalisierte Rattenfibroblasten | R. Friedrich |
| SF 126 | humane Glioblastomzellen | Rosenblum |
| U 1242 | humane Glioblastomzellen | SUGEN |

2.1.9.3 Antikörper

Die folgenden Antikörper wurden zur Immunpräzipitation oder als primäre Antikörper zur Detektion in der Immunoblot-Analyse eingesetzt.

| Antikörper | Eigenschaften | Referenz |
|---------------------|---|---------------------------|
| Phosphotyrosin 4G10 | Maus, monoklonal, gegen Phospho-(3)-Tyrosinreste | UBI, Lake Placid |
| Phosphothreonin | Kaninchen, polyklonal, gegen Phospho-(3)-Threoninreste | NEB |
| EGFR 108.1 | Maus, monoklonal, gegen die extrazelluläre Domäne des humanen EGF Rezeptors | Lax <i>et al.</i> , 1989 |
| EGFR 1005 | Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid (AS 1006-1116) des humanen EGF Rezeptors | Santa Cruz, Biotech. Inc. |
| EGFR UBI | Schaf, polyklonal, gegen Teil der zytoplasmatischen Domäne als Fusionsprotein | UBI, Lake Placid |
| Flag D8 | Kaninchen, polyklonal, gegen Flag-Peptid-Domäne | Santa Cruz Biotech., Inc. |
| JNK C17 | Kaninchen, polyklonal, gegen JNK | Santa Cruz |
| PDGFR LJ9 | Kaninchen, polyklonal, gegen den carboxyterminalen Bereich des PDGF Rezeptors | homemade |
| PDGFR 16920 | Maus, monoklonal, gegen den PDGF Rezeptor | Translaboratories |
| Phospho-JNK | Kaninchen, polyklonal, gegen aktivierte JNK | NEB |
| PKD | Maus, monoklonal gegen den aminoterminalen Bereich der humanen PKD | SUGEN |
| PKD D-20 | Kaninchen, polyclonal, gegen Peptid aus dem aminoterminalen Bereich der humanen PKD | Santa Cruz |
| PLC γ | Maus, monoklonal, gegen Peptid aus dem aminoterminalen Bereich von PLC γ | Translaboratories |

| | | |
|----------|---|------------|
| Syk N19 | Kaninchen, polyklonal, gegen Peptid aus dem aminoterminalen Bereich von Syk | Santa Cruz |
| Syk 4D10 | Maus, monoklonal, gegen Peptid (AS 313-339) von humaner Syk | Santa Cruz |
| VSV p5D4 | Maus, monoklonal, gegen VSV-Peptid-Domäne | homemade |

Die bei der Immundetektion von Proteinen verwendeten sekundären Antikörper waren mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert.

| Antikörper | Verdünnung | Bezugsquelle |
|-----------------------|------------|---------------------|
| Ziege gegen Maus | 1 : 20000 | BioRad (München) |
| Ziege gegen Maus | 1 : 10000 | Sigma (Taufkirchen) |
| Ziege gegen Kaninchen | 1 : 20000 | BioRad (München) |

2.1.10 Plasmide und Oligonukleotide

2.1.10.1 Ausgangsvektoren

| Vektor | Eigenschaften | Referenz |
|-----------------|---|---|
| pRK5 | Expressionsvektor, Ampr, CMV Promotor, SV40 poly A, hohe Kopienzahl | Genentech, San Francisco |
| pcDNA3 | Expressionsvektor, Ampr, CMV Promotor, BGH poly A, hohe Kopienzahl | Invitrogen, USA |
| (C)-VSV-pcDNA3 | Expressionsvektor, Ampr, CMV Promotor, BGH poly A, Flag-Peptid-Domäne, hohe Kopienzahl | Invitrogen, USA, mod. von J. Bange (diese AG) |
| (C)-Flag-pcDNA3 | Expressionsvektor, Ampr, CMV Promotor, BGH poly A, Flag-Peptid-Domäne, hohe Kopienzahl | Invitrogen, USA, mod. von J. Bange (diese AG) |
| pLXSN | Retroviraler Expressionsvektor, Ampr, Neor, ori aus pBR322, 5'-LTR und 3'-LTR aus MoMuLV, SV40 Promotor | Miller und Rosman, 1989 |
| pcDNA3-GST | Expressionsvektor, Ampr, CMV Promotor, BGH poly A, hohe Kopienzahl | Invitrogen, USA mod. von C.Cant (diese AG) |

2.1.10.2 Im Rahmen dieser Arbeit verwendete Plasmidkonstrukte

| Vektoren | Eigenschaften | Referenz |
|-----------------------------|---|-----------------------------------|
| pGEX-2 c-Jun | cDNA der ersten 79 Aminosäuren des humanen c-Jun in pGEX | C. Bagowski (diese AG) |
| pcDM8-PKC μ | cDNA der humanen Serin/Threonin Kinase PKC μ in pcDM8 | F.J. Johannes (Stuttgart) |
| pRK5-PKD | cDNA der humanen Serin/Threonin Kinase PKD in pRK5 | diese Arbeit |
| pRK5-PKD-KMDA | cDNA der dominant-negativen PKD-Doppelmutante K612M/D727A in pRK5 | diese Arbeit |
| pRK5-PDGFR | cDNA des humanen PDGF β Rezeptors in pRK5 | R. Lammers, S. Mangold (diese AG) |
| pRK5-PLC γ | cDNA der Phospholipase C in pRK5 | R. Lammers, S. Mangold (diese AG) |
| pLXSN-PKD | cDNA der humanen PKD in pLXSN | diese Arbeit |
| pLXSN-PKD-KMDA | cDNA der dominant-negativen PKD-Doppelmutante K612M/D727A in pLXSN | diese Arbeit |
| (C)-Flag-pcDNA3-PDGFR | cDNA des PDGF β Rezeptors in (C)-Flag-pcDNA3 | diese Arbeit |
| (C)-VSV-pcDNA3-PDGFR | cDNA des PDGF β Rezeptors in (C)-VSV-pcDNA3 | diese Arbeit |
| pcDNA3-(C)-VSV-PDGFR2 und 3 | cDNA der C-terminal verkürzten PDGF Rezeptor-Mutanten „PDGFR2“ und „PDGFR3“ in (C)-VSV-pcDNA3 | diese Arbeit |
| pcDNA3-(C)-VSV-PKD2-4 | cDNA der C-terminal verkürzten PKD-Mutanten „PKD2“, „PKD3“ und „PKD4“ in (C)-VSV-pcDNA3 | diese Arbeit |

2.1.10.3 Wichtige Oligonukleotide

| Sequenz | Name |
|---|-----------|
| GGAAATCGTAATTTGTCAATGATCATAATAGCTACA TCTCTTCCTGT „primer“ für die Mutagenese zur Herstellung einer dominant negativen Mutante von pRK5-PKD | PKD-K612M |
| CCAATGATCCGGGCAAAACCAAATGCACAAAGTTTC ACCTGAGGAAAAGG „primer“ für die Mutagenese zur Herstellung einer dominant negativen Mutante von pRK5-PKD | PKD-D727A |
| GGGAATTCGCCACCATGAGCGCCCCTCCGGTCCTG „sense primer“ für die PCR zur Umklonierung der PKD cDNA von pCDM8 in pRK5 und für die PCR zur Umklonierung verkürzter PKD cDNA von pRK5 in einen pcDNA3-tag-Vektor (zur Herstellung der C-terminal verkürzten PKD-Mutanten PKD3 und PKD4) | PKDse-eco |
| CCATCGATTCAGAGGATGCTGACACGCTC „reverse primer“ für die PCR zur Umklonierung der PKD cDNA von pCDM8 in pRK5 | PKDre |
| CGCGGATCCGCCACCATGAGCGCCCCTCCGGTCCTG „sense primer“ für die PCR zur Umklonierung der PKD cDNA von pRK5 in einen pcDNA3-tag-Vektor (für den VSV- PKD-wt „PKD1“ und auch zur Herstellung der C-terminal verkürzten PKD-Mutante PKD2) | PKDse-bam |
| GGAATTCGAGGATGCTGACACGCTCA „reverse primer“ für die PCR zur Umklonierung der PKD cDNA von pRK5 in den pcDNA3-VSV-Vektor (für den VSV-PKD-wt „PKD 1“) | PKD1 |
| GGAATTCTAGCCAAGGGTGGCTCAAGGTCTTATC „reverse primer“ für die PCR zur Umklonierung verkürzter PKD cDNA von pRK5 in den pcDNA3-VSV-Vektor (für die Mutante „PKD 2“) | PKD2 |
| GGAATTCACCCACGGAGGAGCCCTTGGGAATG „reverse primer“ für die PCR zur Umklonierung verkürzter PKD cDNA von pRK5 in den pcDNA3-VSV-Vektor (für die Mutante „PKD 3“) | PKD3 |
| GGAATTCGCAGTTGTTTGGTACTTTCGGTGCACAACG „reverse primer“ für die PCR zur Umklonierung verkürzter PKD cDNA von pRK5 in den pcDNA3-VSV-Vektor (für die Mutante „PKD 4“) | PKD4 |

| | |
|--|---------|
| GGAATTCGCCACCATGCGGCTTCCGGGTGCGATGCCA „sense primer“ für die PCR zur Umklonierung der PDGFR cDNA von pRK5 in einen pcDNA3-tag-Vektor, auch zur Herstellung C-terminal verkürzter PDGF Rezeptor-Mutanten | PDGFRse |
| GCTCTAGACAGGAAGCTATCCTCTGCTTCCGC „reverse primer“ für die PCR zur Umklonierung der PDGFR cDNA von pRK5 in einen pcDNA3-(C)-tag-Vektor | PDGFRre |
| GCTCTAGAGAAGGGGGGCCGAATCTCAA ACTTC „reverse primer“ für die PCR zur Umklonierung verkürzter PDGFR cDNA von pRK5 in den pcDNA3-VSV-Vektor (für die Mutante „PDGFR 2“) | PDGFR2 |
| GCTCTAGAGTGCAGGTAGTCCACCAGGTCTCCGT „reverse primer“ für die PCR zur Umklonierung verkürzter PDGFR cDNA von pRK5 in den pcDNA3-VSV-Vektor (für die Mutante „PDGFR 3“) | PDGFR3 |

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Plasmidpräparation für analytische Zwecke

Für analytische Zwecke wurden kleine Mengen von DNA (2-10 µg) benötigt, deren Aufreinigung mit Hilfe des Qiagen Mini-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

2.2.2 Plasmidpräparation für präparative Zwecke

Für die Transfektion von HEK293, Phoenix A- und Phoenix E-Zellen wurden größere DNA Mengen benötigt, deren Aufreinigung mit Hilfe des Qiagen Maxi-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben durchgeführt wurde.

2.2.3 Enzymatische Behandlung von DNA

2.2.3.1 Verdau von DNA-Fragmenten mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionen erfolgten in den vom Hersteller angegebenen Inkubationspuffern für 1-2 Stunden oder ü.N. beim Temperaturoptimum des Enzyms.

2.2.3.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Die Religation von Vektoren mit kompatiblen Enden wurde durch Dephosphorylierung ihrer 5'-Enden verhindert. 1-4 µg gespaltene Vektor-DNA wurde in einem Reaktionsvolumen von 10-20 µl in 1x Phosphatasepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8,0; 0,1 mM EDTA, pH 8,5) nach Zugabe von 1 µl alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (1 E) für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die dephosphorylierte DNA über ein Agarosegel (0,6-1 % Agarose) aufgereinigt und eluiert.

2.2.3.3 Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase

Bei der Ligation katalysiert T4-DNA-Ligase die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen einem 5'-Phosphat und einem 3'-Hydroxylende von Polynukleotiden. 20 bis 100 ng geschnittene Vektor-DNA wurden mit einem 2-5fachen Überschuss des zu klonierenden DNA-Fragments, 1 µl 10x T4-DNA-Ligasepuffer (0,66 M Tris/HCl, pH 7,5; 50 mM MgCl₂; 50 mM DTT; 10 mM ATP) und 1 µl T4-DNA-Ligase (1 E) versetzt (Gesamtvolumen 10 µl) und ü.N. bei 15°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde zur Transformation von Bakterien verwendet.

2.2.4 Gelelektrophorese von DNA

Doppelsträngige DNA-Moleküle im Größenbereich von 250 Bp bis 14 kBp wurden in 0,6-2,0 %igen horizontalen Agarosegelen aufgetrennt. Als Laufpuffer diente 1x TAE. Die aufzutrennende DNA wurde mit 1/5 Vol 6x DNA-Auftragspuffer versetzt. Die Auftrennung erfolgte je nach Gelgröße bei 30-120 Volt innerhalb von 1-2 h. Danach wurde das Gel für 10 min mit 1x TAE/Ethidiumbromid (2 µg/ml) gefärbt und 10 min in 1x TAE entfärbt.

2.2.5 Isolierung von DNA-Fragmenten

Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte durch die Verwendung des QIAex II Kits der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers.

2.2.6 DNA-Transfer in *E.coli* Bakterien

2.2.6.1 Herstellung kompetenter *E.coli* Bakterien

Es wurde die Methode von Chung und Miller (1988) verwendet. Die Transformationseffizienz war größer als 5×10^6 Klone/µg DNA.

2.2.6.2 Transformation von kompetenten *E.coli* Bakterien

Zur Transformation von *E.coli* wurden 10 µl des entsprechenden Ligationsansatzes verwendet. Dazu wurden 20 µl 5x KCM (500 mM KCl; 150 mM CaCl₂; 250 mM MgCl₂), 70 µl H₂O und 100 µl kompetente, auf Eis aufgetaute Bakterien pipettiert und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz 10 min bei RT inkubiert, dann mit 800 µl LB-Medium versetzt und 45 min bei 37°C geschüttelt. Die Reaktionsansätze wurden auf LB/ Ampicillin-Agarplatten ausplattiert.

2.2.6.3 Dauerkulturen von *E.coli* Bakterien

Zur Herstellung von Dauerkulturen wurden jeweils 0,5 ml einer stationären Bakterienkultur (LB-Medium mit Antibiotikazusatz) mit 0,5 ml einer 50 %igen Glycerinlösung versetzt, kurz gemischt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Diese Kulturen können längere Zeit bei -70°C gelagert werden.

2.2.7 Gezielte Mutagenese von DNA

Mit Hilfe dieser Methode von Messing (1983) und Kunkel (1985) ist es möglich, Punktmutationen, Insertionen und Deletionen in eine bekannte DNA-Sequenz einzuführen.

2.2.7.1 Herstellung von Uracilhaltiger, einzelsträngiger pcDNA3 DNA

Mit 100 µl einer CJ236 ü.N.-Kultur wurden 5 ml LB-Medium mit Chloramphenicol angeimpft und bis zum Erreichen der frühen logarithmischen Phase bei 37°C geschüttelt. Diese Kultur wurde mit 1×10^8 Phagen infiziert (MOI 20) und ü.N. bei 37°C geschüttelt. Danach enthielten die zur Infektion verwendeten M13 Phagen die einzelsträngige DNA, an der die Mutagenese durchgeführt werden sollte. Nachdem die Bakterien durch zweimaliges Abzentrifugieren von 1,2 ml Kulturmedium gründlich aus dem Überstand entfernt worden waren, wurden die Phagen aus dem Überstand durch Zugabe von 300 µl 20 %igem PEG/NaCl bei RT für 20 min präzipitiert. Der Ansatz wurde abzentrifugiert und der Überstand vollständig entfernt. Das Phagensediment wurde in 300 µl TE-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 200 µl puffergesättigtem Phenol/Chloroform mehrfach extrahiert. Nach der Abtrennung der wässrigen Phase wurde die einzelsträngige DNA durch Zugabe von 200 µl 7,5 M NH₄Ac (pH 7,5) und 800 µl absolutem Äthanol gefällt und bei 4°C mit 13 krpm 10 min abzentrifugiert. Das DNA-Präzipitat wurde mit 70 %igem Äthanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl H₂O aufgenommen. Die Qualität der einzelsträngigen DNA wurde auf einem 1,5 %igem Agarosegel ermittelt. Als Kontrolle auf Kontamination mit doppelsträngiger DNA wurden 100 ng unverdautes Plasmid mit auf das Agarosegel aufgetragen.

2.2.7.2 Synthese des mutierten Stranges

Die Hybridisierung des phosphorylierten Oligonukleotids zum uracilhaltigen DNA-Einzelstrang erfolgte folgendermaßen: 200 ng einzelsträngige DNA, 2-3 pmol phosphoryliertes Oligomer, 1 µl 10x Hybridisierungspuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,4; 2 mM MgCl₂; 50 mM NaCl) in einem Gesamtvolumen von 10 µl wurden in einem 70°C warmen Heizblock 2 min zur Temperaturequilibration inkubiert. Danach wurde der Heizblock ausgeschaltet und bis zum Erreichen von 30°C abgekühlt. Zur Synthese des komplementären Stranges wurden dem Ansatz auf Eis 1 µl 10x Synthesepuffer (5 mM dNTP-Mix; 100 mM Tris/HCl, pH 7,5; 50 mM MgCl₂; 20 mM DTT), 5 E T4-DNA Ligase (1 µl), 1 µg T4-Gen 32 Protein (0,5 µl) und 3 E T4-DNA Polymerase (1 µl) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde 5 min auf Eis, 5 min bei 25°C und anschließend 90 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 80 µl TE gestoppt. 10 µl-Aliquots wurden zur Transformation kompetenter *E. coli*. Bakterien genutzt.

2.2.8 Sequenzierung

Zur Sequenzanalyse wurde das T7 Sequencing Kit von Pharmacia nach Herstellerangaben genutzt.

2.2.9 Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR

2.2.9.1 PCR-Amplifikation von DNA und cDNA Fragmenten

Die Methode der Polymerase-Kettenreaktion bietet die Möglichkeit, einen DNA Bereich zwischen 2 bekannten Regionen *in vitro* zu amplifizieren. In einem sich ständig wiederholenden Zyklus aus Denaturierung der DNA, Hybridisierung der Oligomere an den Matrizen-Strang und Synthese des komplementären Stranges durch Verlängerung der Oligomere wird der zwischen den Oligonukleotiden liegende Sequenzbereich exponentiell amplifiziert (Mullis und Faloona, 1987). Die PCR-Reaktionen wurden nach folgendem Grundschema in einem Reaktionsvolumen von 50 µl angesetzt:

1 µl Matrizen-DNA
1 µl "sense" Oligomer, 10 pmol
1 µl "antisense" Oligomer, 10 pmol
5 µl 25 mM MgCl₂
5 µl 10x Taq Polymerase Puffer (20 mM Tris/Cl, pH 8,0;
0,1 mM KCl; 20 mM DTT; 0,1 mM EDTA;
0,5 % Nonidet P40 (v/v); 0,5% Tween 20 (v/v))
8 µl 10 mM dNTP-Mix (dGTP, dATP, dTTP, dCTP)
1 µl DMSO (optional)
1 µl Taq-Polymerase (0,1-0,5 E)
ad 50 µl H₂O

Jede Reaktion wurde mit einer Negativkontrolle durchgeführt, wobei die cDNA bzw. DNA durch ein entsprechendes Volumen an H₂O ersetzt wurde. Die Synthesereaktion wurde in dem Thermocycler „Progene“ der Fa. Techne durchgeführt und dabei folgendes Syntheseprotokoll verwendet:

| | | |
|-----------------------------|-------|-----------------------|
| erste Denaturierung: | 3 min | 94°C |
| Amplifikation 25-30 Zyklen: | 1 min | 94°C (Denaturierung) |
| | 1 min | 52°C (Hybridisierung) |
| | 1 min | 72°C (Synthese) |
| letzte Synthese: | 3 min | 72°C |

Nach Beendigung der Synthese wurde ein Aliquot des Ansatzes per Gelelektrophorese überprüft. Falls das gewünschte PCR-Fragment amplifiziert worden war, wurde es wie unter 2.2.9.2 beschrieben aufgereinigt und stand danach für weitere molekularbiologische Methoden zur Verfügung.

2.2.9.2 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die amplifizierten PCR-Produkte wurden mit Hilfe des „PCR Purification Kit“ (Quiagen) entsprechend den Herstellerangaben zur Weiterverarbeitung vorbereitet.

2.2.9.3 Klonierung von PCR-Produkten

Um PCR-Produkte effizient in Vektoren subklonieren zu können, wurden zusätzlich an den 5'-Enden der Oligomere DNA-Sequenzen synthetisiert, die den Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen entsprechen. Nach Restriktionsverdau und Elution der gereinigten PCR-Produkte konnten diese in die entsprechend vorbereiteten Plasmide ligiert werden.

2.3 Methoden zur Arbeit mit eukaryontischen Zellen

2.3.1 Allgemeine Zellkulturtechniken

Alle in dieser Arbeit verwendeten Säugetierzellen wurden in Brutschränken (Heraeus, B5060 Ek/CO₂) bei 5-7% CO₂, 37°C und wasserdampfgesättigter Atmosphäre kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden aseptisch in Sterilbänken (Heraeus, Laminair) ausgeführt. Die Zellen wurden regelmäßig mit frischem Medium versorgt und passagiert. Weiterhin wurden die Zellkulturen routinemäßig auf Infektion mit Mykoplasmen untersucht. Das Einfrieren von Zellen erfolgte im sog. Einfriermedium aus 90 % FCS und 10 % DMSO. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit einer Neubauer Zählkammer.

2.3.2 Mykoplasmentest

Mykoplasmenkontamination von Zellkulturen beeinflusst die Expression von Zelloberflächenproteinen, die Vermittlung extrazellulärer Signale, den Stoffwechsel und andere Vorgänge und führt hierdurch zu einer Verfälschung von Versuchsergebnissen. Subkonfluente Zellen auf 6 cm Schalen wurden mit Methanol fixiert, zweimal mit PBS gewaschen und dann für 15 min mit dem DNA-Farbstoff Bisbenzimid (0,1 mg/ml in PBS) bei 37°C gefärbt. Anschließend wurden die Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop auf Mykoplasmen hin untersucht.

2.3.3 Kalziumphosphat-Transfektion

Zur Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA hat sich eine modifizierte Kalziumphosphat-Methode bewährt, die durch eine hohe Transfektionseffizienz gekennzeichnet ist (Chen und Okayama, 1987). Dazu wird durch eine Mischung der DNA mit CaCl₂ und einer BES gepufferten Phosphatlösung (BBS) ein Kalziumphosphatpräzipitat der DNA gebildet, das nach einem noch unbekanntem Mechanismus von den Zellen aufgenommen wird (Graham und van der Eb, 1973). Die DNA liegt als Transgenom in den Zellen vor und geht ohne Anwendung eines Selektionsverfahrens im Laufe der Zellteilungen verloren (Scangos und Ruddle, 1981). Daraus resultiert in der sogenannten transienten Expression ein Expressionsmaximum bei etwa 48-72 h nach der Transfektion.

Die Zellen wurden 24 h vor der Transfektion in einer Zelldichte von 2 500 000 pro 10 cm Zellkulturschale in 10 ml Medium ausgesät. Pro Transfektion wurden 1-10 µg DNA mit H₂O zu einem Volumen von 300 µl verdünnt, mit 100 µl einer 1 M CaCl₂-Lösung gemischt und unter gleichzeitigem Schütteln 400 µl BBS (2x) zugetropft. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde das Präzipitat gleichmäßig auf die Zellen verteilt und diese ü.N. bei 37°C und 3% CO₂ inkubiert. Am nächsten Morgen wurden die Zellen mit Medium gewaschen und eventuell mit serumfreiem Medium bis zur Verwendung für 24 h gehungert.

2.3.4 Lipofectamine®-Transfektion von Cos7-Zellen

Das polykationische Transfektionsreagenz Lipofectamine® lagert sich an DNA an und ermöglicht aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften den DNA-Transfer in Säugerzellen. Cos7-Zellen wurden 24 h vor Transfektionsbeginn in einer Zelldichte von 180 000 pro 6-well-Platte ausgesät. Für die Transfektion wurde zunächst eine Lösung A mit 20 µl Lipofectamine® und 180 µl serumfreiem DMEM, sowie eine Lösung B mit 3 µg Plasmid-DNA in 200 µl serumfreiem DMEM

angesetzt. Die Lösungen A und B wurden dann vorsichtig gemischt und 45 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubation wurden die Cos7-Zellen einmal mit 2 ml serumfreiem DMEM gewaschen. Anschließend wurde zu den Transfektionsansätzen 1800 µl serumfreies DMEM gegeben, gemischt und die fertigen Transfektionsansätze auf die Zellen pipettiert, von welchen das Medium kurz davor abgesaugt wurde. Nach 4 h im Brutschrank wurden jeweils 2000 µl DMEM mit 20 % FCS auf die Zellen gegeben und für weitere 20 h weiterinkubiert. Dann wurde das Transfektionsmedium abgenommen und durch serumfreies DMEM ersetzt.

2.3.5 Bestimmung der Transfektionseffizienz

Bei diesem Test werden Säugerzellen mit Expressionsplasmid der β -Galaktosidase, wie unter 2.3.3 oder 2.3.4. beschrieben transfiziert. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektionsbeginn mit PBS gewaschen, 10 min bei RT mit 3 %iger Paraformaldehydlösung in PBS fixiert und nach zweimaligem Waschen mit PBS 10 min mit 0,2 % Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit PBS gewaschen und zur Blaufärbung transfizierter Zellen 60 min bei 37°C mit X-Gal-Lösung (4 mg/ml) inkubiert.

2.3.6 Retroviraler Gentransfer in Rat1-Fibroblasten

Zu Herstellung von Zelllinien, welche ein bestimmtes Protein stabil oder auch transient exprimieren, wurden Phoenix E-Zellen auf 15 cm Kulturschalen ausgesät und mit einer variierten Kalziumphosphat-Methode transfiziert. Hierzu wurden pro Kulturschale 60 µg der zu exprimierenden cDNA in einem retroviralen Expressionsvektor (pLXSN) mit 2200 µl H₂O verdünnt und mit 740 µl 1M CaCl₂ und 3 ml HBS (2x) versetzt. Dann wurde 15 sec unter starker Luftzufuhr gemischt und 15 min bei RT inkubiert. 5 min vor der gleichmäßigen Verteilung des Präzipitats auf die Zellen wurden 16 µl 50 mM Chloroquin pro Kulturschale ins Medium gegeben.

Nach der Transfektion wurden die Zellen ü.N. bei 37°C und 7 % CO₂ inkubiert, und 24 h nach der Transfektion zum Sammeln von Virusüberstand mit 10 ml Medium kultiviert. Der Überstand wurde nach 12 h durch einen 0,45 µm Filter sterilfiltriert und in 1 ml Aliquots bei -20°C gelagert. Zur weiteren Gewinnung von Virusüberstand konnte die Prozedur mit denselben Zellen 1-2 Mal wiederholt werden.

Zur Infektion wurden die jeweiligen Zellen in der exponentiellen Wachstumsphase verwendet und auf 6 cm Kulturschalen ausgesät. 3 ml des gesammelten Virusüberstands der transfizierten Phoenix E Zellen wurde auf die zu infizierenden Zellen gebracht und in Gegenwart von 8 µg/ml Polybren bei 37°C für 4-16 h inkubiert. Bei Mehrfachinfektionen wurde jeweils nach 4 h erneut infiziert. Nach Abschluss der Infektionen wurde das Medium am nächsten Morgen entfernt, und die Zellen wurden für ein Experiment in serumfreiem Medium kultiviert oder, zur Herstellung stabiler Zelllinien, in Selektionsmedium kultiviert. Die Selektion von infizierten Zellen erfolgte mit Geneticin (G418), einem Aminoglykosid-Antibiotikum (3-Desoxystreptamin), das am 80S Ribosom wirkt und die eukaryontische Proteinbiosynthese blockiert. G418 wird durch die bakterielle Phosphotransferase APH(3')II, für die ein Gen im Transposon Tn5 (Neo-Resistenzgen) kodiert, inaktiviert. Zellen ohne Neo-Resistenzgen sterben innerhalb weniger Tage ab.

2.4 Proteinanalytische Methoden

2.4.1 Expression und Aufreinigung eines Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteins

Mit Hilfe von GST-Fusionsvektoren können bakterielle Systeme genutzt werden, um fremde, z.B. eukaryontische Proteine als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST) zu exprimieren. Oft sind solche Fusionsproteine wasserlöslich und können nach der Lyse der Bakterienzellen über Affinitätschromatographie mit Glutathion (GSH)-Sephharose (Pharmacia) gereinigt werden. Die Elution der Proteine findet in Gegenwart von reduziertem Glutathion statt.

2.4.1.1 Expression eines GST-Fusionsproteins in Bakterien

100 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) wurden mit einer frischen pGEX-transformierten Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Morgen wurden mit dieser Bakterienkultur 900 ml LB-Medium (mit Antibiotikum) angeimpft. 1 ml Bakteriensuspension wurde zur Bestimmung der OD₆₀₀ abgenommen. Für eine anschließende Kontrolle der Proteinexpression auf einem SDS-Polyacrylamidgel wurde die Probe abzentrifugiert, und das Pellet mit 30 µl 3x Laemmli-Puffer auf Eis versetzt. Die Expression der GST-Fusionsproteine wurde durch Zugabe von 100 mM IPTG (Endkonzentration: 1 mM) induziert. Die Bakterien wurden hierzu bei 37°C 4-5 h geschüttelt, wobei stündlich mit derselben Menge IPTG induziert und eine Probe der Bakteriensuspension abgenommen wurde, mit der, wie oben beschrieben, verfahren wurde.

Zur Proteinpräparation wurden die Bakterien abzentrifugiert (10 min, 4°C, 5,5 krpm, GS-3 Sorvall-Rotor), in 20 ml eiskaltem TS-Puffer (5 g Saccharose; 0,05 M Tris/HCl pH 8,0) resuspendiert und durch Zugabe von 4 ml Lysozym (20 mg/ml, frisch angesetzt) 15 min auf Eis lysiert. Nach Zugabe von 2 ml EDTA (500 mM, pH 8,0), 300 µl PMSF (100 mM, in Äthanol gelöst) und 4 ml 10 %igem Triton X-100 wurde der Ansatz für 1 h auf Eis gelassen. Hierauf schloß sich eine 45-minütige Zentrifugation (4°C, 20 krpm, SS34-Rotor) an, bei der unerwünschte Zellbestandteile (DNA, RNA, wasserunlösliche Proteine) abgetrennt wurden. 5 µl des geklärten Überstands wurden zur Analyse für eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe 2.4.6) entnommen, mit 15 µl 1x PBS verdünnt und mit 10 µl 3x Laemmli-Puffer versetzt.

2.4.1.2 Affinitätschromatographie mit Glutathion-Sephharose

Zur Aufreinigung des gewünschten Proteins wurden die Überstände in 50 ml-Falcon-Gefäßen mit 1 ml GSH-Sephharose 30 min bei RT oder über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Während dieser Zeit binden die Fusionsproteine an die GSH-Sephharose. Anschließend wurde die GSH-Sephharose dreimal mit eiskaltem 1x PBS gewaschen, abzentrifugiert und das restliche PBS entfernt. Dann wurde die Glutathion-Sephharose Matrix in eine Chromatographiesäule (BioRad, München) überführt und einmal mit kaltem 1x PBS gewaschen.

Die Elution erfolgte mit GST-Elutionspuffer (15 mM reduziertes Glutathion; 50 mM Tris/HCl; pH 7,5-8,0 bei 4°C). Dabei wurde die GSH-Sephharose zweimal mit 750 µl und einmal mit 500 µl Elutionspuffer 30 min bei 4°C inkubiert und das jeweilige Eluat anschließend in Eppendorffreaktionsgefäßen aufgefangen. Zur Kontrolle wurden 5 µl aus allen Fraktionen und der in 1x PBS suspendierten GSH-Sephharose entnommen, mit 15 µl 1x PBS verdünnt und 10 µl 3x Laemmli-Puffer versetzt. Alle Proben wurden dann mit Hilfe einer SDS-PAGE aufgetrennt und analysiert.

Das gesamte Eluat wurde über Nacht gegen eine Lösung mit 30 % Glycerin und 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 dialysiert. Anschließend wurde die Konzentration des eluierten Proteins bestimmt (2.4.3).

2.4.2 Triton X100-Lyse von Zellen

Zur spezifischen Aufreinigung von Proteinen wurden die Zellen mit Hilfe des Detergens Triton X-100 lysiert. Dabei werden die Zellmembranen aufgelöst, während der Zellkern und die übrigen Zellkompartimente intakt bleiben und durch Zentrifugation abgetrennt werden können.

Die Zellen wurden vor der Lyse mit eiskaltem PBS gewaschen und auf Eis mit einem entsprechenden Volumen Lysepuffer (50 mM Hepes pH 7,5; 150 mM NaCl; 10 % Glycerin; 5 mM EDTA, pH 8,0; 1 % Triton X100), das sich nach der Größe der Zellkulturschale richtete, lysiert. Zusätzlich wurden frisch zugegeben: 10 µg/ml Aprotinin; 1 mM PMSF; 100 mM Natriumfluorid; 2 mM Natrium-Orthovanadat, pH 10. Nach 5-10 min auf Eis wurde das Zellysate gesammelt und in ein 1,5 ml Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Abtrennung unlöslicher Zellbestandteile wie Zellkerne und Zytoskelett mittels Zentrifugation (10 min, 13 krpm, 4°C) wurde der Überstand, der alle zytosolischen und membranständigen Proteine enthielt, in ein frisches Eppendorff-Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wurde entweder zur Immunpräzipitation verwendet oder als Gesamtzellysate weiterverarbeitet.

2.4.3 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der „Micro BCA Protein Assay Kit“ nach Angaben des Herstellers verwendet. Diese Methode der Proteinbestimmung wird nicht durch Detergentien, wie sie bei der Lyse von Zellen eingesetzt werden, gestört und ist in Mikrotiterplatten durchführbar. Als Standard wurde eine Rinderserumalbumin-Konzentrationsreihe (100-1000 µg Protein/ml) eingesetzt.

2.4.4 Immunpräzipitation von Proteinen

Zur Anreicherung eines bestimmten Proteins aus dem Zellysate dienen spezifische, an Protein A-Sepharose gekoppelte Antikörper, mit denen eine sog. Immunpräzipitation durchgeführt werden kann.

Protein A ist ein Membranprotein des Bakteriums *Staphylococcus aureus*, das spezifisch an den Fc-Teil einer Reihe von Immunglobulinen binden kann. Durch die Bindung des Antikörpers an die Protein A-Sepharose wird die Isolierung des Immunkomplexes (Antikörper und Protein) erleichtert (Chenais *et al.*, 1977). Zur Immunpräzipitation wurden je 30 µl Protein A-Sepharose und 1-5 µg monoklonaler Antikörper oder 3-10 µl polyklonaler Antikörper zu den mit dem gleichen Volumen HNTG-Puffer (50 mM Hepes, pH 7,5; 150 mM NaCl; 10 % Glycerin; 5 mM EDTA, pH 8,0; 0,1 % Triton X100) versetzten Zellysaten gegeben und für 3-4 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Ansätze wurden bei 13 krpm abzentrifugiert, und der Überstand vorsichtig mit einer ausgezogenen Pasteurpipette abgenommen. Anschließend wurden die Immunpräzipitate dreimal mit HNTG-Puffer gewaschen und in 50 µl 2x Laemmli-Puffer aufgenommen. Vor dem Auftragen auf ein SDS-Polyacrylamidgel wurden die Proben für 5 min bei 100°C gekocht, um den Immunkomplex von der Protein A-Sepharose zu lösen.

2.4.5 In vitro-Assoziation mit GST-Fusionsprotein

Zunächst wurden 1-3 µg GST-Fusionsprotein und 30 µl GSH-Sepharose in 600 µl HNTG-Puffer 1 h bei 4°C auf dem Drehrad inkubiert. Die Ansätze wurden dann kurz bei 13 krpm abzentrifugiert, der Überstand abgesaugt, und auf die Sepharose je 600 µl HNTG-Puffer und Zellysat gegeben. Dann wurde für 4 h auf dem Drehrad inkubiert und die Proben wie in 2.4.4 gewaschen und weiterverarbeitet.

2.4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

SDS-Polyacrylamid-Gele ermöglichen die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht (Laemmli, 1970). Durch das Detergenz SDS werden die Proteine unter Aufhebung ihrer Sekundärstruktur komplexiert, d.h. Konformationseffekte werden dadurch weitgehend aufgehoben. Zugleich erhalten die Proteine eine negative Ladung, so dass ihre Wanderung im Gel vorwiegend durch ihr Molekulargewicht bestimmt wird und nicht von ihrer Aminosäurezusammensetzung bzw. ihrer Eigenladung. Abhängig vom Molekulargewicht der aufzutrennenden Proteine wurden 7-15 %ige SDS-Polyacrylamidgele gegossen, ferner Gradientengele mit einen kontinuierlichen Polyacrylamidgradienten von 15 % nach 7,5 % bzw. 11 % nach 6 %. Auf die Trenngele wurde in Anschluss ein 4 %iges Sammelgel gegossen. Die SDS-Gelelektrophorese wurde, wie von (Sambrook *et al.*, 1990) beschrieben, durchgeführt. Die Gele wurden entweder mit Coomassie G250 gefärbt, oder die Proteine auf Nitrozellulose transferiert. Als Molekulargewichtsstandard bei der Gelelektrophorese wurde folgendes Proteingemisch verwendet:

| Protein: | MG (in kD): | Protein: | MG (in kD): |
|-----------------|-------------|-------------------|-------------|
| Myosin | 205,0 | Ovalbumin | 42,7 |
| β-Galaktosidase | 116,25 | Carboanhydrase | 29,0 |
| Phosphorylase b | 97,4 | Trypsin-Inhibitor | 21,5 |
| BSA | 66,2 | Lysozym | 14,4 |

2.4.7 Färbung und Fixierung von Polyacrylamidgelen

Die Gele wurden mit Coomassie-Lösung (1 % Coomassie G250; 10 % Essigsäure; 40 % Methanol) 5 min gefärbt und dann mit 40 % Methanol; 10 % Essigsäure entfärbt. Anschließend wurden die Gele auf 3 mM Whatmann-Papier bei 80°C unter Vakuum getrocknet. Falls die aufgetrennten Proteine radioaktiv markiert waren, wurden die getrockneten Gele auf einen Röntgenfilm aufgelegt und abhängig von der Signalstärke 12 h bis 1 Woche bei -80°C exponiert.

2.4.8 Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran

Zur Immundetektion von Proteinen wurden diese nach der Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Gershoni und Palade, 1983). Der Transfer erfolgte mit Transblot-SD Puffer für 2 h bei 0,8 mA/cm² Nitrozellulosemembran auf einer "Semidry"-Blotapparatur. Nach dem Transfer wurden die Proteine mit Ponceau S (2 g/l in 2 % TCA) gefärbt, die Banden des Molekulargewichtsstandards markiert und die Membran mit NET-Gelatine entfärbt.

2.4.9 Immundetektion (Immunoblot-Analyse)

Bei der Immundetektion wurden die auf der Nitrozellulosemembran immobilisierten Proteine mit einem Antikörper-gekoppelten Detektionsverfahren nachgewiesen. Das Prinzip dieser Methode basiert darauf, dass in einem ersten Schritt die spezifischen Antikörper die immobilisierten Antigene auf der Nitrozellulose erkennen, während im zweiten Schritt diese ihrerseits durch Antikörper erkannt werden, an die Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist. Durch diese enzymatische Aktivität werden schließlich die Antigenbanden detektiert. Die Detektion erfolgte mit dem „ECL-Kit“ der Firma NEN.

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde diese für 1 h mit 0,25 % Gelatine in 1x NET inkubiert. Zur Detektion der Proteine in der Immundetektion wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper verwendet. Soweit die Konzentration bekannt war, wurden die Antikörperlösungen auf 1 µg/ml in NET, 0,25 % Gelatine eingestellt, ansonsten wurden die Antikörper 1:500 bzw. 1:1000 in NET; 0,25 % Gelatine verdünnt. Der Filter wurde 3 h oder über Nacht bei 4°C mit der Antikörperlösung inkubiert, danach zweimal 5 min mit 0,25% Gelatine in 1x NET gewaschen. Anschließend wurde die Membran 60 min bei RT mit dem zweiten Antikörper in 0,25 % Gelatine in 1x NET inkubiert. Als sekundäre Antikörper wurden Peroxidase-gekoppelte Spezies-spezifische Antikörper verwendet. Vor der Detektion mit dem ECL-Kit (NEN) wurde der Blot schließlich mindestens dreimal 15 min mit 0,25 % Gelatine in 1x NET gewaschen. Zur Detektion wurde der Filter 1 min in einer 1:1 Mischung von den ECL Reagenzien 1 und 2 inkubiert. Anschließend wurde der Blot mit Frischhaltefolie luftblasenfrei abgedeckt und auf einem Röntgenfilm exponiert.

Sollte dieselbe Membran ein weiteres Mal benutzt werden, konnten die gebundenen Antikörper durch Inkubation in einer spezifischen Lösung (62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8; 100 mM β-Mercaptoethanol; 2 % SDS) bei 50°C für 1 h entfernt werden.

2.5 Zellbiochemische und -biologische Untersuchungen

2.5.1 Untersuchung der Tyrosinphosphorylierung verschiedener Proteine

Durch Stimulation sollte die Aktivierung von unterschiedlichen Signaltransduktionswegen und die damit einhergehende Zu- oder Abnahme der Tyrosinphosphorylierung bestimmter Proteine in Zellen untersucht werden. Dazu wurden die Zellen nach dem Aussäen auf Kulturschalen geeigneter Größe 18 bis 24 h in serumfreiem Medium gehungert. Unmittelbar vor der Zellyse (2.4.2) wurden die Zellen für 2 bis 10 min mit verschiedenen Wachstumsfaktoren oder Liganden für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren stimuliert. Wurden die Auswirkungen von Inhibitoren verschiedener Proteine auf die Tyrosinphosphorylierung zu untersuchender Proteine getestet, so wurden die Zellen vor der Stimulation mit den Inhibitoren oder den entsprechenden Kontrollsubstanzen für 10 bis 30 min vorbehandelt.

| Ligand | Stock | Endkonzentration |
|----------------|------------------------|-----------------------|
| Angiotensin II | 1 mM | 1 μ M |
| Bradykinin | 1 mM | 1 μ M |
| Bombesin | 200 μ M in PBS | 200 nM |
| Carbachol | 250 mM in PBS | 1 mM |
| EGF | 50 μ g/ml | 50 ng/ml |
| Endothelin-1 | 50 μ M in PBS | 100 nM |
| LPA | 2,5 mM in PBS, 1 % BSA | 10 μ M |
| PDGF | 50 μ g/ml | 50 ng/ml |
| POV | s. Legende | 10 μ M |
| Sorbitol | Feststoff | 0,5 M im Hungermedium |
| Thrombin | 250 U/ml in PBS | 1 U |
| TPA | 1 mM | 1 μ M |
| Inhibitor | Stock | Endkonzentration |
| AG 1296 | 1 mM | 1 μ M |
| GF 109203X | 2,5 mM | 2,5 μ M |

Tabelle 2.1: Eingesetzte Liganden- und Inhibitor-Endkonzentrationen. Unmittelbar vor der Zellyse wurden die Liganden bzw. Inhibitoren in angegebener Endkonzentration in das Medium der zu stimulierenden Zellen gegeben, und die Zellen bei 37°C inkubiert. Die Inkubationszeit wird beim jeweiligem Experiment angegeben. Zur Herstellung von Pervanadat (POV) wurde eine Lösung aus 10 mM ortho-Vanadat und 0,1 % H₂O₂ in H₂O angesetzt, bei RT 10 min inkubiert, und im Verhältnis 1:1000 in das Medium gegeben.

Nach der Zellyse wurde das zu untersuchende Protein aus den Lysaten durch Immunpräzipitation (2.4.4) isoliert, durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.4.6) aufgetrennt und der Phosphorylierungszustand mit Hilfe eines Phosphotyrosin (α PY)-spezifischen Antikörpers im Immunoblot (2.4.9) analysiert.

2.5.2 Bestimmung der katalytischen Aktivität von Serin-/Threoninkinasen durch *in vitro* Kinaseassays

Bei diesen Kinaseaktivitäts-Assays wird die allgemeine Eigenschaft der ATP-abhängigen Proteinkinasen genutzt, endständige γ -Phosphorylreste von ATP auf ihre Substrate zu übertragen, in-

dem sie in Gegenwart eines geeigneten Substrats mit radioaktiv markiertem ATP inkubiert werden. Anhand der radioaktiven Intensität des phosphorylierten Substrats lässt sich auf die Kinase-Aktivität schließen.

2.5.2.1 *In vitro* Kinasereaktion mit immunpräzipitierter JNK-MAP Kinase

Die endogene MAP Kinase JNK wurde aus 500 µl Zellysat immunpräzipitiert. Die Proteinkomplexe wurden 3x mit 600 µl HNTG-Puffer und einmal mit 600 µl Äquilibrierungspuffer (20 mM HEPES/NaOH pH 7,5; 1 mM DTT; 10 mM MgCl₂; 200 µM Orthovanadat) gewaschen. Anschließend wurde zu den gewaschenen Immunpräzipitaten je 30 µl Reaktionspuffer (20 mM HEPES/NaOH, pH 7,5; 1 mM DTT; 10 mM MgCl₂; 200 µM Orthovanadat; 5 mM p-Nitrophenylphosphat; 50 µM ATP) mit 3 µg GST-c-Jun Fusionsprotein und 1 µCi [γ -³²P]-ATP gegeben und 20 min bei RT im Schüttler inkubiert. Durch Zugabe von je 20 µl 3x Laemmli-Puffer wurde dann die Kinasereaktion gestoppt. Die Proben wurden anschließend mittels 12,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit Ponceau S angefärbt, anschließend mit dem Phosphorimager (Fuji) ausgewertet und danach auf Röntgenfilm exponiert. Nach Abklingen der Radioaktivität wurde der Antikörper von der Membran entfernt, und die Gehalte der JNK-Kinase mittels Immundetektion untersucht.

2.5.2.2 *In vitro* Kinasereaktion mit immunpräzipitierter Erk-MAP Kinase

Die endogene Erk-MAP Kinase wurde aus 100 µl Zellysat immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden 3x mit 600 µl HNTG-Puffer und einmal mit 600 µl Äquilibrierungspuffer (20 mM HEPES/NaOH, pH 7,5; 1 mM DTT; 10 mM MgCl₂; 200 µM Orthovanadat) gewaschen. Anschließend wurde zu den gewaschenen Immunpräzipitaten je 30 µl Reaktionspuffer (20 mM HEPES/NaOH, pH 7,5; 1 mM DTT; 10 mM MgCl₂; 200 µM Orthovanadat; 5 mM p-Nitrophenylphosphat; 0,5 mg/ml MBP; 50 µM ATP) mit 1 µCi [γ -³²P]-ATP gegeben und 10 min bei RT im Schüttler inkubiert. Durch Zugabe von je 30 µl 2x Laemmli-Puffer wurde dann die Kinasereaktion gestoppt. Die Proben wurden anschließend mittels 12,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit Ponceau S angefärbt, anschließend mit dem Phosphorimager (Fuji) ausgewertet und danach auf Röntgenfilm exponiert. Nach Abklingen der Radioaktivität wurde der Antikörper von der Membran entfernt, und die Gehalte der Erk-MAP Kinase mittels Immundetektion untersucht.

2.5.2.3 *In vitro* Kinasereaktion mit immunpräzipitierter Proteinkinase D

Die endogene oder transient exprimierte PKD wurde aus 600 µl Zellysat immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden 3x mit 600 µl HNTG-Puffer und einmal mit 600 µl Äquilibrierungspuffer (20 mM HEPES/NaOH, pH 7,5; 1 mM DTT; 10 mM MgCl₂; 200 µM Orthovanadat) gewaschen. Anschließend wurde zu den gewaschenen Immunpräzipitaten je 30 µl Reaktionspuffer (20 mM HEPES/NaOH, pH 7,5; 1 mM DTT; 10 mM MgCl₂; 200 µM Orthovanadat; 5 mM p-Nitrophenylphosphat; 0,4 mg/ml Histon H1; 50 µM ATP) mit 1 µCi [γ -³²P]-ATP gegeben und 10 min bei 37°C im Schüttler inkubiert. Durch Zugabe von je 30 µl 2x Laemmli-Puffer wurde dann die Kinasereaktion gestoppt. Die Proben wurden anschließend mittels 12,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit Ponceau S angefärbt, anschließend mit dem Phosphorimager (Fuji) ausgewertet und danach auf Röntgenfilm exponiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 PKD-vermittelte EGF Rezeptortransmodulation und Inhibition des EGF-induzierten JNK-Signalweges

Wie bereits erwähnt, wurde PKD eine entscheidende Funktion bei der PDGF-vermittelten EGF Rezeptortransmodulation und nachfolgenden Ereignissen zugeschrieben. Dazu gehören die Inhibition von der MAP Kinase JNK in Rat1-Zellen (Bagowski *et al.*, 1999) und somit Unterdrückung der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors c-Jun. Dieser Effekt wurde in einem induzierbaren System in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK 293) untersucht, die mit einer Kinase-inaktiven PKD-Mutante stabil transfiziert wurden (Hurd und Rozengurt, 2001). Um die Rolle von PKD in dieser Signalkette zu verifizieren, sollte ihre Wirkung mittels einer dominant-negativen Mutante auf zwei Ereignisse hin untersucht werden, die Serin-/Threoninphosphorylierung des EGF Rezeptors und die Inhibition der EGF-induzierten JNK-Aktivierung.

3.1.1 Aktivierung der PKD durch verschiedene Liganden in Rat1-Zellen

Die GPCRn sind eine weitere Klasse von Membranrezeptoren, die PKD aktivieren, aber über die Signalantworten, die sie durch PKD vermitteln, ist noch nicht viel bekannt, außer der G β γ -vermittelten Rekrutierung von PKD zum Golgi-Apparat (Jamora *et al.*, 1999) und der Bombesin-induzierten Translokation zur Plasmamembran (Rey *et al.*, 2001).

Deshalb war von Interesse, ob in Zellen, in denen EGF-induzierte JNK-Aktivität durch PKD inhibiert wird, ein Zusammenhang zwischen diesem Signalweg und G-Protein-vermittelten Aktionen besteht.

So wurde die endogene PKD-Aktivität in Rat1-Zellen durch Stimulation mit Wachstumsfaktoren und diversen Liganden für GPCRn überprüft, ferner die Fähigkeit von PKD, wie JNK, durch Stress, wie z.B. durch Sorbitol-induzierten Osmoseschock, aktiviert zu werden.

Nach Stimulation der Zellen mit verschiedenen Liganden (Abb. 3.1) wurde die aktivierte PKD immunpräzipitiert, und ein *in vitro* Kinaseassay mit [γ -³²P]-ATP angeschlossen, in dem Histon H1 als Phosphorylierungssubstrat für PKD verwendet wurde (nach (Bagowski *et al.*, 1999)). Die Signale wurden auf Röntgenfilm exponiert, alternativ mit dem Phosphorimager (Fuji) ausgewertet und tabellarisch dargestellt.

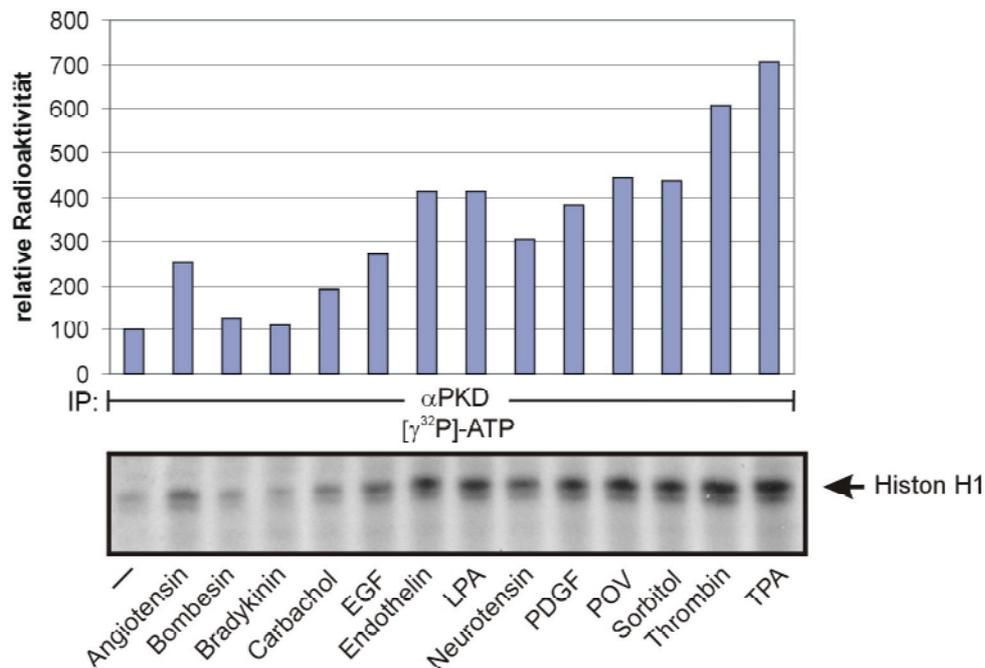


Abb. 3.1: Aktivierung der PKD durch verschiedene Liganden in Rat1-Zellen. In serumfreiem Medium kultivierte Rat1-Fibroblasten wurden 3-5 min mit verschiedenen Liganden für G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (3 min) und für Rezeptortyrosinkinasen (5 min), TPA und POV (5 min) und Sorbitol (15 min) stimuliert. Hierbei wurden die Liganden in den unter 2.5.1 beschriebenen Konzentrationen eingesetzt. Nach der Zellyse wurde PKD mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD Sugen) immunpräzipitiert, und ihre Aktivität in einem *in vitro* Kinaseassay mit Histon H1 als Substrat quantifiziert. Nach Auftrennung der Immunkomplexe mittels einer 12,5 %igen SDS-PAGE wurde phosphoryliertes Histon H1 in einem Autoradiogramm analysiert (*unten*) und in einem Diagramm dargestellt (*oben*).

In Abb. 3.1 ist deutlich zu sehen, dass PKD durch Endothelin, LPA (4fach) und Thrombin (6fach), deren Rezeptoren auf Rat1-Zellen exprimiert werden, effektiv aktiviert wird, vergleichbar mit der Induzierung durch TPA (7fach). Auffällig ist auch die ebenso hohe Aktivierung von PKD unter zellulären Stressbedingungen, hervorgerufen durch Sorbitol (4,5fach). Auch Stimulation mit dem Wachstumsfaktor PDGF erhöht die PKD-Aktivität, verglichen mit ihrer Basalaktivität, auf das Vierfache. Die anderen eingesetzten Liganden für GPCRn stimulieren PKD nur sehr schwach, vergleichbar mit der Induzierung durch EGF oder gar nicht. Da die Rezeptoren für Bombesin, Bradykinin und Angiotensin II, wie der Endothelin-Rezeptor, ihre Signale ebenfalls über heterotrimäre G_q -Proteine vermitteln, ist anzunehmen, dass diese Rezeptoren auf Rat1-Zellen nur sehr schwach oder gar nicht exprimiert werden.

3.1.2 Herstellung einer dominant-negativen PKD-Mutante und ihre Verifizierung in verschiedenen Zellsystemen

Um eine dominant-negative Mutante von humaner PKD zu erhalten, wurden zwei wichtige Aminosäuren von der Kinasedomäne, die für ihre Aktivität unerlässlich sind, mit der Kunkel-Mutagenese ausgetauscht. So ist das Lysin an der Position 612 ein hochkonservierter Rest im ATP-Bindungsmotiv, dessen Substitution durch Reste wie Methionin oder Tryptophan die ATP-Bindung verhindern (Rozengurt *et al.*, 1997). Hingegen ist der polare Aspartatrest an Position 727 in der katalytischen Subdomäne VII essentiell für die katalytische Aktivität (Iglesias *et al.*, 1998).

Es wurden drei Einzelmutanten K612M (KM), K612W (KW) und D727A (DA), sowie die Doppelmutante K612M/D727A (KMDA) aus dem pRK5-PKD-wt (Wildtyp)-Konstrukt hergestellt. Anhand von Kinaseassays wurde in verschiedenen Zelltypen die Fähigkeit der Mutanten untersucht, die durch verschiedene Liganden induzierte, endogene PKD-Aktivität zu unterdrücken.

3.1.2.1 *Suppression der PDGF- und TPA-induzierten PKD-Aktivität in HEK 293-Zellen durch die dominant-negative PKD-Mutante K612M/D727A*

Um die hergestellten PKD-Mutanten auf ihre Aktivität zu untersuchen, wurden **HEK 293-Zellen**, die auch endogene PKD enthalten, aber keinen PDGF Rezeptor exprimieren, verwendet. Die Zellen wurden durch die Kalziumphosphat-Methode mit dem Konstrukt für den PDGF Rezeptor und zusätzlich mit den Konstrukten für PKD-wt oder die PKD-Mutanten oder zur Kontrolle mit dem pRK5-Leervektor (mock) transfiziert. Die Induzierung erfolgte mit PDGF oder dem Phorbolster TPA. Nach der Immunpräzipitation von PKD aus den Zellysaten wurde ein *in vitro* Kinaseassay mit [γ - 32 P]-ATP angeschlossen, in dem Histon H1 als Phosphorylierungssubstrat für PKD verwendet wurde. Die Signale wurden auf Röntgenfilm exponiert, alternativ mit dem Phosphorimager (Fuji) ausgewertet und in einem Diagramm dargestellt (Abb. 3.2). Hier ist zu beachten, dass die beobachteten Aktivitäten der verschieden transfizierten Zellen sich zusammensetzen aus der Aktivität von endogener PKD und der des jeweils transfizierten Konstrukts.

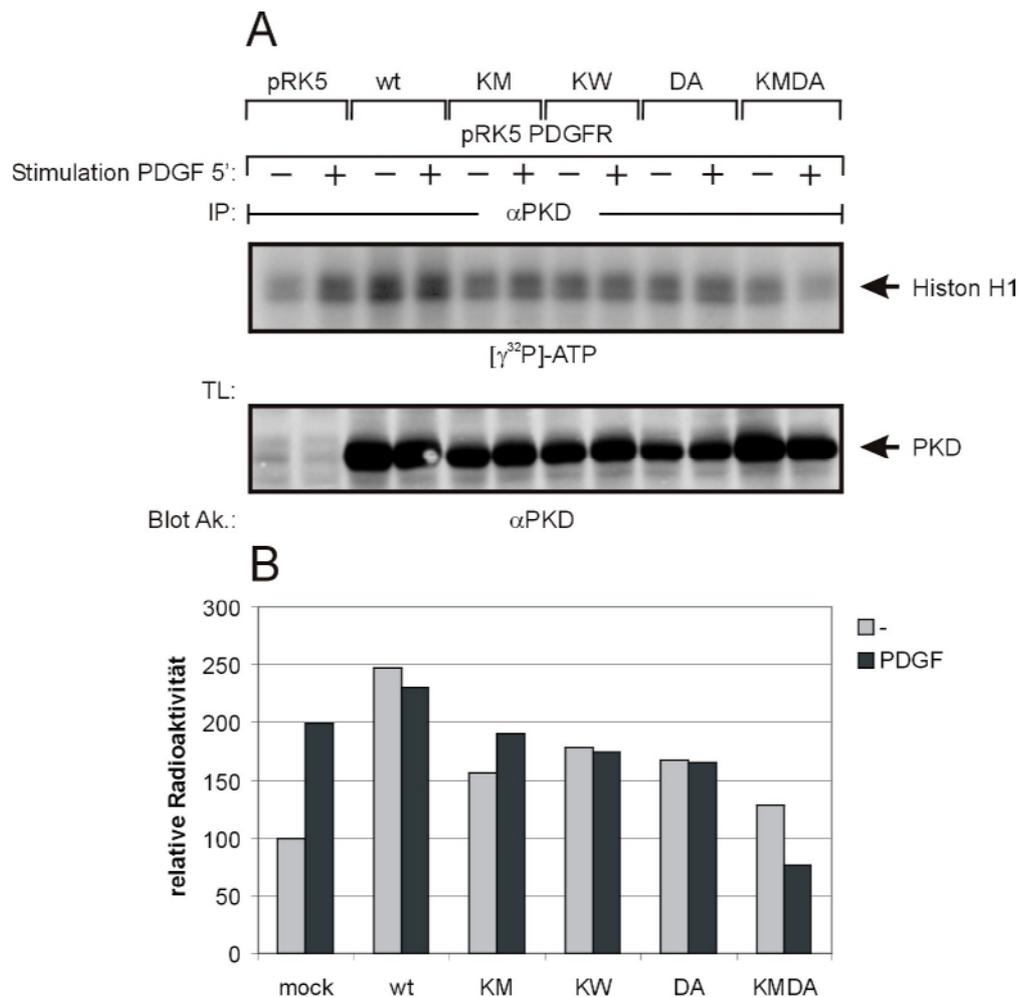


Abb. 3.2: Wirkung verschiedener Kinase-inaktiver PKD-Mutanten auf die PDGF-induzierte PKD-Aktivität in HEK 293-Zellen. Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293) wurden transient mit dem Konstrukt für den PDGF Rezeptor und zusätzlich mit dem pRK5-Leervektor oder den Konstrukten für PKD-wt oder die PKD-Mutanten kotransfiziert, serumgehungert und mit PDGF 5 min stimuliert. Nach der Zellyse wurde PKD mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD Sugen) immunpräzipitiert, und ihre Aktivität in einem *in vitro* Kinaseassay mit Histon H1 als Substrat quantifiziert. Nach Auftrennung der Immunkomplexe mittels einer 12,5 %igen SDS-PAGE wurde phosphoryliertes Histon H1 in einem Autoradiogramm analysiert (A, oben), und die relative Radioaktivität in einem Diagramm dargestellt (B). Als Expressionskontrolle der verschiedenen PKD-Mutanten in den Totallysaten wurden sie mit dem polyklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD D20) immundetektiert (A, unten). Abk.: wt: Wildtyp; KM: K612M; KW: K612W; DA: D727A ; KMDA: K612M/D727A.

In dem Diagramm (Abb. 3.2 B) ist zu erkennen, dass die Basalaktivität der endogenen PKD, wenn man ihre geringe Expression beachtet, ähnlich hoch ist wie die der transfizierten PKD-Mutanten, wohingegen das wt-Konstrukt zu einer deutlich höheren Basalaktivität führt. Diese Aktivität liegt sogar über der induzierten endogenen Aktivität und lässt sich durch Stimulation nicht weiter erhöhen, was für eine Sättigung der Aktivität spricht.

Bei den Mutanten, welche im gleichen Ausmaß exprimiert werden wie das transfizierte wt-Konstrukt (Abb. 3.2 A, unten), ist nach Stimulation mit PDGF keine Induzierung der PKD-

Aktivität zu beobachten, sie verhalten sich somit Kinase-inaktiv. Die einzige, die in der Lage ist, die stimulierte Aktivität der endogenen PKD vollständig zu supprimieren, ist die Doppelmutante PKD-K612M/D727A (KMDA).

Ähnliche Beobachtungen wurden in einem weiteren Experiment nach Induzierung der PKD-Aktivität mit TPA gemacht. Auch hier erweist sich die Mutante KMDA als am besten geeignet, um TPA-induzierte endogene PKD-Aktivität zu unterdrücken (Abb. 3.3).

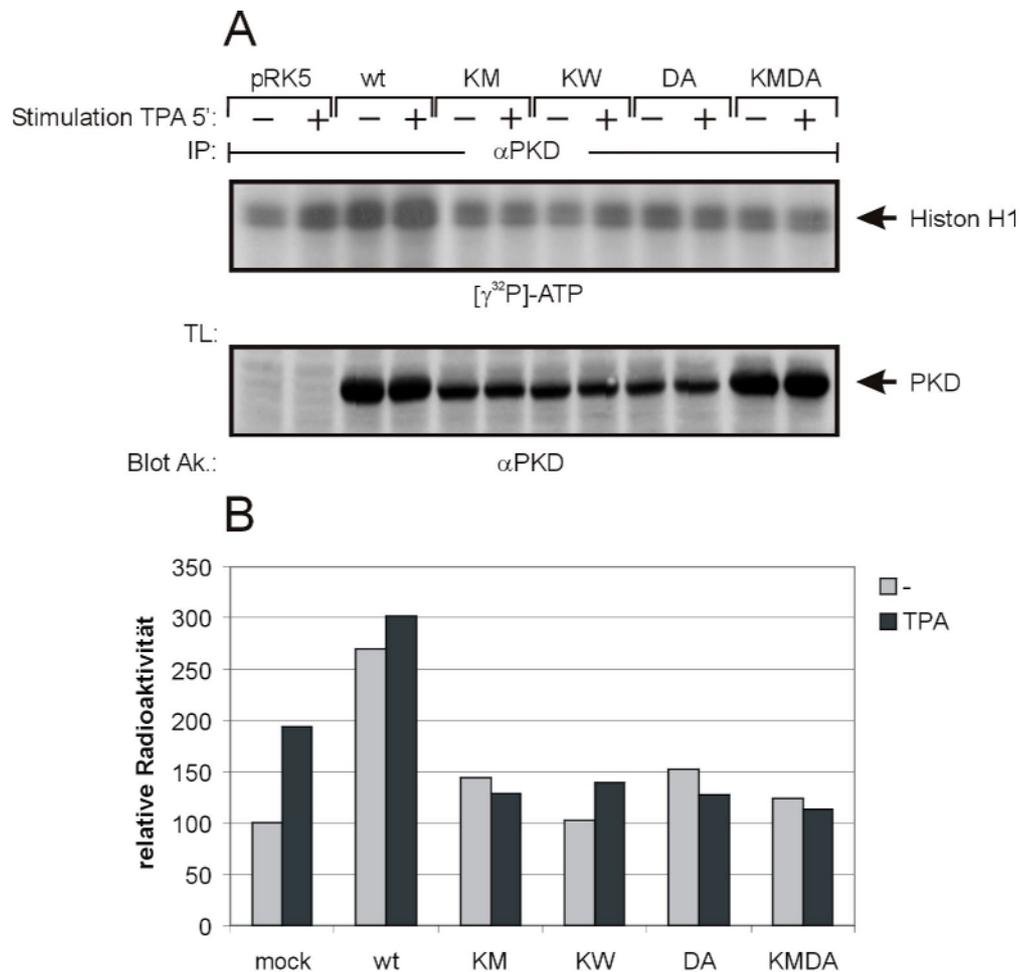


Abb. 3.3: Wirkung verschiedener Kinase-inaktiver PKD-Mutanten auf die TPA-induzierte PKD-Aktivität in HEK 293-Zellen. Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293) wurden transient mit den Konstrukten für PKD-wt oder die PKD-Mutanten oder dem Leervektor transfiziert, serumgehungert und mit TPA 5 min stimuliert. Nach der Zellyse wurde PKD mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD Sugen) immunpräzipitiert, und ihre Aktivität in einem *in vitro* Kinaseassay mit Histon H1 als Substrat quantifiziert. Nach Auftrennung der Immunkomplexe mittels einer 12,5 %igen SDS-PAGE wurde phosphoryliertes Histon H1 in einem Autoradiogramm analysiert (A, oben), und die relative Radioaktivität in einem Diagramm dargestellt (B). Als Expressionskontrolle der verschiedenen PKD-Mutanten wurden die Totallysate gegen PKD immundetektiert (A, unten). Abk.: wt: Wildtyp; KM: K612M; KW: K612W; DA: D727A ; KMDA: K612M/D727A.

3.1.2.2 Aktivität von PKD-wt und der PKD-KMDA-Mutante in Cos7-Zellen

Bevor die PKD-Mutante KMDA für weitere Experimente eingesetzt wurde, wurde ihre dominant-negative Wirkung auch in Cos7-Zellen, die nur wenig endogene PKD exprimieren, untersucht, um ein Kontrollsystem mit geringer endogener PKD-Aktivität zur Verfügung zu haben.

In zwei unabhängig voneinander durchgeführten Experimenten wurden Cos7-Zellen transient mit der Lipofectamine[®]-Methode mit dem Konstrukt für den PDGF Rezeptor und zusätzlich mit dem Leervektor oder den Konstrukten für PKD-wt oder PKD-KMDA kotransfiziert. Nach Stimulation mit PDGF bzw. TPA wurde PKD aus den Zellysaten immunpräzipitiert und oben beschriebenen PKD-Kinaseassay unterworfen.

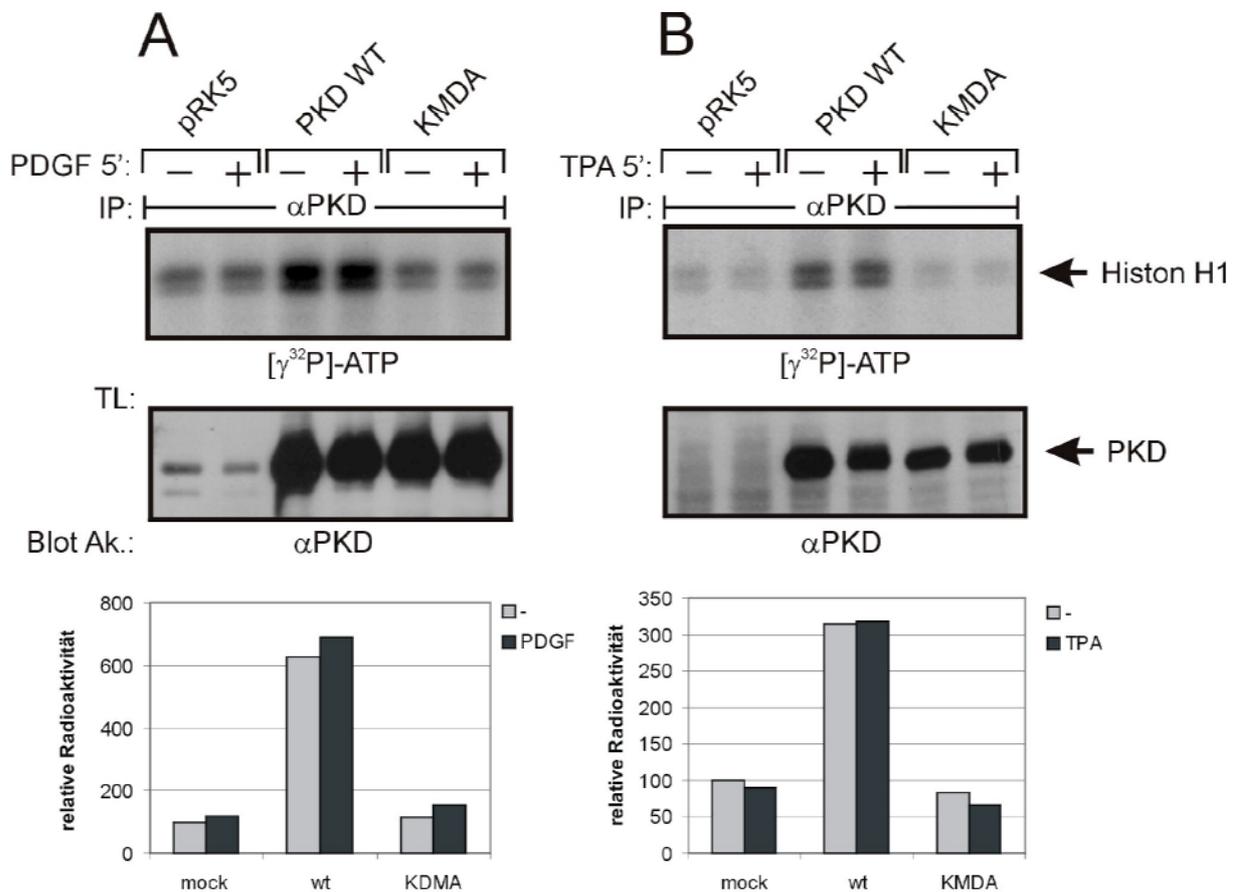


Abb. 3.4: Aktivität von PKD-wt und der PKD-KMDA-Mutante in Cos7-Zellen. Cos7-Zellen wurden transient mit dem Konstrukt für den PDGF Rezeptor und zusätzlich mit dem Leervektor oder den Konstrukten für PKD-wt oder PKD-KMDA kotransfiziert, serumgehungert und mit PDGF (A) oder TPA (B) 5 min stimuliert. Nach der Zellyse wurde PKD mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD Sugen) immunpräzipitiert, und ihre Aktivität in einem *in vitro* Kinaseassay mit Histon H1 als Substrat quantifiziert. Nach Auftrennung der Immunkomplexe mittels einer 12,5 %igen SDS-PAGE wurde phosphoryliertes Histon H1 in einem Autoradiogramm analysiert (*oben*), und die relative Radioaktivität in einem Diagramm dargestellt (*unten*). Als Expressionskontrolle der verschiedenen PKD-Mutanten wurden die Totallysate gegen PKD immundetektiert (*Mitte*). Abk.: wt: Wildtyp; KMDA: K612M/D727A.

In den Diagrammen beider Experimente fällt auf, dass die PKD-Aktivität in Cos7-Zellen weder durch PDGF, noch durch TPA induziert werden kann (Abb. 3.4 A und B, *unten*), wodurch die Tatsache, dass PKD in sehr geringer Menge vorliegt, bestätigt wird. In wt-transfizierten Zellen wird dementsprechend eine relative hohe Basalaktivität von PKD beobachtet, doch auch diese kann durch Stimulation mit PDGF oder TPA nicht gesteigert werden. Hingegen wird die in den Zellen vorhandene Basalaktivität von PKD in Gegenwart der KMDA-Mutante nicht erhöht, diese verhält sich somit Kinase-inaktiv, da in Abwesenheit induzierter endogener Aktivität von einer dominant-negativen Wirkung definitionsgemäß nicht gesprochen werden kann.

3.1.2.3 *Suppression der PKD-Aktivität durch KMDA in Rat1-Zellen*

Als nächstes wurde die Mutante KMDA in Rat1-Zellen eingesetzt, um ihre Wirkung auf die durch PDGF, TPA, Endothelin und LPA induzierte endogene Aktivität von PKD zu ermitteln. Rat1-Fibroblasten wurden durch retroviralen Gentransfer mit den pLXSN-Konstrukten für PKD, die PKD-KMDA-Mutante oder dem Leervektor transient infiziert, serumgehungert und mit TPA, LPA oder Endothelin 5 min stimuliert. Die aktivierte PKD wurde aus den Zellysaten immunpräzipitiert und oben beschriebenen PKD-Kinaseassay unterworfen.

Wie auch unter 3.1.1 beschrieben, aktivieren TPA, LPA und Endothelin endogene PKD sehr effizient, wobei jedoch nach Infektion mit PKD-wt, die mit einer hohen Basalaktivität einhergeht, keine weitere Steigerung durch Stimulation zu erreichen ist. Jedoch zeigt KMDA nicht bei allen Liganden eine vollständige Unterdrückung der induzierten endogenen PKD-Aktivität. So fällt vor allem auf, dass LPA-induzierte PKD-Aktivität auch in Gegenwart von KMDA fast doppelt so hoch ist wie die Basalaktivität, die um 50 % gegenüber der endogenen Basalaktivität erhöht ist. So wird die induzierte endogene Aktivität von PKD durch KMDA lediglich um 25 % reduziert (Abb. 3.5 B, *mitte*). Hingegen beträgt die Zunahme der PKD-Aktivität in Endothelin-stimulierten Zellen in Gegenwart der KMDA-Mutante lediglich 50 % der Aktivitätserhöhung in den mit Leervektor infizierten Kontrollzellen (Abb. 3.5 B, *rechts*). Somit führt KMDA zu einer deutlichen Reduzierung der induzierten PKD-Aktivität in diesen Zellen.

In TPA-stimulierten KMDA-infizierten Zellen beträgt die Zunahme der PKD-Aktivität 60 % gegenüber der Aktivitätserhöhung von PKD in den Kontrollzellen. (Abb. 3.5 B, *links*).

Im Falle von PDGF-induzierter PKD-Aktivität wird ein Effekt von KMDA sogar auf die Basalaktivität beobachtet, die in ihrer Gegenwart um 50 % supprimiert wird (Daten nicht gezeigt).

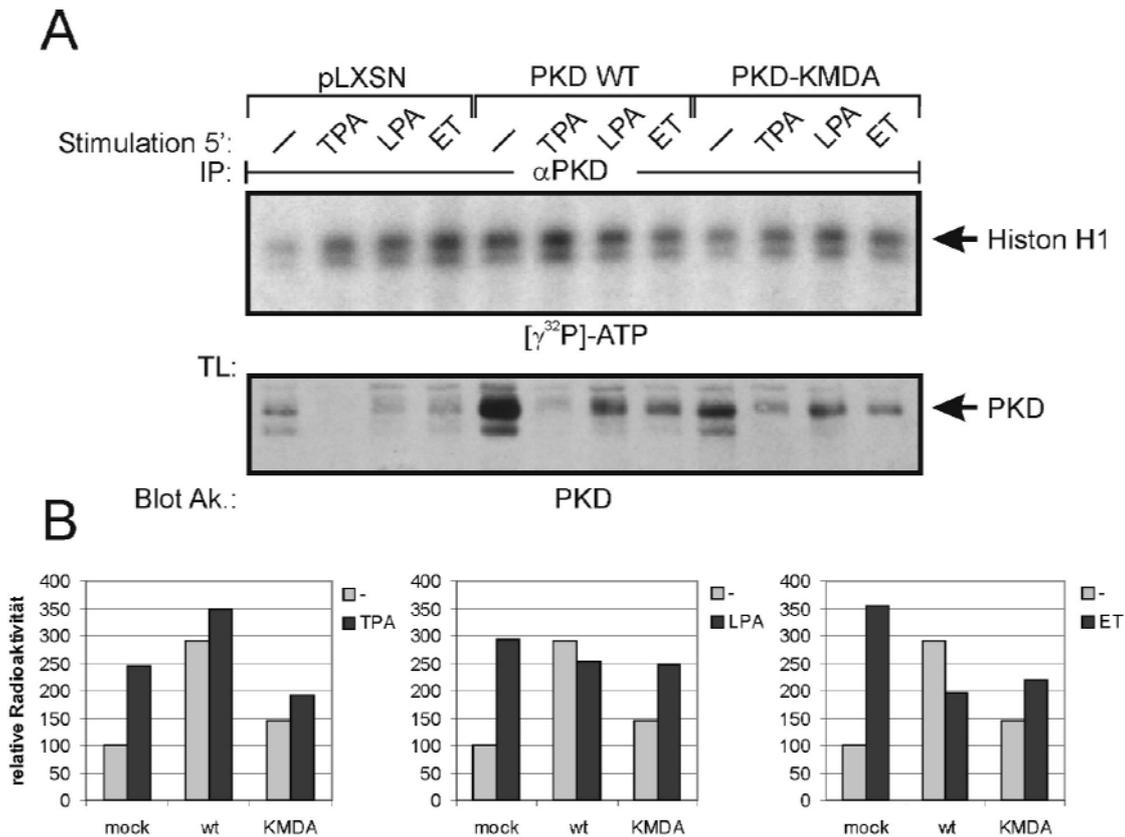


Abb. 3.5: Wirkung der dominant-negativen PKD-Mutante KMDA auf die induzierte Aktivität der endogenen PKD in Rat1-Zellen. Rat1-Fibroblasten wurden durch retroviralen Gentransfer mit PKD, der PKD-KMDA-Mutante oder dem Leervektor transient infiziert, serumgehungert und mit TPA, LPA oder Endothelin 5 min stimuliert. Nach der Zellyse wurde PKD mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD Sugan) immunpräzipitiert, und ihre Aktivität in einem *in vitro* Kinaseassay mit Histon H1 als Substrat quantifiziert. Nach Auftrennung der Immunkomplexe mittels einer 12,5 %igen SDS-PAGE wurde phosphoryliertes Histon H1 in einem Autoradiogramm analysiert (A, oben), und die relative Radioaktivität in einem Diagramm dargestellt (B). Als Expressionskontrolle der verschiedenen PKD-Mutanten wurden die Totallysate gegen PKD mit dem polyklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD D20) immun-detektiert (A, unten). Abk.: wt: Wildtyp; KMDA: K612M/D727A; ET: Endothelin.

Die Expressionskontrolle der Totallysate von den Rat1-Zellen fällt vor allem durch unregelmäßige Signalintensitäten für PKD auf (Abb. 3.5 A, unten). Was nach scheinbar ungleichen Proteingehalten der Proben aussieht, hat seine Ursache in einer Unfähigkeit der verwendeten Anti-PKD-Antikörper, phosphorylierte PKD zu erkennen. So muss das Verhältnis zwischen wt- und KMDA-Expression in Rat1-Zellen anhand der unstimulierten Proben bestimmt werden (Spuren 1, 5 und 9), woraus hervorgeht, dass KMDA in Rat1-Zellen deutlich über endogenem Expressionsniveau, jedoch unter dem von PKD-wt liegt. Desweiteren eignet sich der α -PKD-Antikörper in dieser Zelllinie als Werkzeug, um anhand der Signalintensität innerhalb identisch infizierter Zellen Schlüsse über den Phosphorylierungszustand von PKD zu ziehen. So steigt jeweils in den mit den verschiedenen Konstrukten infizierten Zellen der Phosphorylierungsgrad von PKD in der Reihe LPA, Endothelin und TPA an.

3.1.3 Suppression der EGF Rezeptor-Threoninphosphorylierung in Gegenwart der PKD-Mutante KMDA

Nachdem die dominant-negative Wirkung der KMDA-Mutante untersucht wurde, sollte der Effekt von PKD auf die Threoninphosphorylierung des EGF Rezeptors überprüft werden. Gemäß früheren Ergebnissen, bei denen eine EGF Rezeptortransmodulation durch TPA und PDGF beobachtet wurde, wird hier eine Zunahme der Threoninphosphorylierung des EGF Rezeptors in Gegenwart aktivierter PKD erwartet. Diese Zunahme sollte durch Anwesenheit der dominant-negativen Mutante von PKD vermindert oder aufgehoben werden.

HEK 293-Zellen wurden mit der Kalziumphosphat-Methode transient mit den Konstrukten für PKD-wt, PKD-KMDA oder dem Leervektor pRK5 transfiziert und mit dem Phorbolster TPA stimuliert. Anschließend wurde der EGF Rezeptor immunpräzipitiert, und das Ausmaß der Threoninphosphorylierung durch Immundetektion ermittelt.

In Gegenwart von PKD-wt ist eine starke basale Threoninphosphorylierung zu erkennen, die durch Stimulation mit TPA verstärkt wird (Abb. 3.6 A, *oben*, Spuren 3 und 4). Im Vergleich dazu weist der EGF Rezeptor in Abwesenheit transfizierter PKD eine schwache Threoninphosphorylierung auf (Spuren 1 und 2). Auch in der Immundetektion mit dem α -EGFR-Antikörper ist dieser Unterschied deutlich durch ein verlangsamtes Laufverhalten der oberen EGF Rezeptor-Bande zu erkennen, wodurch das Signal über eine größere Strecke verteilt ist (Abb. 3.6 A, *2.v.unten*, Spuren 3 und 4). In Gegenwart der KMDA-Mutante fällt eine höhere basale Threoninphosphorylierung des EGF Rezeptors auf, die jedoch nach Aktivierung mit TPA stark erniedrigt wird (Abb. 3.6 A, *oben*, Spuren 5 und 6). Die Immundetektion mit dem α -EGFR-Antikörper zeigt immer noch ein gestrecktes Signal im Vergleich zu dem der Kontrollzellen auf, jedoch konzentriert sich die Verteilung der Intensität auf den Bereich der unteren Bande (Abb. 3.6 A, *2.v.unten*, Spuren 5 und 6).

Interessanterweise wird bei diesem Experiment in HEK 293-Zellen die Kopräzipitation von transfizierter PKD mit dem EGF Rezeptor beobachtet (Abb. 3.6 A, *2.v.oben*). Das Ausmaß dieser Bindung erhöht sich ebenfalls, wenn PKD-wt mit TPA stimuliert wird (Spur 4).

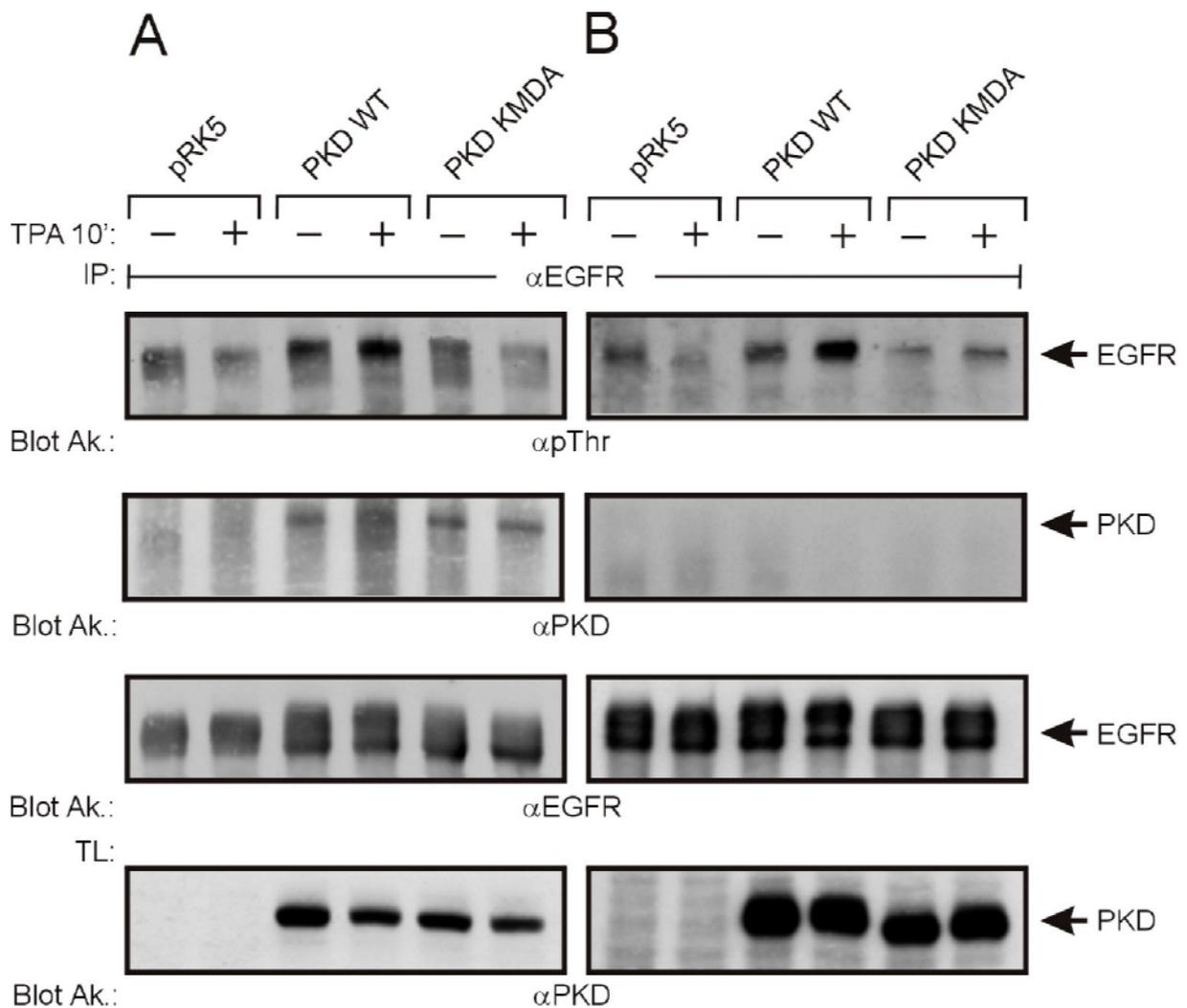


Abb. 3.6: Suppression der EGF Rezeptor-Threoninphosphorylierung in Gegenwart der PKD-Mutante KMDA in HEK 293- und Cos7-Zellen. Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293) (A) oder Cos7-Zellen (B) wurden transient mit den Konstrukten für PKD, PKD-KMDA oder dem Leervektor transfiziert, serumgehungert und mit TPA 10 min stimuliert. Nach der Zellyse wurde der EGF Rezeptor mit dem monoklonalen Anti-EGFR-Antikörper (α -EGFR 108.1) immunpräzipitiert, und die Proteine wurden mittels einer 7,5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit dem polyklonalem Anti-Phosphothreonin-Antikörper (α -pThr NEB) (*oben*) und mit dem polyklonalem Anti-PKD-Antikörper (α -PKD D20) (*2.v.oben*). Nach Entfernen des α -pThr-Antikörpers von der Membran wurde zur Kontrolle mit dem polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper (α -EGFR Ubi sheep) immundetektiert (*2.v.unten*), außerdem die Expression von PKD-wt und KMDA in den Totallysaten mit dem polyklonalem Anti-PKD-Antikörper (α -PKD D20) geprüft (*unten*).

In Cos7-Zellen, die mit der Lipofectamine[®]-Methode transient mit PKD-wt und der PKD-KMDA-Mutante transfiziert wurden, zeichnet sich der Effekt von PKD auf die EGF Rezeptor-Threoninphosphorylierung noch deutlicher ab als in HEK 293-Zellen. So wird hier ebenfalls eine starke Zunahme der Threoninphosphorylierung beobachtet, welche durch Stimulation mit TPA zusätzlich erhöht wird (Abb. 3.6 B, *oben*, Spuren 3 und 4). Ebenso ist ein verlangsamtes Laufverhalten der oberen EGF Rezeptor-Bande in Gegenwart von PKD-wt zu sehen (Abb. 3.6 B,

2.v.unten, Spuren 3 und 4). In Anwesenheit der KMDA-Mutante wird dieser PKD-Effekt nicht beobachtet (Spuren 5 und 6).

Allerdings kopräzipitiert PKD in diesen Zellen nicht mit dem EGF Rezeptor, im Gegensatz zu den HEK 293-Zellen (Abb. 3.6 B, 2.v.oben).

Auch in Rat1-Zellen, die transient mit den pLXSN-Konstrukten für PKD-wt und die KMDA-Mutante infiziert wurden, wurde dieser PKD-Effekt untersucht.

Hier lassen sich ebenfalls Phosphothreonin-Signale des EGF Rezeptors in Anwesenheit von PKD-wt erkennen, die von der KMDA-Mutante nicht vermittelt werden (Abb. 3.7, oben).

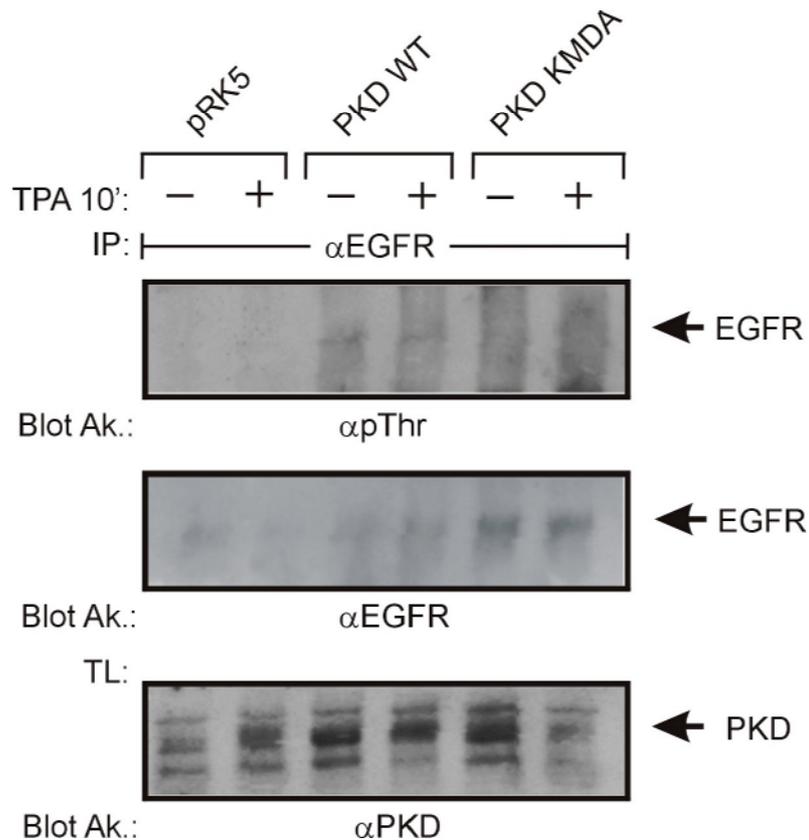


Abb. 3.7: Suppression der EGF Rezeptor-Threoninphosphorylierung in Gegenwart der PKD-Mutante KMDA in Rat1-Zellen. Rat1-Fibroblasten wurden durch retroviralen Gentransfer mit PKD, der PKD-KMDA-Mutante oder dem pLXSN-Leervektor transient infiziert, serumgehungert und mit TPA 10 min stimuliert. Nach der Zellyse wurde der EGF Rezeptor mit dem monoklonalen Anti-EGFR-Antikörper (α -EGFR 108.1) immunpräzipitiert, und die Proteine wurden mittels einer 7,5 %igen SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit dem polyklonalem Anti-Phosphothreonin-Antikörper (α -pThr NEB) (*oben*). Nach Entfernen des α -pThr-Antikörpers von der Membran wurde zur Kontrolle mit dem polyklonalem Anti-EGFR-Antikörper (α -EGFR Ubi sheep) immundetektiert (*Mitte*), außerdem die Expression des PKD-wt und KMDA in den Totallysaten mit dem polyklonalem Anti-PKD-Antikörper (α -PKD D20) geprüft (*unten*).

Diese Experimente bestätigen eine TPA-induzierte Transmodulation des EGF Rezeptors, die PKD-abhängig ist. Diese Abhängigkeit wurde durch die Verwendung der dominant-negativen Mutante eindeutig gezeigt.

3.1.4 Effekt von PKD auf die EGF-induzierte JNK-Aktivierung

Nachdem durch Anwendung einer dominant-negativen PKD-Mutante die Rolle der PKD für die Threoninphosphorylierung des EGF Rezeptors untermauert wurde, war nun die Relevanz von PKD für die Regulation des JNK-Signalweges von Interesse. Darüber hinaus sollte untersucht werden, inwieweit die Aktionen von GPCRn mit PKD und ihrem Effekt auf JNK verknüpft sind. Falls aktivierte PKD einen negativ regulierenden Effekt auf die EGF-induzierte JNK-Aktivierung haben sollte, müsste bei Kostimulation von EGF mit einem PKD-induzierenden Liganden eine Suppression der JNK-Aktivität beobachtet werden. Diese Unterdrückung sollte in Gegenwart der dominant-negativen PKD-KMDA-Mutante gemindert oder aufgehoben werden.

3.1.4.1 Inhibition des JNK-Signalweges durch PDGF-induzierte PKD in Rat1-Zellen

Rat1-Zellen wurden mit den pLXSN-Konstrukten für PKD-wt, PKD-KMDA oder dem Leervektor retroviral infiziert. Nach 24 h Kultivierung in serumfreiem Medium folgte eine 15-minütige Stimulation der Zellen durch EGF. Diese im Vergleich zu obigen Experimenten längere Stimulationszeit leitet sich aus früheren Experimenten ab, in denen die zeitlichen Aktivierungsverläufe von ERK und JNK durch EGF untersucht wurden. Während ERK schon nach 5 min seine maximale Aktivität erreicht hatte, erreichte JNK sein Maximum erst nach 15 min (Bagowski, 1998). Die Zellen wurden außerdem zur Induzierung von PKD mit PDGF allein oder mit EGF und PDGF kostimuliert, und als Kontrolle für die Induzierung der JNK-Aktivität wurden mock-infizierte Zellen mit Sorbitol stimuliert, welches JNK durch Osmoseschock aktiviert. Danach wurde JNK aus den Zellysaten immunpräzipitiert und einem JNK-Kinaseassay unterworfen, in dem ein GST-Fusionsprotein mit den ersten 79 Aminosäuren des Transkriptionsfaktors c-Jun als Substrat für JNK verwendet wurde.

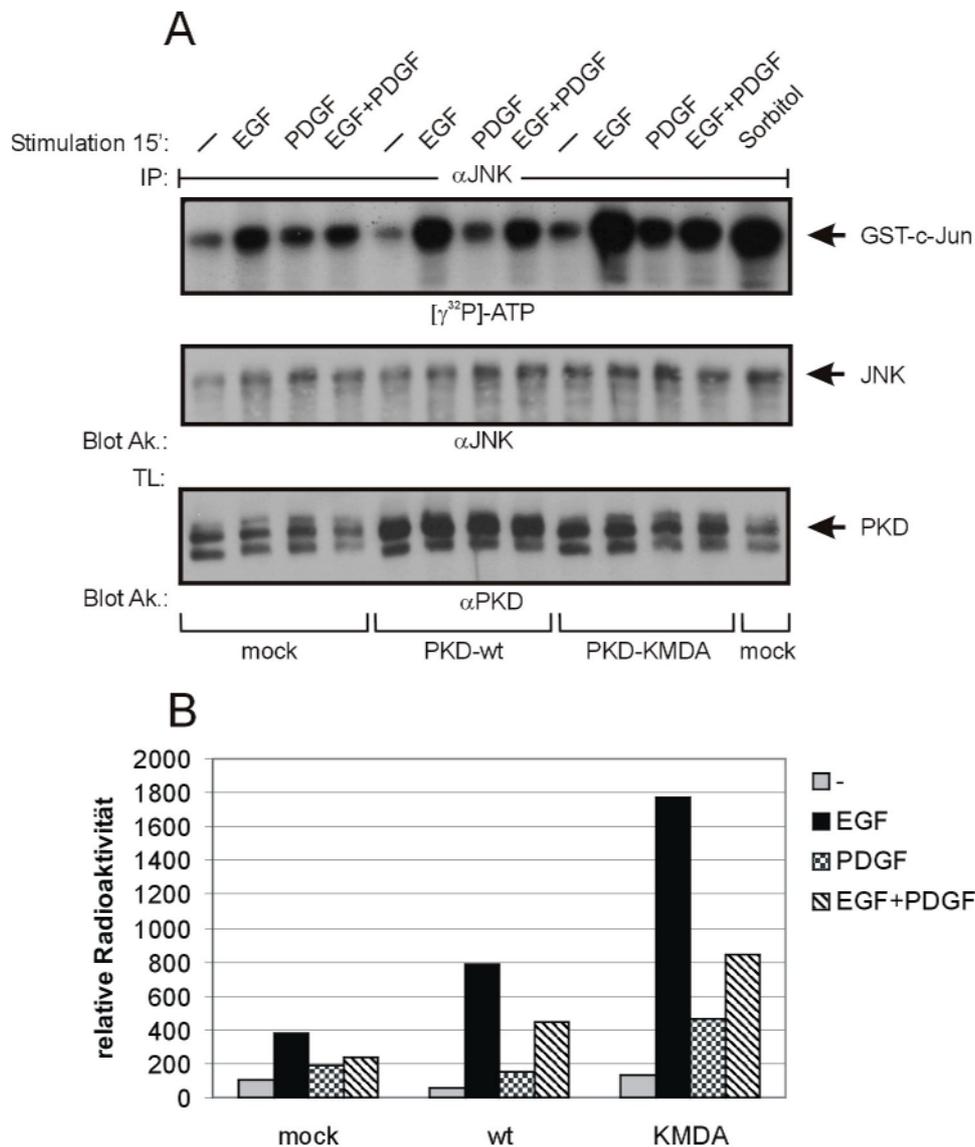


Abb. 3.8: Inhibition des JNK-Signalweges durch PDGF-induzierte PKD in Rat1-Zellen. Rat1-Fibroblasten wurden durch retroviralen Gentransfer mit PKD, der PKD-KMDA-Mutante oder dem Leervektor transient infiziert, serumgehungert, und mit EGF oder PDGF einzeln oder beiden Liganden für 15 min kostimuliert. Mock-infizierte Kontrollzellen wurden 15 min mit Sorbitol stimuliert. Nach der Zellyse wurde JNK mit dem polyklonalen Anti-JNK-Antikörper (α -JNK C17) immunpräzipitiert, und seine Aktivität in einem *in vitro* Kinaseassay mit GST-c-Jun als Substrat quantifiziert. Nach Auftrennung der Immunkomplexe mittels einer 12,5 %igen SDS-PAGE wurde phosphoryliertes GST-c-Jun in einem Autoradiogramm analysiert (A, oben), und die relative Radioaktivität in einem Diagramm dargestellt (B). Nach Abklingen der Radioaktivität wurde zur Kontrolle mit dem polyklonalen Anti-JNK-Antikörper (α -JNK C17) immundetektiert (A, mitte). Als Expressionskontrolle der verschiedenen PKD-Mutanten in den Totallysaten wurden sie mit dem polyklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD D20) immundetektiert (A, unten).

Die Auswertung der Signale (Abb. 3.8 A, oben; Abb. 3.8 B) zeigt eine deutliche Aktivierung von JNK durch EGF (Spur 2) und eine wesentlich schwächere durch PDGF (Spur 3), die jedoch höher ist als die Basalaktivität. Diese JNK-Aktivierung steht im Einklang mit der früheren Beobachtung, dass bei gleichzeitiger Stimulation von PKD durch PDGF auch JNK stimuliert werden

kann, was umso stärker zum Tragen kommt, je geringer der inhibitorische Einfluss von PKD ist (Bagowski, 1998).

Kostimulation mit EGF und PDGF führt zu einem Ausmaß der c-Jun-Phosphorylierung, das schwächer ist als nach alleiniger Stimulation mit EGF, jedoch stärker als nach Stimulation mit PDGF (Spur 4). Daraus wird ersichtlich, dass die EGF-induzierte JNK-Aktivität durch Stimulation mit PDGF supprimiert wird.

In Zellen, die mit PKD-wt infiziert wurden, ist sowohl die Basalaktivität von JNK als auch die Aktivität von JNK nach Stimulation mit PDGF erniedrigt gegenüber dieser Aktivitäten in den Zellen mit endogener PKD; ein Effekt, der sich auf die Überexpression der inhibitorisch wirkenden PKD zurückführen lässt. Jedoch ist die EGF-induzierte JNK-Aktivität höher als in Anwesenheit der endogenen PKD, ebenso nach Kostimulation mit beiden Wachstumsfaktoren. Trotzdem liegt in diesen Zellen immer noch eine deutliche Suppression der EGF-induzierten JNK-Aktivierung durch PDGF vor (Spuren 5-8).

Sehr deutlich zu beobachten ist der Effekt, den die Überexpression der dominant-negativen KMDA-Mutante auf JNK ausübt. Schon die Basalaktivität von JNK ist höher, dadurch dass die endogene PKD-Basalaktivität unterdrückt wird. Am auffälligsten wirkt sich die fehlende Suppression von PKD auf die EGF-induzierte JNK-Aktivität aus, die mehr als doppelt so hoch ist wie in Zellen, die mit PKD-wt infiziert wurden. Ebenso deutlich erhöht, im Vergleich zu wt- oder mock-infizierten Zellen ist die PDGF-induzierte JNK-Aktivität und die bei Kostimulation mit beiden Liganden (Spuren 9-12). Dennoch wird die EGF-induzierte JNK-Aktivierung durch PDGF immer noch erniedrigt, was für eine Restaktivität der endogenen PKD sprechen könnte. Jedoch sieht man bereits an der Stärke der Signale in KMDA-infizierten Zellen, dass der Einfluss von PKD auf JNK durch die dominant-negative Mutante stark vermindert wird.

3.1.4.2 Inhibition des JNK-Signalweges durch Endothelin-induzierte PKD in Rat1-Zellen

Um eine mögliche Verbindung zwischen der Wirkung von GPCRn auf PKD und deren Einfluss auf den JNK-Signalweg zu untersuchen, wurde dieses Experiment unter identischen Bedingungen wie das vorherige mit Endothelin anstelle von PDGF durchgeführt.

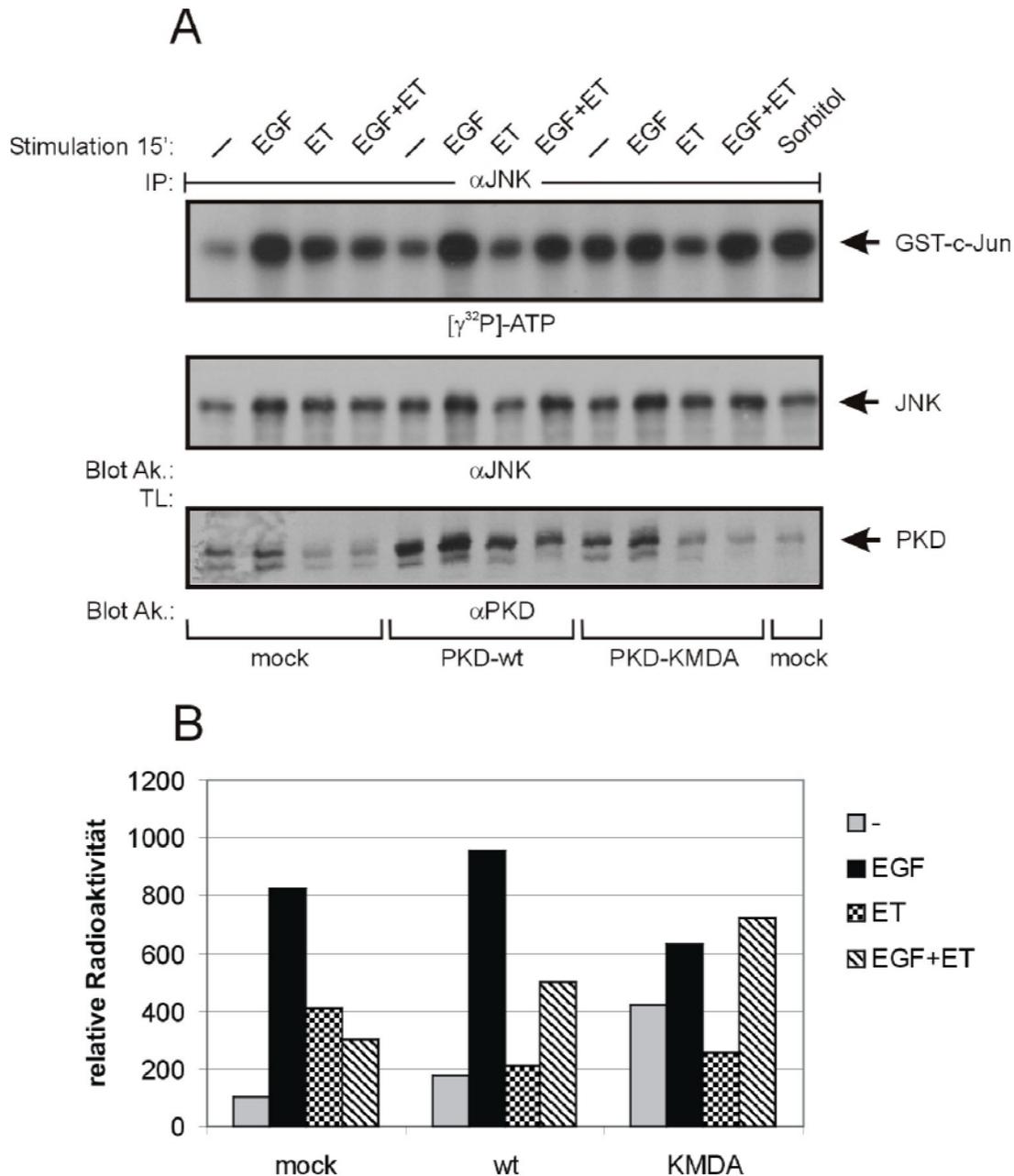


Abb. 3.9: Inhibition des JNK-Signalweges durch Endothelin-induzierte PKD in Rat1-Zellen. Rat1-Fibroblasten wurden durch retroviralen Gentransfer mit PKD, der PKD-KMDA-Mutante oder dem Leervektor transient infiziert, serumgehungert, und mit EGF oder Endothelin einzeln oder beiden Liganden für 15 min kostimuliert. Mock-infizierte Kontrollzellen wurden 15 min mit Sorbitol stimuliert. Nach der Zellyse wurde JNK mit dem polyklonalen Anti-JNK-Antikörper (α -JNK C17) immunpräzipitiert, und seine Aktivität in einem *in vitro* Kinaseassay mit GST-c-Jun als Substrat quantifiziert. Nach Auftrennung der Immunkomplexe mittels einer 12,5 %igen SDS-PAGE wurde phosphoryliertes GST-c-Jun in einem Autoradiogramm analysiert (A, oben), und die relative Radioaktivität in einem Diagramm dargestellt (B). Nach Abklingen der Radioaktivität wurde zur Kontrolle mit dem polyklonalen Anti-JNK-Antikörper (α -JNK C17) immundetektiert (A, mitte). Als Expressionskontrolle der verschiedenen PKD-Mutanten in den Totallysaten wurden sie mit dem polyklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD D20) immundetektiert (A, unten).

Ebenso wie PDGF ist auch Endothelin in der Lage, JNK zu aktivieren (Abb. 3.9 A, *oben*; Abb. 3.9 B). Kostimulation von EGF mit Endothelin führt sogar relativ gesehen zu einer stärkeren Suppression als mit PDGF, da die JNK-Aktivität noch schwächer erscheint als nach der Stimulation mit Endothelin allein (Spuren 1-4).

In PKD-wt-infizierten Zellen hingegen ist EGF-induzierte JNK immer noch durch Kostimulation mit Endothelin supprimiert, jedoch ist Endothelin allein nicht mehr in der Lage, JNK zu aktivieren, was auf die Überexpression von PKD zurückzuführen ist (Spuren 5-8).

KMDA-infizierte Zellen zeigen eine deutlich erhöhte Basalaktivität von JNK. Entsprechend ist die Suppression der EGF-induzierten JNK-Aktivität durch Endothelin vollständig aufgehoben. Hingegen steigt die Aktivität von JNK nach alleiniger Endothelin-Stimulation im Vergleich zu der in wt- oder mock-infizierten Zellen nicht an (Spuren 9-12).

In der Expressionskontrolle der infizierten Konstrukte in den Totallysaten macht sich die unter 3.1.2.3 schon erwähnte Unfähigkeit des α -PKD-Antikörpers bemerkbar, phosphorylierte PKD zu erkennen, die zu schwächeren PKD-Signalen führt, wann immer mit Endothelin stimuliert wird (Abb. 3.9 A, *unten*). Dieses Phänomen ist nach Stimulation mit PDGF nicht in diesem Ausmaß erkennbar. Dies spricht für eine effizientere Aktivierung von PKD durch Endothelin als durch PDGF in Rat1-Zellen. Darüber hinaus erkennt man aus dem Vergleich der Signale aus Proben, die nicht mit Endothelin stimuliert wurden, dass KMDA eine vergleichbar hohe Expression wie der Wildtyp zeigt.

3.1.4.3 Wirkung der LPA-induzierten PKD auf den JNK-Signalweg in Rat1-Zellen

Weitere Untersuchungen des inhibitorischen Effekts von PKD auf den JNK-Signalweg wurden mit LPA durchgeführt, einem Liganden für mehrere GPCRn, durch die alternative Signalwege aktiviert werden. Im Gegensatz zu Endothelin und anderen bereits erwähnten Liganden, deren Rezeptoren an G_q -Proteine gekoppelt sind, hat LPA die Möglichkeit, über verschiedene G-Proteine, z.B. G_i , zu agieren (Paolucci *et al.*, 2000). Deshalb ist es interessant zu sehen, ob es ebenso wie Endothelin in der Lage ist, den suppressiven PKD-Effekt auf JNK zu vermitteln.

Die Rat1-Zellen wurden erneut, wie oben beschrieben, infiziert und nach demselben Muster stimuliert, und der JNK-Kinaseassay angeschlossen.

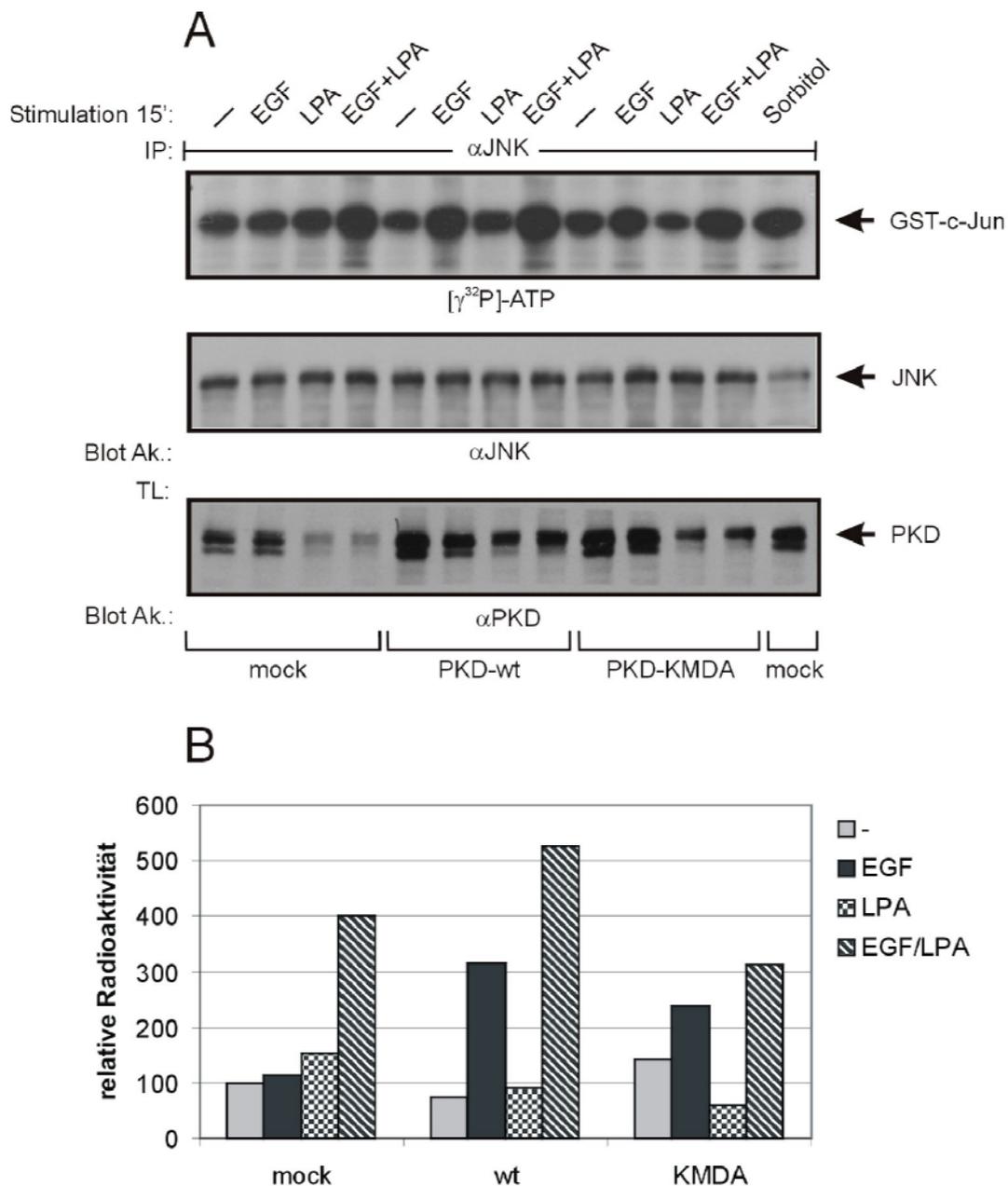


Abb. 3.10: Effekt der LPA-induzierte PKD auf den JNK-Signalweg in Rat1-Zellen. Rat1-Fibroblasten wurden durch retroviralen Gentransfer mit PKD, der PKD-KMDA-Mutante oder dem Leervektor transient infiziert, serumgehungert, und mit EGF oder LPA einzeln oder beiden Liganden für 15 min kostimuliert. Mock-infizierte Kontrollzellen wurden 15 min mit Sorbitol stimuliert. Nach der Zellyse wurde JNK mit dem polyklonalen Anti-JNK-Antikörper (α -JNK C17) immunpräzipitiert, und seine Aktivität in einem *in vitro* Kinaseassay mit GST-c-Jun als Substrat quantifiziert. Nach Auftrennung der Immunkomplexe mittels einer 12,5 %igen SDS-PAGE wurde phosphoryliertes GST-c-Jun in einem Autoradiogramm analysiert (**A, oben**), und die relative Radioaktivität in einem Diagramm dargestellt (**B**). Nach Abklingen der Radioaktivität wurde zur Kontrolle mit dem polyklonalen Anti-JNK-Antikörper (α -JNK C17) immundetektiert (**A, mitte**). Als Expressionskontrolle der verschiedenen PKD-Mutanten in den Totallysaten wurden sie mit dem polyklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD D20) immundetektiert (**A, unten**).

Wie in den vorigen Experimenten wird eine EGF-induzierte JNK-Aktivierung sowohl in Gegenwart von infiziertem PKD-wt (Abb. 3.10 A, *oben*, Abb. 3.10 B, Spur 6) als auch der KMDA-Mutante (Spur 10) beobachtet. In Zellen mit infiziertem PKD-wt wird darüber hinaus bei Kostimulation mit EGF und LPA eine deutliche Erhöhung der EGF-induzierten JNK-Aktivität verzeichnet (Spur 8), obwohl LPA allein keine Aktivierung von JNK bewirkt (Spur 7). In Gegenwart von PKD-KMDA jedoch wird die EGF-induzierte JNK-Aktivität durch LPA kaum gesteigert (Spur 12).

Dies spricht für einen alternativen Aktivierungsmechanismus von PKD durch LPA, der nicht, wie PDGF oder Endothelin, zur Suppression EGF-induzierter JNK-Aktivität führt. Stattdessen erfolgt eine PKD-abhängige Stimulierung der EGF-induzierten JNK-Aktivierung durch LPA.

So wird deutlich, dass Endothelin und LPA, obwohl sie beide PKD in Rat1-Zellen im gleichem Maß aktivieren, über PKD unterschiedliche Auswirkungen auf intrazelluläre Signalwege haben.

3.2 Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptors durch den PDGF Rezeptor

Neben der gesteigerten Serin-/Threoninphosphorylierung des EGF Rezeptors ist die PDGF- oder Phorbolster-vermittelte EGF Rezeptortransmodulation durch zwei weitere Ereignisse charakterisiert: Die Inhibition der EGF-Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne des Rezeptors und die Verminderung der EGF-induzierten Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptors (Friedman *et al.*, 1984; Hunter *et al.*, 1984).

Im Gegensatz zu diesem Modell wurde letztere Eigenschaft durch (Bagowski, 1998) widerlegt, der in Rat1-Zellen keine Verminderung der EGF-induzierten EGF Rezeptor-Tyrosinphosphorylierung feststellte.

In dieser Arbeit wurden folgende Experimente durchgeführt, um diese widersprüchlichen Ergebnisse zu untersuchen.

Rat1-Zellen wurden, nachdem sie mit dem PKC-Inhibitor GF 109203X (GF) vorbehandelt worden waren, mit EGF, PDGF oder TPA einzeln stimuliert oder mit PDGF oder TPA in Kombination mit EGF kostimuliert. Anschließend wurde der EGF Rezeptor aus den Zellysaten immunpräzipitiert, und seine Tyrosinphosphorylierung immundetektiert.

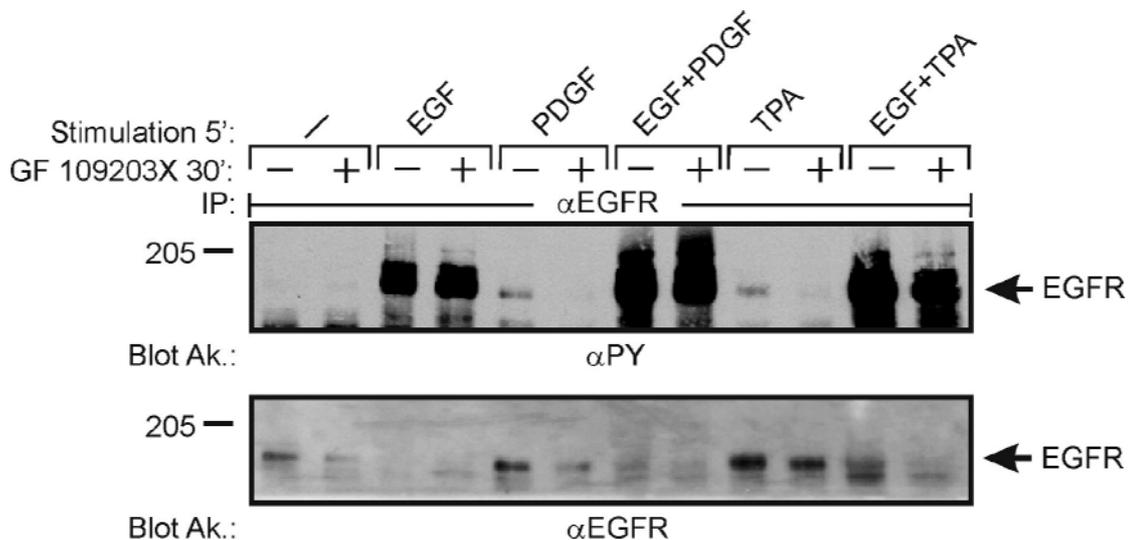


Abb. 3.11: Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptors durch PDGF oder TPA in Rat1-Zellen. In serumfreiem Medium kultivierte Rat1-Fibroblasten wurden 30 min mit GF 109203X (GF) vorbehandelt und weitere 5 min mit EGF, PDGF oder TPA einzeln stimuliert oder mit PDGF oder TPA in Kombination mit EGF kostimuliert. Nach der Zellyse wurde der EGF Rezeptor mit dem polyklonalen Anti-EGF Rezeptor-Antikörper (α -EGFR 1005) immunpräzipitiert, und die Proteine wurden mittels 7,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (α -PY 4G10) (*oben*). Nach Entfernen des α -PY-Antikörpers von der Membran wurde mit dem polyklonalen Anti-EGFR-Antikörper (α -EGFR Ubi sheep) (*unten*) immundetektiert.

Es ist deutlich zu erkennen, dass weder PDGF noch TPA die EGF-induzierte Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptors vermindern (Abb. 3.11, *oben*, Spuren 3, 4, 7, 8, 11 und 12). Zusätzlich erkennt man eine schwache Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors nach alleiniger Stimulation sowohl mit PDGF (Spur 5) als auch mit TPA (Spur 9), die man in GF-behandelten Zellen nicht beobachtet (Spuren 6 und 10). Somit scheinen die verwendeten Liganden eine PKC-abhängige Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptors zu bewirken.

Die Identität dieser beobachteten Bande wurde durch die Immundetektion mit dem α -EGFR-Antikörper verifiziert (Abb. 3.11, *unten*). Auch bei diesem Antikörper fällt auf, dass er in Rat1-Zellen die tyrosinphosphorylierte Form seines Zielproteins nicht erkennt.

Um zu untersuchen, ob es sich hier um einen Effekt handelt, der nur in Rat1-Zellen zu beobachten ist, wurde das Experiment analog in 3T3 L1-Zellen durchgeführt. Hierbei wurden sowohl Fibroblasten als auch Adipozyten eingesetzt. Im Falle der Fibroblasten wurde das Experiment zusätzlich mit dem PDGFR-Inhibitor AG 1296 anstatt mit GF durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen nach demselben Schema wie im vorigen Experiment stimuliert, der EGF Rezeptor immunpräzipitiert, und seine Tyrosinphosphorylierung immundetektiert.

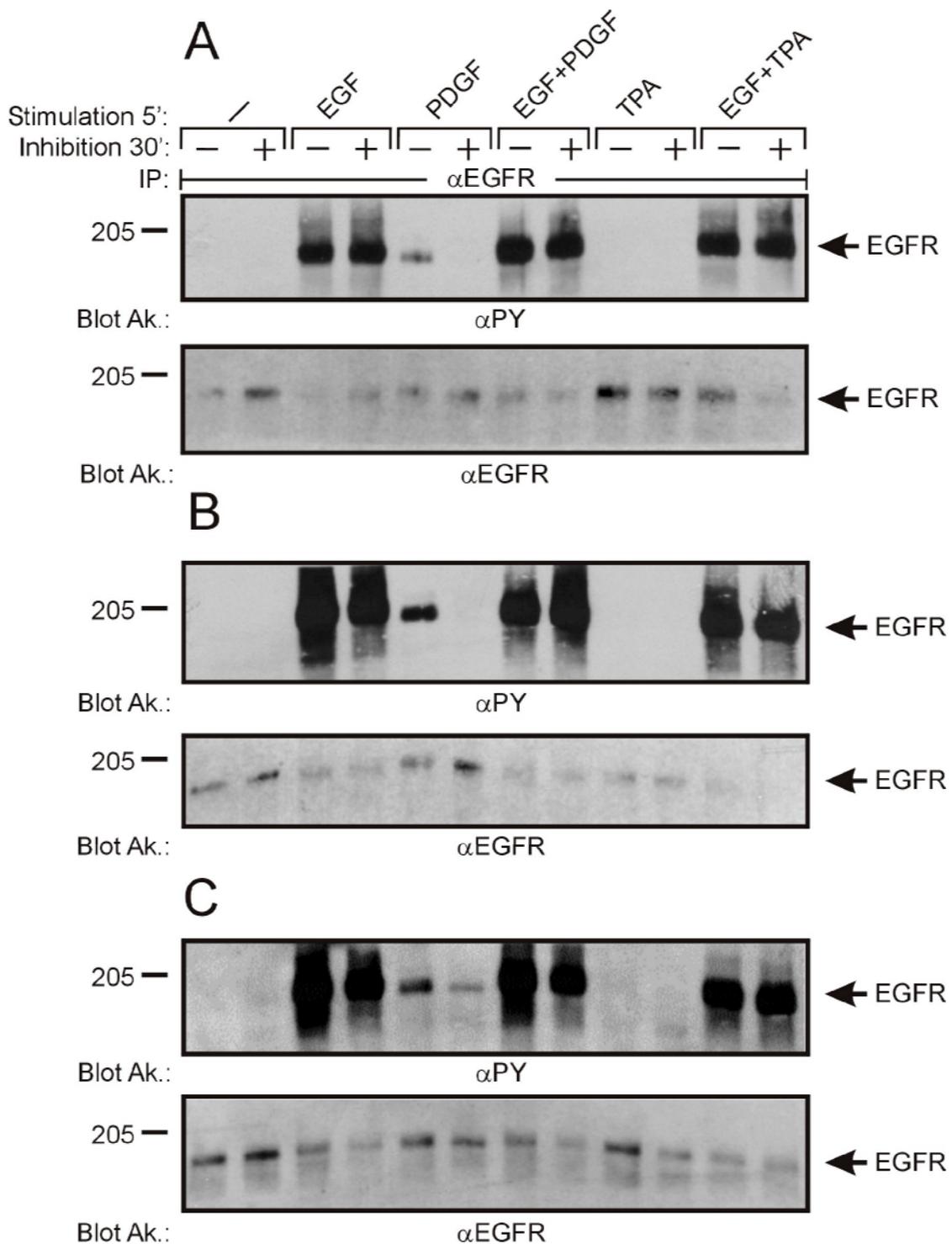


Abb. 3.12: Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptors durch PDGF in 3T3 L1-Fibroblasten und -Adipozyten. In serumfreiem Medium kultivierte 3T3 L1-Fibroblasten (A, B) oder -Adipozyten (C) wurden 30 min mit GF 109203X (A, C) oder AG 1296 (B) vorbehandelt und weitere 5 min mit EGF, PDGF oder TPA einzeln stimuliert oder mit PDGF oder TPA in Kombination mit EGF kostimuliert. Nach der Zellyse wurde der EGF Rezeptor mit dem polyklonalen Anti-EGF Rezeptor-Antikörper (α -EGFR 1005) immunpräzipitiert, und die Proteine wurden mittels 7,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (α -PY 4G10) (A, B, C, oben). Nach Entfernen des α -PY-Antikörpers von der Membran wurde mit dem polyklonalen Anti-EGFR-Antikörper (α -EGFR Ubi sheep) immundetektiert (A, B, C, unten).

Hier wird ebenfalls, wie in Rat1-Zellen, beobachtet, dass die Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptors weder durch PDGF noch durch TPA vermindert wird (Abb. 3.12, A, B und C, *oben*, Spuren 3, 4, 7, 8, 11 und 12). Zudem erscheint auch hier eine deutliche Tyrosinphosphorylierung nach PDGF-Stimulation sowohl in Fibroblasten (Abb. 3.12, A und B, *oben*, Spur 5) als auch in Adipozyten (Abb. 3.12, C, *oben*, Spur 5), die durch beide Inhibitoren unterdrückt wird (Abb. 3.12, A und B, *oben*, Spur 6).

Die Identität dieser Bande wurde durch die Immundetektion mit dem α -EGFR-Antikörper verifiziert (Abb. 3.12, A, B und C, *unten*). Auch hier fällt auf, dass der verwendete Antikörper sein Zielprotein im tyrosinphosphorylierten Zustand schlechter erkennt.

Im Unterschied zu Rat1-Zellen ist die Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptors nach alleiniger Stimulation mit TPA nicht zu beobachten (Spur 9), obwohl sie PKC-abhängig ist. Da die Aktivierung der verantwortlichen PKC-Isoform bzw. Isoformen durch TPA nicht bewirkt werden kann, lässt sich auf die Involvierung von TPA-unabhängigen PKCs in dem Mechanismus der PDGF-vermittelten Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptors schließen.

Diese Ergebnisse und die von Abschnitt 3.1.3 zeigen, dass in Rat1-Zellen sowohl PKC-vermittelte Threoninphosphorylierung als auch PKC-vermittelte Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptors zur selben Zeit stattfinden. Dies beobachtet man gleichermaßen nach Stimulation mit PDGF oder mit TPA.

Hingegen tritt in 3T3 L1-Zellen die Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptors nur nach Stimulation mit PDGF, jedoch nicht mit TPA auf.

Damit kann auf eine Transaktivierung des EGF Rezeptors nach Aktivierung des PDGF Rezeptors geschlossen werden, die darüber hinaus in Rat1-Zellen alternativ durch rezeptorunabhängige PKC-Aktivierung durch Phorbolster induziert werden kann, und so die Zelltypspezifische Beteiligung verschiedener PKC-Isoformen bei diesem Prozess nahelegt.

Die Beobachtungen der EGF Rezeptor-Transaktivierung durch den PDGF Rezeptor wurden kurze Zeit später in zwei Publikationen anderer Arbeitsgruppen bestätigt, die ebenfalls einen derartigen Mechanismus beschrieben. So wurde in B82L-Fibroblasten gezeigt, dass eine Transaktivierung des EGF Rezeptors durch den PDGF Rezeptor stattfindet, und diese Wechselwirkung essentiell für die Zellmotilität ist (Li *et al.*, 2000). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte darüber hinaus, dass die Heterodimerisierung des PDGF Rezeptors mit dem EGF Rezeptor essentiell für die Transaktivierung des EGF Rezeptors ist (Saito *et al.*, 2001).

3.3 Assoziation von PKD mit dem PDGF Rezeptor und seinen Substraten

Nachdem die Relevanz von PKD für die PKC-vermittelte EGF Rezeptortransmodulation untermauert wurde (Abschnitt 3.1), sollte der Aktivierungsmechanismus für PKD genauer untersucht werden. PKD wird offensichtlich in der Regel durch Wachstumsfaktoren, sowie Liganden für GPCRN über PKC-abhängige Signalwege aktiviert. Dies geschieht jeweils über die Phosphoinositidkaskade, wobei stets PLCs mit im Spiel sind. Dass PKD mit PLC γ und Syk in B-Zellen interagiert (Sidorenko *et al.*, 1996), ist für diese Arbeit von Interesse, da PLC γ ein direktes Substrat des PDGF Rezeptors ist (Zugaza *et al.*, 1996).

Um mehr über den Mechanismus der RTK-abhängigen PKD-Aktivierung und der beteiligten Bindungspartner zu erfahren, wurden ihre Interaktionen mit anderen tyrosinphosphorylierten Proteinen untersucht.

3.3.1 Interaktion von PKD mit tyrosinphosphorylierten Proteinen in verschiedenen Mausfibroblasten-Zelllinien

Um physiologische Relevanz im Falle einer Assoziation zu gewährleisten, wurde die Detektion von PKD-Bindungspartnern als erstes in endogenen Systemen vorgenommen, die PKD exprimieren, wie in Maus- oder Rattenfibroblasten.

3T3 L1-Mausfibroblasten wurden mit EGF, PDGF oder TPA einzeln stimuliert oder mit PDGF oder TPA in Kombination mit EGF kostimuliert. Dabei wurde mit dem PKC-Inhibitor GF 109203X inhibiert, um die PKC-Abhängigkeit der Interaktionen zu prüfen. Die endogene PKD wurde aus den Zellysaten immunpräzipitiert und ihr Kopräzipitat mittels Immunoblot-Analyse auf tyrosinphosphorylierte Proteine untersucht.

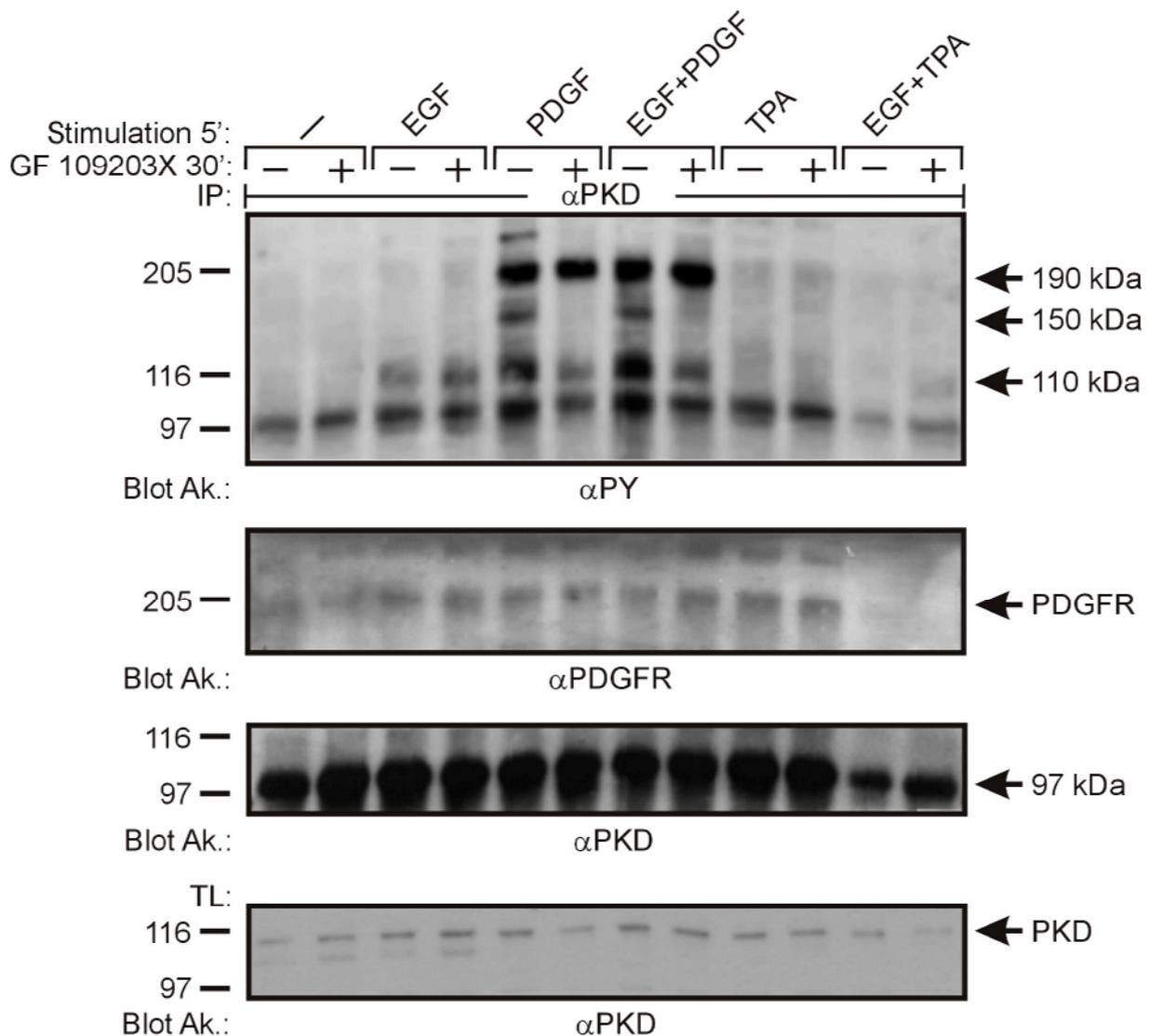


Abb. 3.13: Interaktion von PKD mit tyrosinphosphorylierten Proteinen in mit GF-vorbehandelten 3T3 L1-Mausfibroblasten. In serumfreiem Medium kultivierte 3T3 L1-Fibroblasten wurden 30 min mit GF 109203X vorbehandelt und weitere 5 min mit EGF, PDGF oder TPA einzeln stimuliert oder mit PDGF oder TPA in Kombination mit EGF kostimuliert. Nach der Zellyse wurde PKD mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD Sugen) immunpräzipitiert, und die Proteine wurden mittels 7,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (α -PY 4G10) (*oben*). Nach Entfernen des α -PY-Antikörpers von der Membran wurde mit dem polyklonalen Anti-PDGFR-Antikörper (α -PDGFR poly) (*2.v.oben*) und dem polyklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD D20) (*2.v.unten*) immunodetektiert. Außerdem wurde in den Totallysaten ebenfalls mit dem α -PKD-Antikörper immunodetektiert (*unten*).

Hierbei wird die deutlichste Phosphotyrosinbande bei etwa 190 kDa beobachtet, die nur bei Stimulation mit PDGF erscheint, und deren Intensität durch den PKC-Inhibitor oder Kostimulation mit EGF nicht beeinflusst wird (Abb. 3.13, *oben*, Spuren 5-8). Nach Entfernen des Anti-Phosphotyrosin-Antikörpers wurde dieses Signal mit einem Anti-PDGFR-Antikörper verifiziert. Hierbei zeigte sich, dass der PDGF Rezeptor konstitutiv an PKD bindet (Abb. 3.13, *2.v.oben*).

Diese Assoziation ist also unabhängig von der Aktivierung von PKD oder von dem PDGF Rezeptor.

Weitere auffallende Phosphotyrosin-Banden finden sich nach Stimulation mit PDGF bei ca. 150 kDa und bei 110 kDa (Abb. 3.13, *oben*, Spuren 5-8). Bei beiden wird jeweils die Tyrosinphosphorylierung durch GF gehemmt. Die 110 kDa-Bande erscheint zusätzlich, in schwächerem Ausmaß, nach alleiniger Stimulation mit EGF (Spuren 3 und 4).

Die Tatsache, dass PLC γ mit dem PDGF Rezeptor und mit PKD in B-Zellen assoziiert, legt nahe, dass es sich bei der tyrosinphosphorylierten 150 kDa-Bande um PLC γ handelt. Dass ihre Tyrosinphosphorylierung durch GF unterbunden wird, spricht für eine Phosphorylierung durch PKCs nach deren Aktivierung. Für die Bande bei 110 kDa ist PKD selbst ein Kandidat, dessen Tyrosinphosphorylierung bereits gezeigt wurde (Sidorenko *et al.*, 1996). Übereinstimmend damit ist auch die Abhängigkeit dieser Phosphorylierung durch PKCs. Trotz Immundetektion mit verschiedenen Anti-PKD-Antikörpern beobachtet man im Immunpräzipitat von PKD lediglich eine 97 kDa-Bande, in deren Höhe die Dimere von den schweren Ketten der Antikörper laufen (Abb. 3.13, *2.v.unten*). Hingegen werden gleichmäßige PKD-Gehalte in den Totallysaten detektiert (Abb. 3.13, *unten*).

Zur weiteren Verifizierung der Identität des 190 kDa-Bindungspartners von PKD wurde ein identisches Experiment durchgeführt, die Zellen jedoch mit dem PDGF Rezeptor-Inhibitor AG 1296 vorbehandelt.

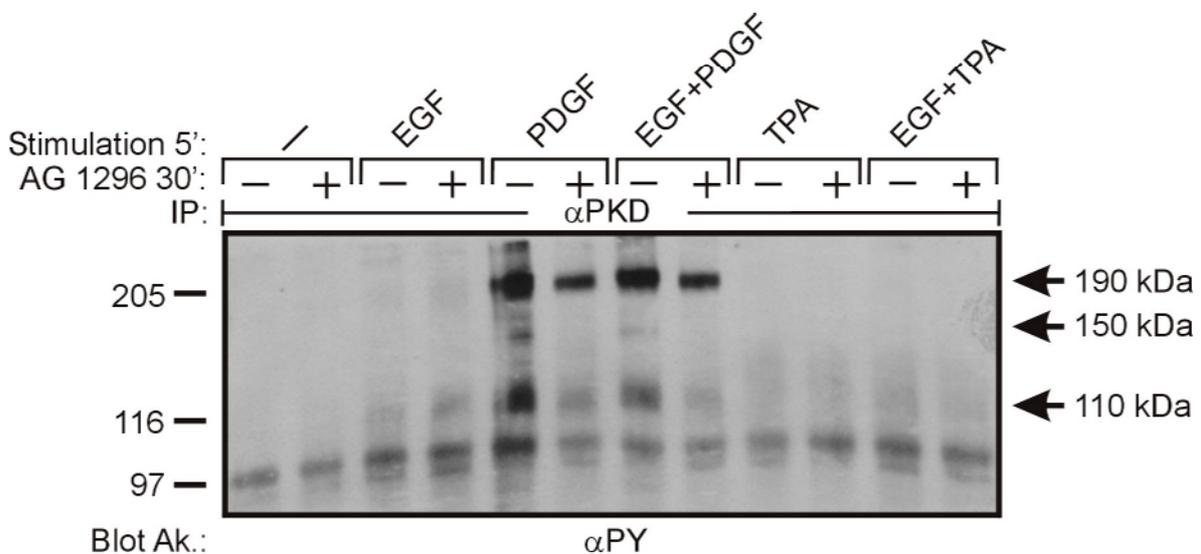


Abb. 3.14: Interaktion von PKD mit tyrosinphosphorylierten Proteinen in 3T3 L1-Mausfibroblasten. In serumfreiem Medium kultivierte 3T3 L1-Fibroblasten wurden 30 min mit AG 1296 vorbehandelt und weitere 5 min mit EGF, PDGF oder TPA einzeln stimuliert oder mit PDGF oder TPA in Kombination mit EGF kostimuliert. Nach der Zellyse wurde PKD mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD Sugen) immunpräzipitiert, und die Proteine wurden mittels 7,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (α -PY 4G10).

Wie sich zeigt, wird die Tyrosinphosphorylierung dieser Bande, die nur nach PDGF-Stimulierung erscheint, durch diesen Inhibitor eingeschränkt (Abb. 3.14, Spuren 5-8), ein weiteres Indiz, das für den PDGF Rezeptor spricht. Wie zu erwarten war, ist auch das Ausmaß der Tyrosinphosphorylierung der anderen Banden bei 150 kDa und 110 kDa PDGF Rezeptor-abhängig.

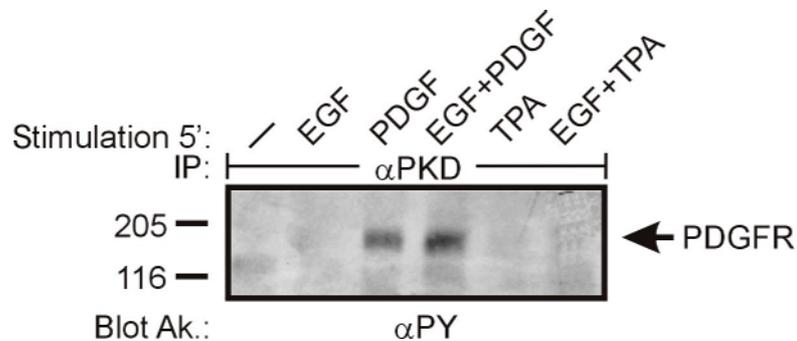


Abb. 3.15: Interaktion des PDGF Rezeptors mit PKD in 3T3 L1-Adipozyten. In Abwesenheit von Serum kultivierte 3T3 L1-Adipozyten wurden 5 min mit EGF, PDGF oder TPA einzeln stimuliert oder mit PDGF oder TPA in Kombination mit EGF kostimuliert, und PKD nach der Zellyse mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD Sugen) immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden mittels 7,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt, und nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (α -PY 4G10).

Weitere Experimente in ausdifferenzierten 3T3 L1-Adipozyten (Abb. 3.17, Spuren 3 und 4) und NIH 3T3-Zellen (Abb. 3.16, Spur 4) führten zu demselben Ergebnis. Nach der Stimulation mit PDGF beobachtet man den tyrosinphosphorylierten PDGF Rezeptor im Kopräzipitat von PKD. Jedoch konnte er hier nicht direkt mit dem α -PDGFR-Antikörper detektiert werden.

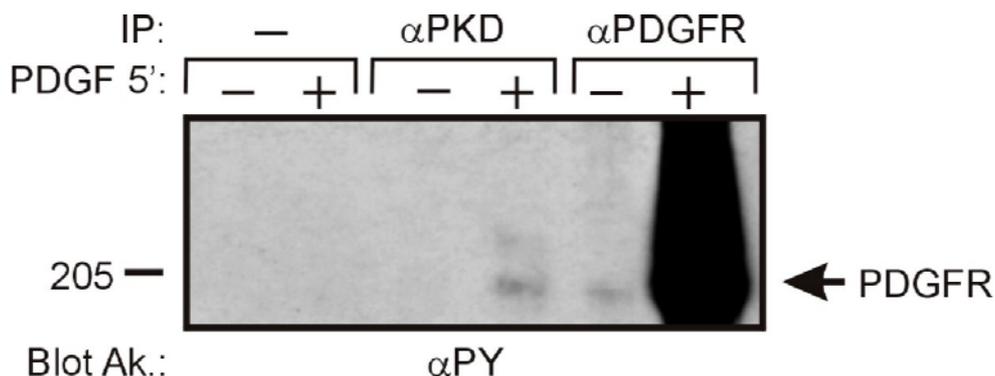


Abb. 3.16: Interaktion des PDGF Rezeptors mit PKD in NIH 3T3-Zellen. In Abwesenheit von Serum kultivierte NIH 3T3-Zellen wurden 5 min mit PDGF stimuliert. Nach der Zellyse wurde mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD Sugen) oder dem polyklonalen Anti-PDGFR Rezeptor-Antikörper (α -PDGFR LJ9) immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden mittels 7,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt, und nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (α -PY 4G10).

In einem weiteren Experiment wurden der immunpräzipitierte PDGF Rezeptor und die 190 kDa-Bande aus dem PKD-Kopräzipitat nebeneinander in einer Immunoblot-Analyse dargestellt.

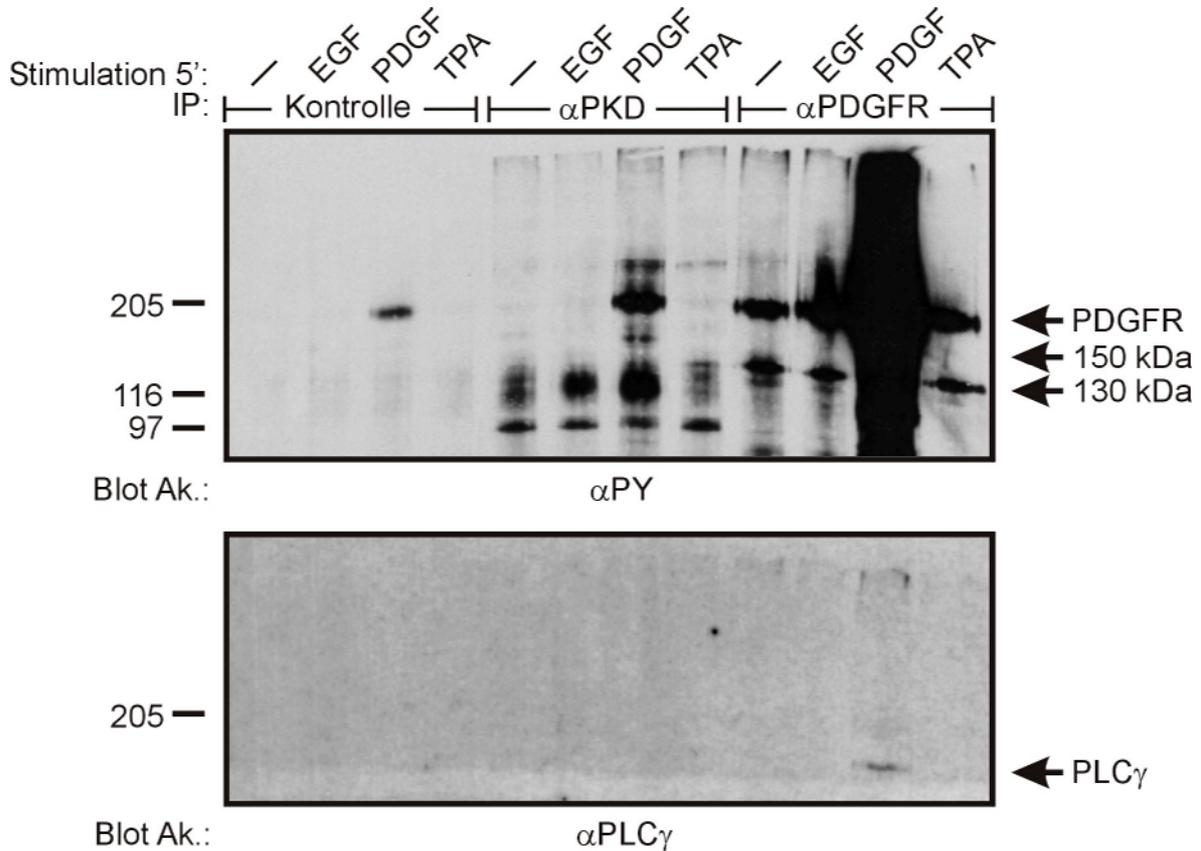


Abb. 3.17: Vergleich der 190 kDa-Bande nach PKD-Kopräzipitation mit dem immunpräzipitierten PDGF Rezeptor in 3T3 L1-Fibroblasten. Interaktion des PDGF Rezeptors und PKD mit PLC γ . In Abwesenheit von Serum kultivierte 3T3 L1-Fibroblasten wurden 5 min mit EGF, PDGF oder TPA stimuliert. Nach der Zellyse wurde mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD Sugen) oder dem polyklonalen Anti-PDGF Rezeptor-Antikörper (α -PDGFR LJ9) immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden mittels 6-15 %iger SDS-PAGE aufgetrennt, und nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (α -PY 4G10) (*oben*). Nach Entfernen des α -PY-Antikörpers von der Membran wurde mit dem monoklonalen Anti-PLC γ -Antikörper (α -PLC γ ST) immundetektiert (*unten*).

Die Banden laufen exakt auf einer Höhe (Abb. 3.17, *oben*), wobei das Ausmaß der Tyrosinphosphorylierung der mit PDGF-stimulierten kopräzipitierten Bande (Spur 7) ungefähr dem des direkt immunpräzipitierten unstimulierten PDGF Rezeptors (Spur 9) entspricht. Um die Spezifität der Interaktion zwischen PKD und der 190 kDa-Bande sicherzustellen, wurde ein Kontrollansatz mit Zellysat und Protein A-Sepharose, aber ohne Antikörper durchgeführt. Auch hier ist die kopräzipitierte Bande nach PDGF-Stimulation zu sehen (Spur 3), doch in viel schwächerem Ausmaß als nach der Immunpräzipitation von PKD. Aus diesem Experiment, zusammen mit den vorangegangenen Daten, ergibt sich, dass die Interaktion zwischen PKD und der 190 kDa-Bande

in 3T3 L1-Fibroblasten spezifisch ist, und dass es sich bei dieser Bande um den PDGF Rezeptor handelt.

Auch ließ sich hier durch Immundetektion mit dem Anti-PLC γ -Antikörper die Identität der 150 kDa-Bande weitgehend aufklären. Wohl aufgrund geringer Expression dieser Kinase in 3T3 L1-Zellen lässt sich die Bande in schwacher Form nur dann erkennen, wenn das Protein nach Stimulation mit PDGF induziert mit dem PDGF Rezeptor kopräzipitiert (Abb. 3.17, *unten*, Spur 11). Sie liegt exakt auf einer Höhe mit der tyrosinphosphorylierten 150 kDa-Bande im Kopräzipitat von PDGF-stimulierter PKD (Abb. 3.17, *oben*, Spur 7). Zusammen mit der Tatsache, dass sich ihre Tyrosinphosphorylierung mit Inhibitoren für PKC und den PDGF Rezeptor vermindern lässt (Abb. 3.13), lässt sich der Schluss ziehen, dass es sich hier um PLC γ handelt, was in späteren Experimenten weiter untersucht wurde. Obwohl man auch im Kopräzipitat von PKD die tyrosinphosphorylierte Bande nur nach PDGF-Stimulation sehen kann, ist unklar, ob sie konstitutiv oder induziert mit PKD kopräzipitiert, oder ob sie dies nur indirekt über den konstitutiv an PKD assoziierten PDGF Rezeptor tut.

3.3.2 Interaktion von PKD mit dem PDGF Rezeptor in Rat1-Zellen

Weiterhin von Interesse war, ob diese Wechselwirkung zwischen PKD und dem PDGF Rezeptor auch in anderen Zelltypen von Bedeutung ist, insbesondere für die Rat1-Zellen, in welchen die PDGF-abhängige JNK-Inhibition durch PKD gezeigt wurde.

Die Rat1-Zellen wurden nach demselben Schema wie bei den Experimenten in 3T3 L1-Fibroblasten mit EGF, PDGF und TPA stimuliert, dabei wurde mit dem PKC-Inhibitor GF 109203X die Beteiligung von PKCs untersucht. PKD wurde aus den Zellysaten immunpräzipitiert, und ihre tyrosinphosphorylierten Bindungspartner wurden immundetektiert.

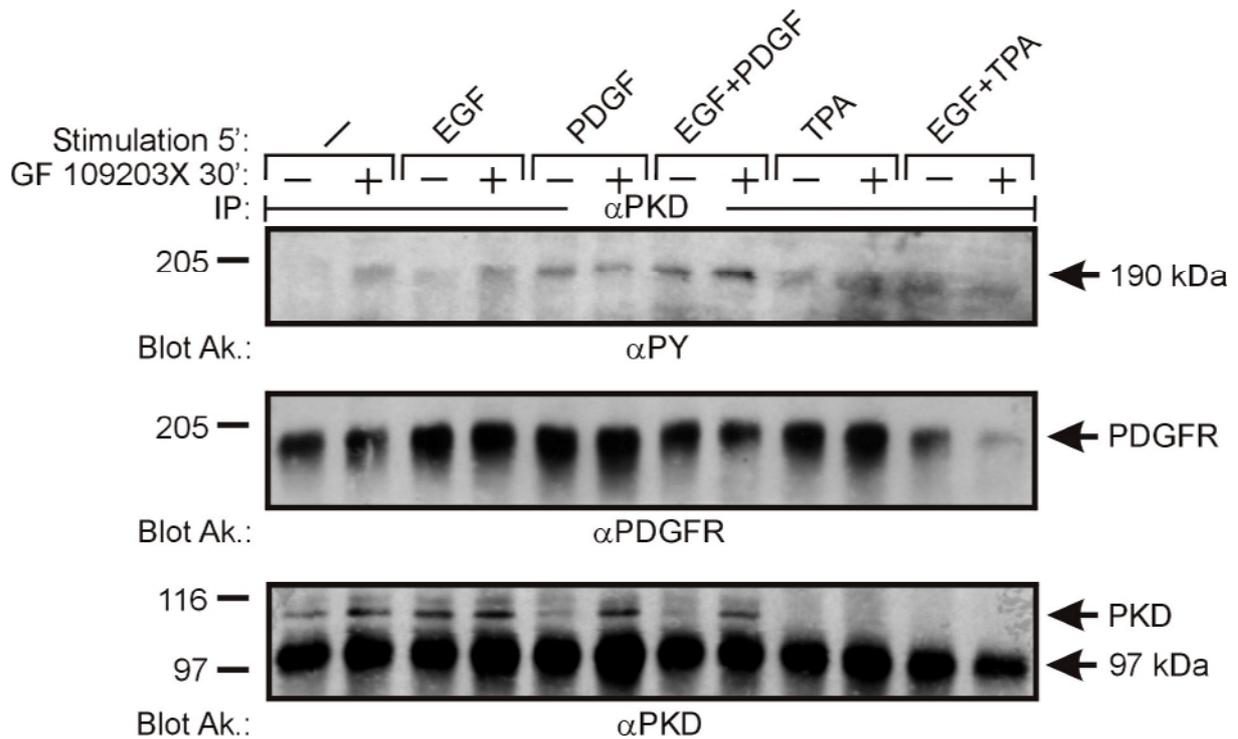


Abb. 3.18: Kopräzipitation des PDGF Rezeptors mit PKD in Rat1-Zellen. In serumfreiem Medium kultivierte Rat1-Fibroblasten wurden 30 min mit GF 109203X vorbehandelt und weitere 5 min mit EGF, PDGF oder TPA einzeln stimuliert oder mit PDGF oder TPA in Kombination mit EGF kostimuliert. Nach der Zellyse wurde PKD mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD Sugen) immunpräzipitiert, und die Proteine wurden mittels 7,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (α -PY 4G10) (*oben*). Nach Entfernen des α -PY-Antikörpers von der Membran wurde mit dem polyklonalen Anti-PDGFR-Antikörper (α -PDGFR poly) (*Mitte*) und dem polyklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD A20) (*unten*) immundetektiert.

Hier beobachtet man wieder die Kopräzipitation der 190 kDa-Bande, deren Tyrosinphosphorylierung nach PDGF-Stimulation eindeutig stärker ist (Abb. 3.20, *oben*, Spuren 5-8). Aber auch die direkte Immundetektion auf den PDGF Rezeptor zeigt, dass dieser konstitutiv, unabhängig von der PDGF-Stimulation, mit PKD assoziiert ist (Abb. 3.20, *mitte*). In diesen Zellen war es möglich, immunpräzipitierte PKD in Form einer schmalen Bande direkt über der 97 kDa-Bande zu detektieren (Abb. 3.20, *unten*), und hier zeigt sich wieder das oben diskutierte Phänomen, dass der α -PKD-Antikörper in Rat1-Zellen keine phosphorylierte PKD erkennt. Nach der Stimulation mit PDGF wird das Signal deutlich schwächer (Spuren 5 und 7), was jedoch durch den PKC-Inhibitor wieder aufgehoben wird (Spuren 6 und 8). Dies steht im Einklang mit der Tatsache, dass PKD durch PKCs aktiviert wird. Nach der Stimulation mit TPA verschwindet das Signal ganz, was jedoch durch GF nicht wieder aufgehoben wird (Spuren 9-12). Dies ist übereinstimmend mit dem Modell eines dualen Aktivierungsmechanismus' für PKD, in dem sie durch Phorbolster direkt und indirekt über PKCs aktiviert wird (Rozenfurt *et al.*, 1997).

Neben der Immundetektion von immunpräzipitierter PKD durch den α -PKD-Antikörper wurde in Rat1-Zellen auch die Kopräzipitation von PKD mit dem PDGF Rezeptor nachgewiesen (Abb. 3.19, unten). Die Schwächung des Signals nach PDGF-Stimulation ist hier jedoch nicht so ausgeprägt wie in vorigem Experiment. Hingegen verschwindet das Signal nach Stimulation mit TPA wieder vollständig.

Auch in diesem Experiment wird also deutlich, dass PKD konstitutiv mit dem PDGF Rezeptor assoziiert ist. Hingegen bestätigt die Immundetektion mit dem α -PLC γ -Antikörper (Abb. 3.19, mitte, Spuren 3-8) die bekannte Tatsache, dass die Kopräzipitation von PLC γ , die man nach EGF- und PDGF-Stimulation als tyrosinphosphorylierte 150 kDa-Bande erkennt (Abb. 3.19, oben, Spuren 3-8, 11 und 12), induzierter Natur ist.

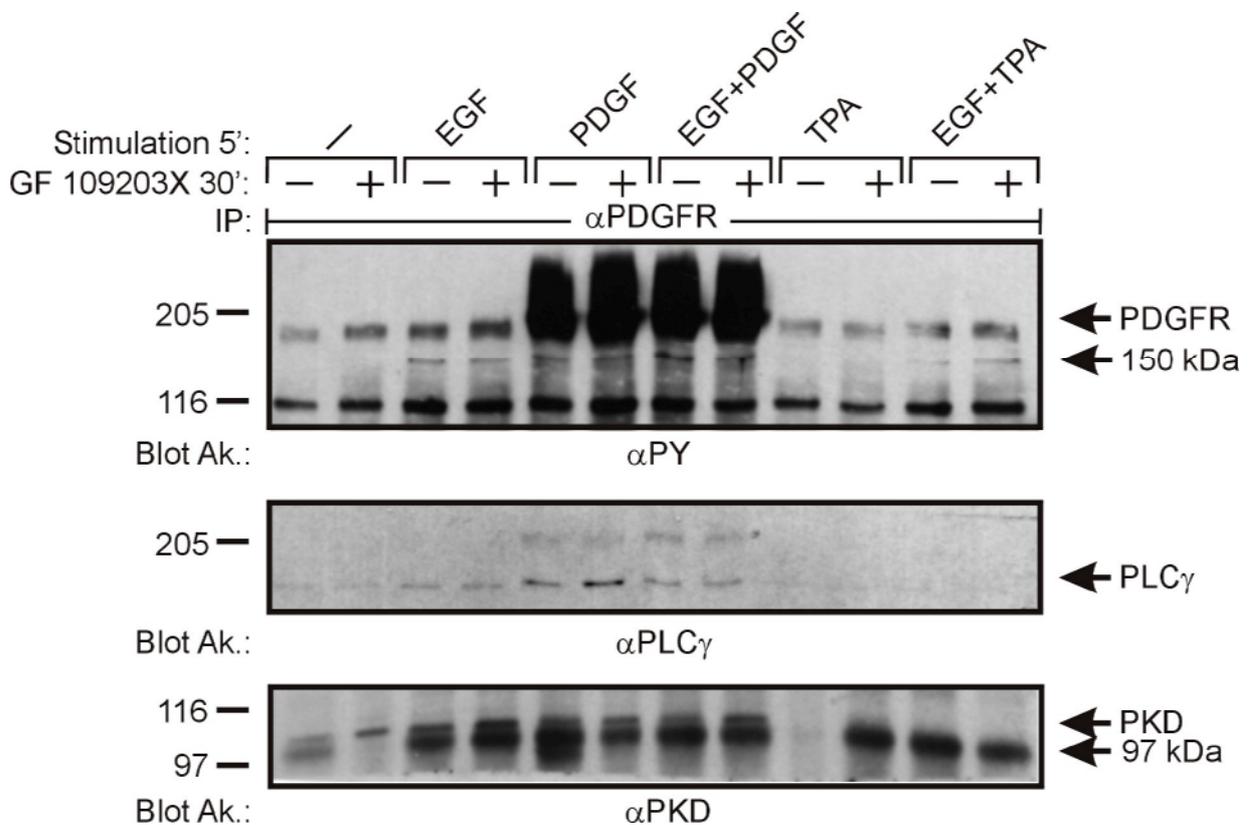


Abb. 3.19: Kopräzipitation von PKD mit dem PDGF Rezeptor in Rat1-Zellen. In serumfreiem Medium kultivierte Rat1-Fibroblasten wurden 30 min mit GF 109203X vorbehandelt und weitere 5 min mit EGF, PDGF oder TPA einzeln stimuliert oder mit PDGF oder TPA in Kombination mit EGF kostimuliert. Nach der Zellyse wurde PKD mit dem polyklonalen Anti-PDGFR-Antikörper (α -PDGFR LJ19) immunpräzipitiert, und die Proteine wurden mittels 7,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (α -PY 4G10) (oben). Nach Entfernen des α -PY-Antikörpers von der Membran wurde mit dem monoklonalen Anti-PLC γ -Antikörper (α -PLC γ ST) (Mitte) und dem polyklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD A20) (unten) immundetektiert.

Wie auch in 3T3 L1-Fibroblasten wurde desweiteren die 190 kDa-Bande des PKD-Kopräzipitats neben der des immunpräzipitierten PDGF Rezeptors und der Kontrolle ohne Antikörper in einer Immunoblot-Analyse dargestellt. Auch hier erkennt man, wenn auch mit schwacher Intensität, die tyrosinphosphorylierte 190 kDa-Bande nach PDGF-Stimulation (Abb. 3.20, Spur 11) auf gleicher Höhe mit dem immunpräzipitierten PDGF Rezeptor (Spuren 5-8).

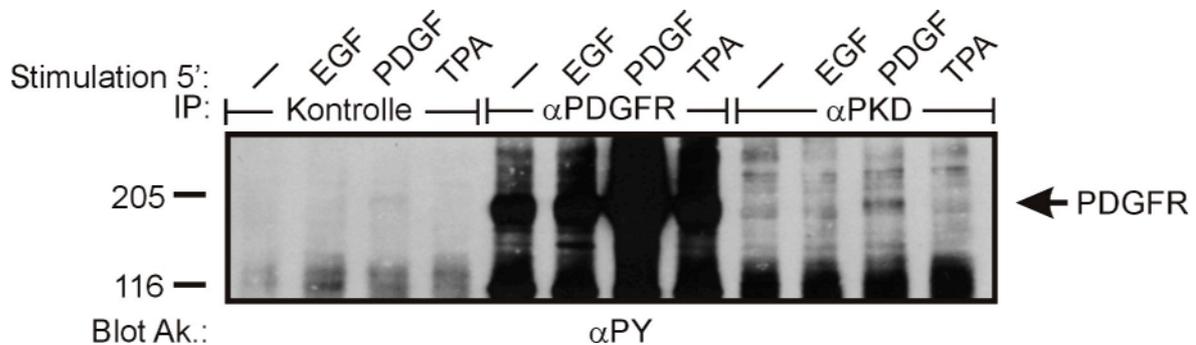


Abb. 3.20: Vergleich der 190 kDa-Bande nach PKD-Kopräzipitation mit dem immunpräzipitierten PDGF Rezeptor in Rat1-Zellen. In Abwesenheit von Serum kultivierte Rat1-Fibroblasten wurden für 5 min mit EGF, PDGF oder TPA stimuliert. Nach der Zellyse wurde mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD Sugen) oder dem polyklonalen Anti-PDGF Rezeptor-Antikörper (α -PDGFR LJ9) immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden mittels 6-15 %iger SDS-PAGE aufgetrennt, und nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (α -PY 4G10).

3.3.3 Interaktion von PKD mit dem PDGF Rezeptor in humanen Glioblastomzellen

Eine der wenigen Krebszellsorten, die den PDGF Rezeptor in nennenswertem Umfang exprimieren, sind Glioblastomzellen (P. Knyazev, persönliche Mitteilung). Auch hier sollte die Interaktion von PKD mit dem PDGF Rezeptor untersucht werden.

In der humanen GlioblastomZelllinie SF-126, die PKD und den PDGF Rezeptor exprimiert, kann PKD durch PDGF nicht aktiviert werden, wohl aber durch TPA (Bagowski *et al.*, 1999).

Hier sollte die Frage, ob PKD trotzdem assoziiert mit dem PDGF Rezeptor vorliegt, geklärt werden. Dazu wurden nach Stimulation mit PDGF entweder PKD oder der PDGF Rezeptor immunpräzipitiert, und beide Ansätze vergleichend in einer Immunoblot-Analyse dargestellt.

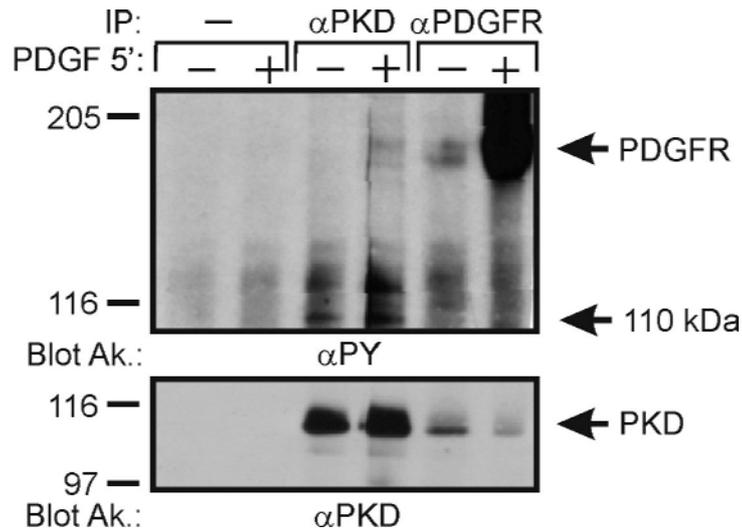


Abb. 3.21: Interaktion von PKD mit dem PDGF Rezeptor in der humanen Glioblastom-Zelllinie SF-126. In Abwesenheit von Serum kultivierte Zellen der humanen Glioblastom-Zelllinie SF-126 wurden 5 min mit PDGF stimuliert. Nach der Zellyse wurde mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD Sugen) oder dem polyklonalen Anti-PDGF Rezeptor-Antikörper (α -PDGFR LJ9) immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden mittels 7,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt, und nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (α -PY 4G10) (*oben*). Nach Entfernen des α -PY-Antikörpers von der Membran wurde mit dem polyklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD D20) immundetektiert (*unten*).

In der Immundetektion mit dem α -PY-Antikörper erkennt man eine schwache Bande im PKD-Kopräzipitat, die auf einer Höhe mit der des PDGF Rezeptors liegt (Abb. 3.21, *oben*, Spur 4, 5 und 6). Ein Kontrollansatz ohne Antikörper (Spuren 1 und 2) jedoch spricht für eine spezifische Wechselwirkung. Außerdem wurde eine konstitutiv tyrosinphosphorylierte Bande bei 110 kDa beobachtet, welche deckungsgleich mit der PKD-Bande der Immundetektion mit dem α -PKD-Antikörper ist (Abb. 3.21, *unten*, Spuren 3-6). Ferner sieht man auch hier die konstitutive Kopräzipitation von PKD mit dem PDGF Rezeptor.

Dieses Experiment zeigt, dass PKD mit dem PDGF Rezeptor interagiert, unabhängig davon, ob dieser sie aktivieren kann oder nicht. Dieser Befund legt die Vermutung nahe, dass diese Assoziation Allgemeingültigkeit besitzt, da sie sowohl in Nagetierzellen als auch in humanen Krebszellen beobachtet wurde.

Zur Verifizierung letztgenannter Beobachtung wurde diese Wechselwirkung in anderen Glioblastom-Zelllinien untersucht. Weitere Kandidaten, die den PDGF Rezeptor exprimieren, sind die Zelllinien A-172 und U-1242, von denen letztere den PDGF Rezeptor stärker exprimiert.

3T3 L1- und U-1242-Zellen wurden mit PDGF oder Pervanadat (POV) stimuliert, und PKD aus den Lysaten immunpräzipitiert. Das Ausmaß der PDGF Rezeptor-Tyrosinphosphorylierung wurde immundetektiert.

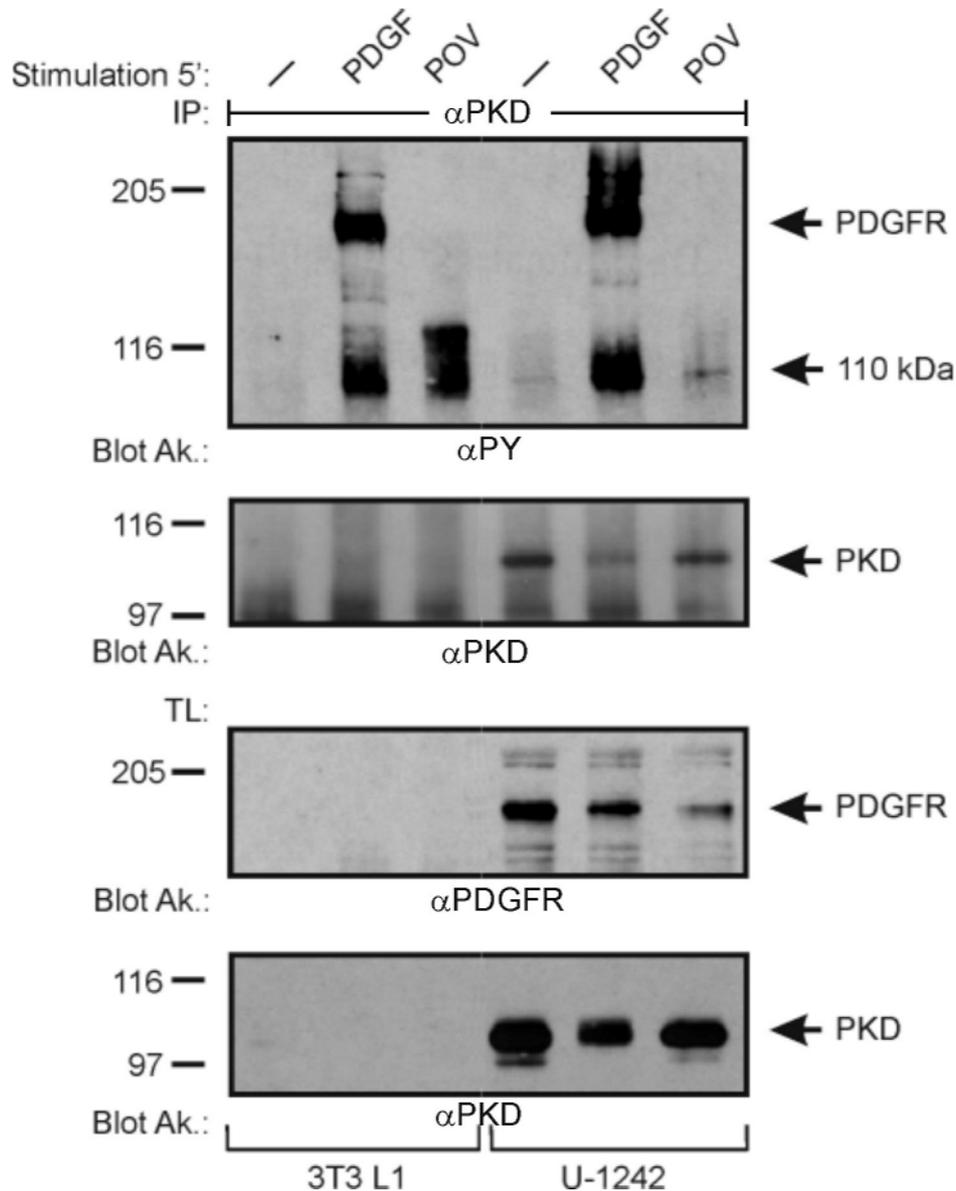


Abb. 3.22: Interaktion von PKD mit dem PDGF Rezeptor in 3T3 L1-Fibroblasten und in der humanen Glioblastom-Zelllinie U-1242. In Abwesenheit von Serum kultivierte 3T3 L1-Zellen und Zellen der humanen Glioblastom-Zelllinie U-1242 wurden 5 min mit PDGF und Pervanadat stimuliert. Nach der Zellyse wurde PKD mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD Sugen) immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden mittels 7,5 %iger PAGE aufgetrennt, und nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (α -PY 4G10) (*oben*). Nach Entfernen des α -PY-Antikörpers von der Membran wurde mit dem polyklonalen anti-PKD-Antikörper (α -PKD D20) immundetektiert (*2.v.oben*). Die Totallysate wurden mit dem monoklonalen Anti-PDGFR-Antikörper (α -PDGFR ST) (*2.v.unten*) und dem polyklonalen α -PKD-Antikörper (*unten*) immundetektiert.

In U-1242-Zellen ist die Tyrosinphosphorylierung noch stärker als in den 3T3 L1-Kontrollzellen (Abb. 3.22, *oben*, Spuren 5 und 2). In einem analogen Experiment in A-172-Zellen wurde das gleiche Ergebnis erhalten (Daten nicht gezeigt).

Somit wurde gezeigt, dass die konstitutive Assoziation vom PDGF Rezeptor mit PKD auch in Krebszellen generell vorhanden ist.

3.3.4 Interaktion von PKD mit dem PDGF Rezeptor in transfizierten 293 Zellen

Nachdem die Wechselwirkung zwischen PKD und dem PDGF Rezeptor mehrmals in endogenen Systemen gezeigt wurde, sollten die Untersuchungen in Systemen mit transfizierten Konstrukten für den PDGF Rezeptor und PKD vertieft werden. Für nachstehende Experimente wurden HEK 293-Zellen verwendet, die nur wenig PDGF Rezeptor exprimieren und sich mit hoher Effizienz durch die Kalziumphosphat-Methode transfizieren lassen.

3.3.4.1 Interaktion von endogener und transfizierter PKD mit transfiziertem PDGF Rezeptor

HEK 293-Zellen wurden mit den Konstrukten für PKD oder den PDGF Rezeptor einzeln transfiziert bzw. mit beiden kotransfiziert, mit PDGF stimuliert, und PKD aus den Lysaten immunpräzipitiert, wobei jeweils Kontrollen ohne den Antikörper mit angesetzt wurden.

In der Immunoblot-Analyse gegen Phosphotyrosinreste wurden vier Banden im Kopräzipitat von PKD gefunden, die dort nur erscheinen, wenn die Zellen mit dem PDGF Rezeptor transfiziert wurden, jedoch unabhängig davon, ob PKD transfiziert wurde oder nicht (Abb. 3.23 A, oben, Spuren 8-16). Die schwächere Tyrosinphosphorylierung in kotransfizierten Zellen (Spuren 15 und 16) ist darauf zurückzuführen, dass die Proteine sich gegenseitig in ihrer Überexpression unterdrücken, wovon vor allem der PDGF Rezeptor betroffen ist, wie sich in der Totallysat-Kontrolle zeigt (Abb. 3.23 B). Ob es sich bei den drei oberen Banden um verschieden große Formen des PDGF Rezeptors oder um weitere tyrosinphosphorylierte Bindungspartner handelt, ließ sich nicht feststellen, da weder α -PDGFR- noch α -PLC γ -Antikörper ihre Zielproteine in kopräzipitierter Form detektieren können. Lediglich in den Totallysaten wurde der PDGF Rezeptor mit dem α -PDGFR-Antikörper nachgewiesen (Abb. 3.23 B), was nahelegt, dass es sich zumindest bei der obersten Bande um den transfizierten PDGF Rezeptor handelt. Dass der PDGF Rezeptor konstitutiv tyrosinphosphoryliert ist, bzw. konstitutive Tyrosinphosphorylierung verursacht, liegt wahrscheinlich daran, dass er überexprimiert ist, und so auf der Zelloberfläche ohne extrazelluläres Signal spontan dimerisiert, was zu einer höheren Basalaktivität führen kann.

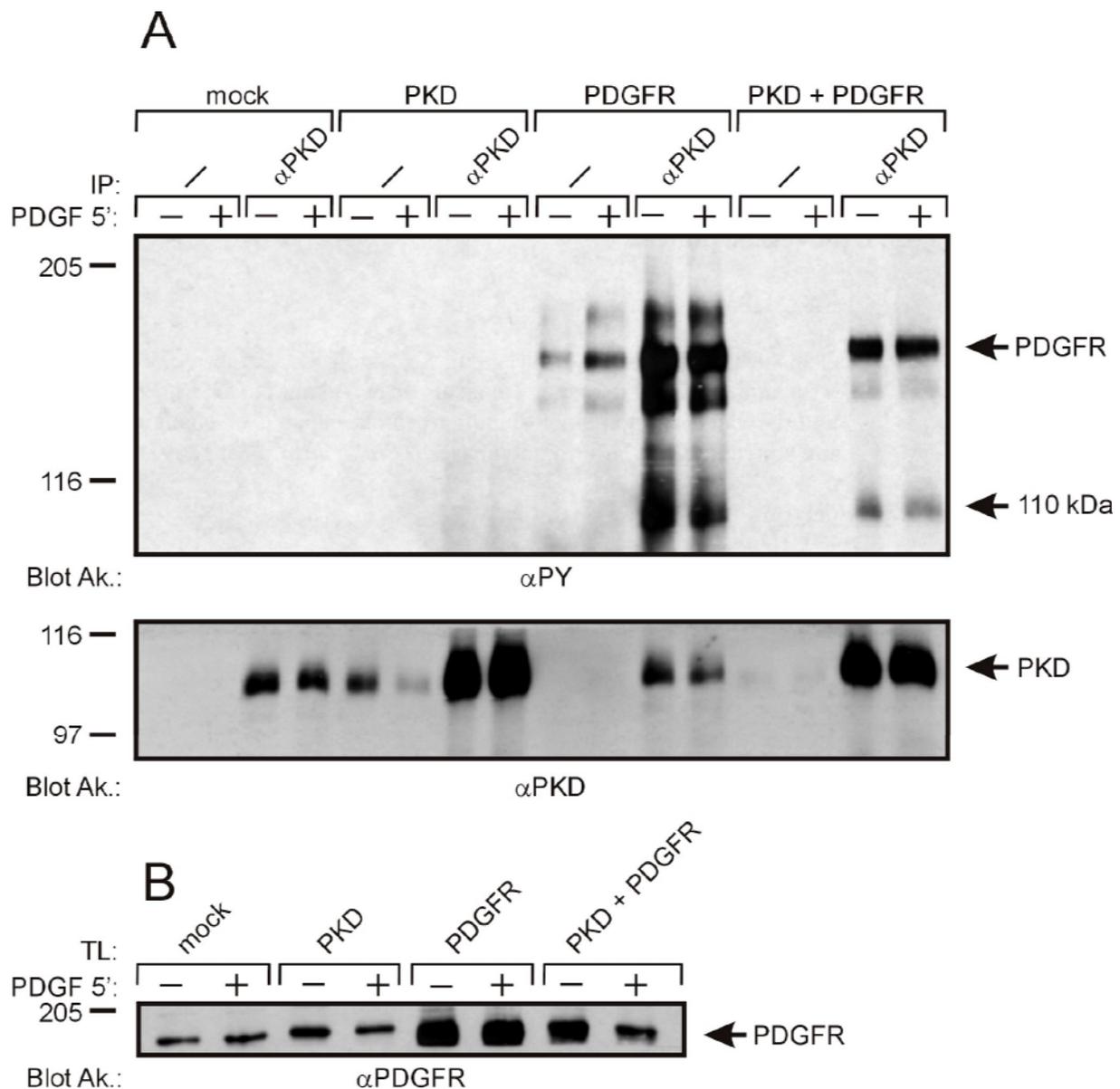


Abb. 3.23: Interaktion von endogener und transfizierter PKD mit transfiziertem PDGF Rezeptor in HEK 293-Zellen. Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293) wurden transient mit dem Leervektor oder den Konstrukten für PKD und den PDGF Rezeptor einzeln transfiziert bzw. mit beiden kotransfiziert, serumgehungert und mit PDGF 5 min stimuliert. Nach der Zellyse wurde PKD mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD Sugen) immunpräzipitiert, und die Proteine wurden mittels 7,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (α -PY 4G10) (A, oben). Nach Entfernen des α -PY-Antikörpers von der Membran wurde mit dem polyklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD D20) immundetektiert (A, unten). Die Totallysate wurden mit dem monoklonalen Anti-PDGFR-Antikörper (α -PDGFR ST) (B) immundetektiert.

Auch eine tyrosinphosphorylierte Bande um 110 kDa erscheint im PKD-Präzipitat von PDGF Rezeptor-transfizierten Zellen (Abb. 3.23 A, oben Spuren 11, 12, 15 und 16), welches deckungsgleich mit den PKD-Signalen ist, die man beobachtet, nachdem der α -PY-Antikörper von der Membran entfernt und mit dem α -PKD-Antikörper immundetektiert wurde (Abb. 3.23

A, unten). Die Tyrosinphosphorylierung dieser 110 kDa-Bande korreliert jedoch nicht mit dem PKD-Gehalt in der Zelle, sondern mit der Expression des PDGF Rezeptors, welche schwächer wird, wenn auch PKD überexprimiert wird und auch so eine schwächere Tyrosinphosphorylierung seiner Substrate zur Folge hat (Abb. 3.23, oben, Spuren 15 und 16).

Diese Ergebnisse zeigen, dass der transfizierte PDGF Rezeptor mit endogener und transfizierter PKD kopräzipitiert und darüber hinaus zu einer Tyrosinphosphorylierung von PKD führt.

3.3.4.2 Kopräzipitation von PKD und der PKD-Mutante K612M mit dem PDGF Rezeptor und von dem PDGF Rezeptor mit PKD

In diesem Experiment sollte sowohl PKD im Kopräzipitat des PDGF Rezeptors nachgewiesen werden als auch ihre Aktivierung als Kriterium für die Bindung untersucht werden.

HEK 293-Zellen wurden mit dem Konstrukt für den PDGF Rezeptor und zusätzlich mit den Konstrukten für PKD-wt oder die Punktmutante PKD-K612M, die kein ATP bindet, kotransfiziert. Nach der Stimulation mit PDGF oder POV wurden PKD und der PDGF Rezeptor aus den Zellysaten immunpräzipitiert.

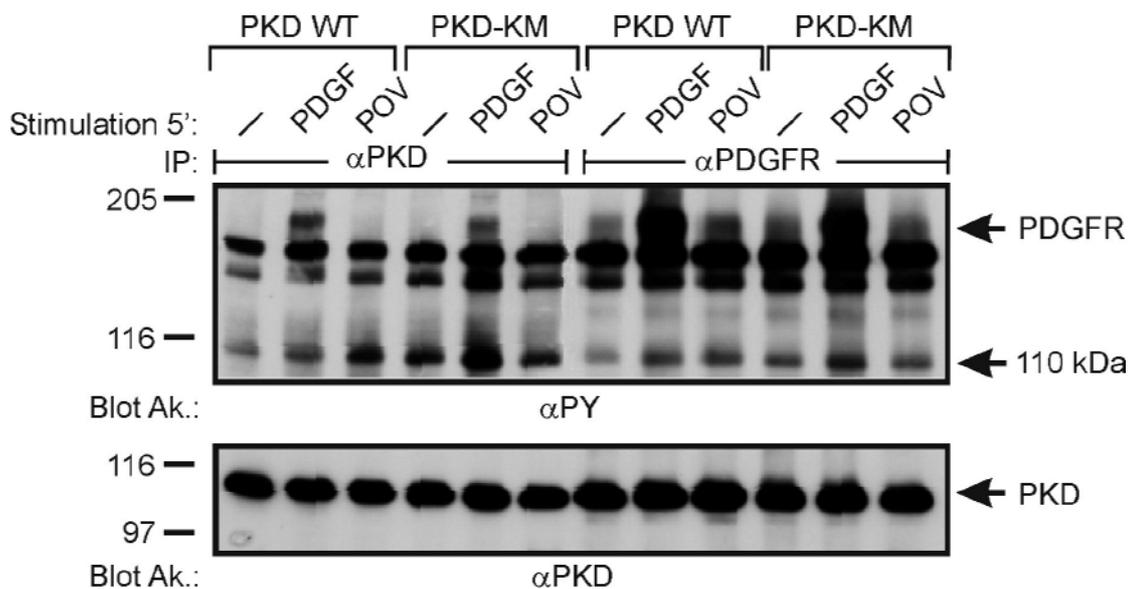


Abb. 3.24: Kopräzipitation von PKD und der PKD-Mutante K612M mit dem PDGF Rezeptor in HEK 293-Zellen. Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293) wurden transient mit dem Konstrukt für den PDGF Rezeptor und zusätzlich mit den Konstrukten für PKD-wt oder die Punktmutante PKD-K612M kotransfiziert, serumgehungert und mit PDGF oder Pervanadat 5 min stimuliert. Nach der Zellyse wurde PKD mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD Sugen), und der PDGF Rezeptor mit dem polyklonalen Anti-PDGF Rezeptor-Antikörper (α -PDGFR LJ9) immunpräzipitiert, und die Proteine wurden mittels 7,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (α -PY 4G10) (oben). Nach Entfernen des α -PY-Antikörpers von der Membran wurde mit dem polyklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD D20) immundetektiert (unten). Abk.: KM: K612M.

In der Immundetektion gegen Phosphotyrosinreste wird die Kopräzipitation des PDGF Rezeptors sowohl mit PKD-wt (Abb. 3.26, *oben*, Spuren 1-3) als auch PKD-KM (Spuren 4-6) beobachtet; ebenso, nach Immundetektion mit dem α -PKD-Antikörper, die Kopräzipitation einer Bande bei ca. 110 kDa mit dem PDGF Rezeptor (Abb. 3.26, *unten*, Spuren 7-12), welche auf gleicher Höhe mit immunpräzipitierter PKD läuft (Spuren 1-6). Weiterhin beobachtet man in der Phosphotyrosin-Immundetektion eine 110 kDa-Bande nach der Immunpräzipitation von PKD, sowie nach der des PDGF Rezeptors (Abb. 3.26, *oben*), die deckungsgleich mit der PKD-Bande ist, die man nach der Immundetektion mit dem α -PKD-Antikörper erhält. Die Tyrosinphosphorylierung von PKD nimmt zu, wenn die Zellen mit PDGF oder POV stimuliert wurden (Spuren 2 und 3). Darüberhinaus weist diese Bande eine verstärkte basale Tyrosinphosphorylierung in Zellen auf, die mit der KM-Mutante transfiziert wurden (Spur 4), die sich durch PDGF-Stimulation deutlich steigern lässt (Spur 5).

Im Gegensatz zum vorangegangenen Experiment lässt sich hier auch eine deutliche Verstärkung der PDGF Rezeptorbande nach PDGF-Stimulation feststellen, die diese Bande von den anderen beiden unterscheidet (Abb. 3.26, *oben*, Spuren 2, 5, 8 und 11). Die Assoziation des PDGF Rezeptors mit PKD ist aber auch hier konstitutiv und unabhängig davon, ob PKD-wt oder die Punktmutante eingesetzt wurden. Die Assoziation von PKD mit dem PDGF Rezeptor ist also unabhängig von der Fähigkeit von PKD, ATP zu binden oder dem Grad ihrer Tyrosinphosphorylierung.

3.3.4.3 Kopräzipitation von tag-PDGF Rezeptor-Konstrukten mit PKD

Ein weiteres Experiment, um die These der PKD-PDGF Rezeptor-Assoziation zu festigen, wurde mit VSV- und Flag-*tag*-Konstrukten des PDGF Rezeptors durchgeführt. Hierzu wurde die cDNA des PDGF Rezeptors mittels PCR amplifiziert, und das PCR-Produkt in den jeweiligen pcDNA3-(C)-*tag*-Vektor eingeführt, welcher so modifiziert wurde, dass C-terminal-*getagte* Konstrukte in hoher Kopienzahl exprimiert werden (J. Bange, diese AG).

HEK 293-Zellen wurden mit den Konstrukten für PKD und dem jeweiligen *tag*-PDGF Rezeptor kotransfiziert. Nach Stimulation mit PDGF oder POV wurden die *tag*-Proteine mit spezifischen Antikörpern aus den Zellysaten immunpräzipitiert.

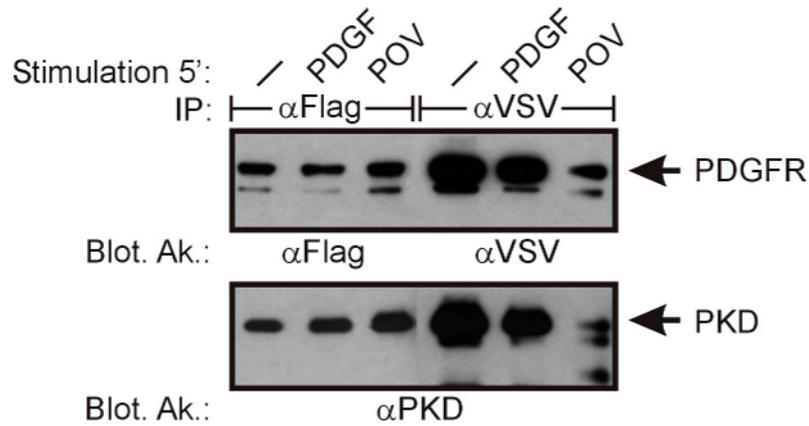


Abb. 3.25: Kopräzipitation von PKD mit dem *tag*-PDGF Rezeptor in HEK 293-Zellen. Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293) wurden transient mit dem Konstrukt für PKD und dem *Flag-tag*- bzw. dem *VSV-tag*-Konstrukt für den PDGF Rezeptor kotransfiziert, serumgehungert und mit PDGF oder POV 5 min stimuliert. Nach der Zellyse wurde der PDGF Rezeptor mit dem polyklonalen Anti-Flag-Antikörper (α -Flag D8), bzw. dem monoklonalen Anti-VSV-Antikörper (α -VSV p5D4) immunpräzipitiert, und die Proteine wurden mittels 7,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit den verwendeten Anti-*tag*-Antikörpern (α -VSV p5D4 und α -Flag D8) (*oben*) und mit dem polyklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD D20) (*unten*).

Die Immundetektion zeigt, dass PKD sich im Kopräzipitat beider *tag*-Proteine befindet (Abb. 3.25, *unten*). Außerdem wurde mit diesem Experiment gezeigt, dass das *tag*-Fragment im C-terminalen Bereich des PDGF Rezeptors die Assoziation mit PKD nicht stört.

3.3.5 Identifizierung der Binderegionen für die Assoziation von PKD und dem PDGF Rezeptor

Um zu untersuchen, welche Regionen der Proteine PKD und PDGF Rezeptor für die Assoziation der beiden Proteine zuständig sind, wurden Konstrukte für C-terminal VSV-getagte, C-terminal verkürzte Mutanten beider Bindungspartner hergestellt. Hierzu wurde die cDNA der benötigten Bereiche mit spezifischen Primern aus den pRK5-Plasmiden beider Proteine mittels PCR amplifiziert, und die PCR-Produkte in den modifizierten pcDNA3-(C)-VSV-Vektor (J. Bange, diese AG) eingeführt.

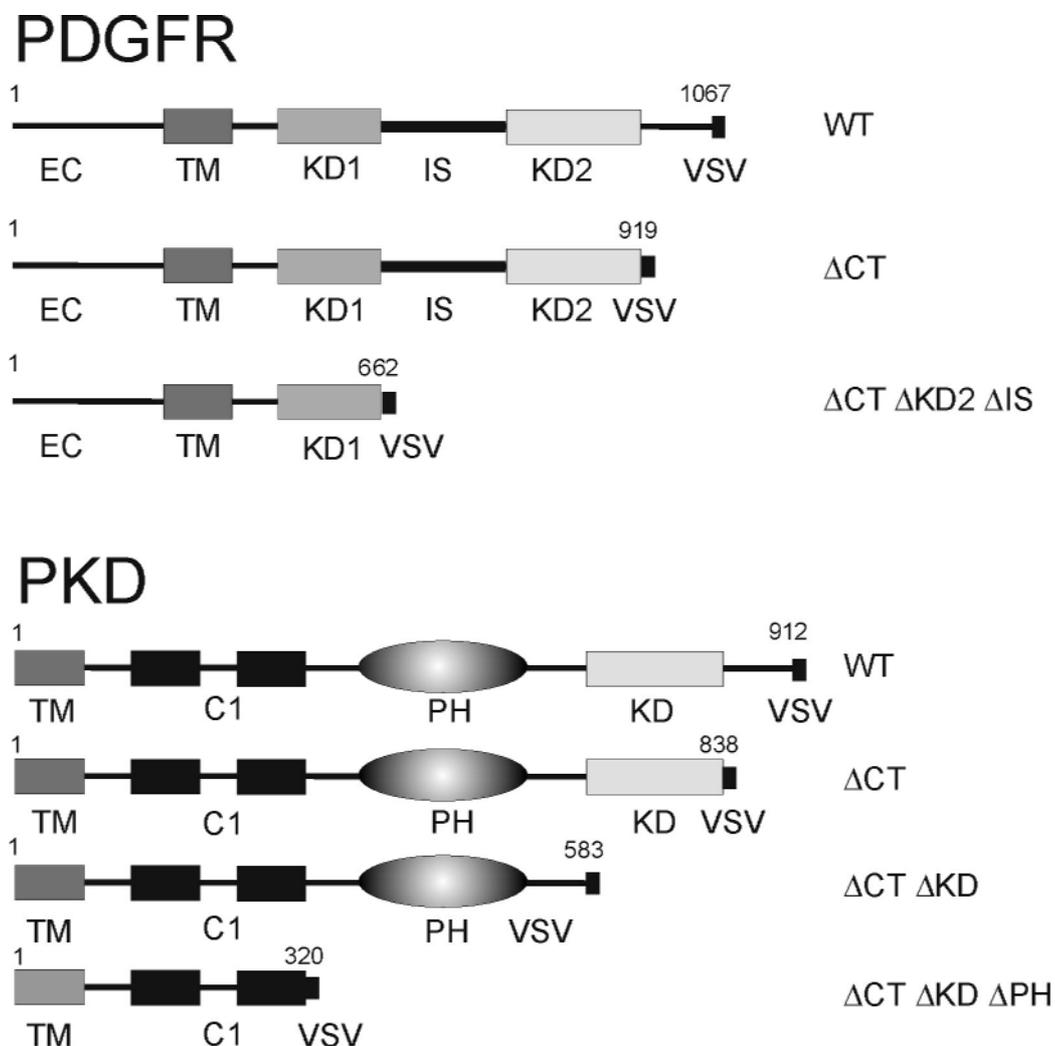


Abb. 3.26: Herstellung C-terminal verkürzter, C-terminal getagter Mutanten von PKD und dem PDGF Rezeptor. Die cDNA der benötigten Bereiche wurde mit spezifischen Primern aus den pRK5-Plasmiden beider Proteine mittels PCR amplifiziert, und die PCR-Produkte in den modifizierten pcDNA3-(C)-VSV-Vektor (J. Bange, diese AG) eingeführt. Die angegebenen Zahlen entsprechen der ersten und der letzten Aminosäure in der Proteinsequenz. Abk.: CT: Carboxyterminus; KD: Kinasedomäne; IS: Insertionssequenz; PH: Pleckstrin-Homologie-Domäne.

3.3.5.1 Identifizierung PKD-bindender Regionen des PDGF Rezeptors

Von dem PDGF Rezeptor wurden zwei Mutanten hergestellt (Abb. 3.26). Bei der ersten (PDGFR2) wurde der C-Terminus deletiert, der wichtige Tyrosinreste für die Bindung von Substraten und Autophosphorylierungsstellen enthält, bei der zweiten (PDGFR3) fehlten außerdem der zweite Teil der Kinasedomäne und die Insertionssequenz zwischen den Kinasedomänen, die ebenfalls Tyrosinreste aufweist.

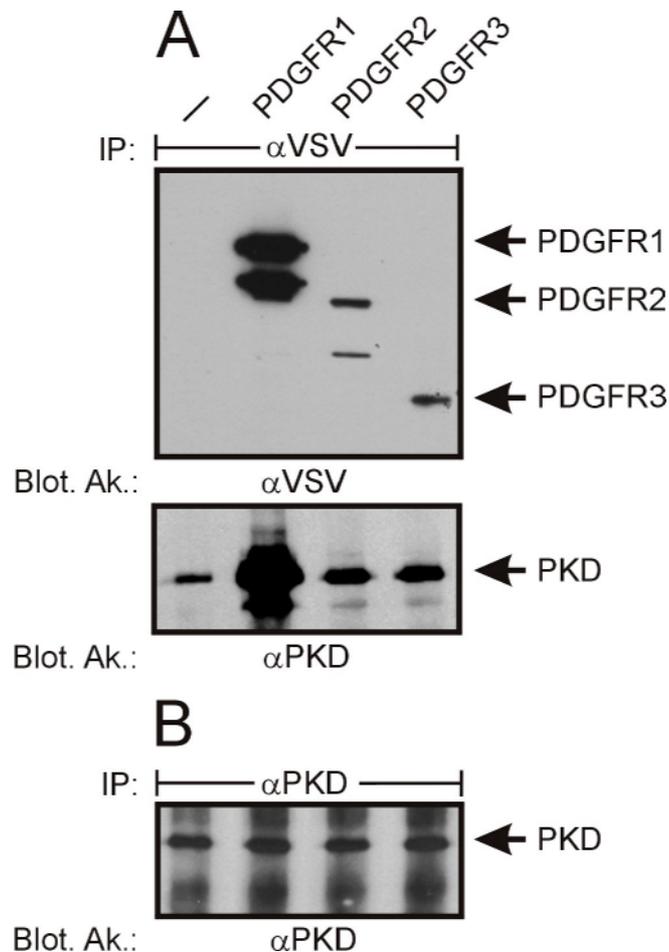


Abb. 3.27: Identifizierung PKD-bindender Regionen des PDGF Rezeptors in HEK 293-Zellen. Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293) wurden transient mit dem Konstrukt für PKD und zusätzlich den VSV-getagten Konstrukten für den PDGF Rezeptor oder seine verkürzten Mutanten PDGFR2 und PDGFR3 kotransfiziert. Nach der Zellyse wurde mit dem monoklonalen Anti-VSV-Antikörper (α -VSV p5D4) immunpräzipitiert. Nach Auftrennung der Immunkomplexe mittels einer 7,5 %igen SDS-PAGE und dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit dem polyklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD D20) (A, oben). Nach Entfernen des α -PKD-Antikörpers wurde mit dem α -VSV-Antikörper immundetektiert (A, unten). Zur Kontrolle der PKD-Gehalte in den Proben wurde ebenfalls eine Immunpräzipitation mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD SUGEN) durchgeführt, und mit dem polyklonalen α -PKD-Antikörper immundetektiert (B).

Nachdem N-terminal *getagte* PDGF Rezeptormutanten gar nicht exprimiert wurden (wahrscheinlich stört der VSV-Abschnitt das Protein bei seiner Integration in der Membran), wurden auch die C-terminal *getagten* verkürzten Mutanten, im Vergleich zu dem (C)-VSV-

PDGF Rezeptor-wt, in HEK 293-Zellen sehr gering exprimiert (Abb. 3.27 A, *oben*, Spuren 3 und 4). Interessanterweise erscheint in der Immundetektion mit dem Anti-VSV-Antikörper der VSV-PDGF Rezeptor-wt in zwei gleichstarken Banden (Spur 2), was die Vermutung nahelegt, dass die verschiedenen Banden, die in den vorangegangenen Experimenten beobachtet wurden, aufgrund unterschiedlicher Glykosylierungsgrade des PDGF Rezeptors auftreten.

Trotz der geringeren Expression der PDGF Rezeptor-Mutanten wurde PKD im Kopräzipitat von der VSV-Immunpräzipitation immundetektiert (Abb. 3.27 A, *unten*).

Wie zu erwarten war, findet man ein starkes Signal von PKD im Kopräzipitat von dem VSV-PDGF Rezeptor-wt (Spur 2). Die Signale im Kopräzipitat der beiden Mutanten sind entsprechend schwächer (Spuren 3 und 4), jedoch deutlich stärker als das PKD-Signal der Kontrolle, in die der Leervektor transfiziert wurde (Spur 1). Also kann man hier, unabhängig von der Expressionsstärke der Mutanten, von einer spezifischen Bindung von PKD an den PDGF Rezeptor ausgehen; das heißt, PKD bindet sowohl an den PDGF Rezeptor-wt als auch an die verkürzten Mutanten. Daraus lässt sich schließen, dass der Carboxyterminus des PDGF Rezeptors für die Bindung nicht essentiell ist, da PKD sonst überhaupt nicht an die Mutanten binden würde. Da sich die Signale der Mutanten-Kopräzipitate nicht voneinander unterscheiden, und ebenso die Mutanten im gleichen Ausmaß exprimiert werden, kann man weiter davon ausgehen, dass weder die zweite Kinasedomäne, noch die Insertionssequenz etwas mit der Bindung an PKD zu tun haben, durch welche sich die verkürzten Mutanten unterscheiden. Als kritische Bereiche für die Assoziation des PDGF Rezeptors mit PKD bleiben somit die erste Kinasedomäne und die Juxtamembranregion, der eine Bedeutung bei der Bindung von PKCs zugemessen wird.

3.3.5.2 Identifizierung PDGF Rezeptor-bindender Regionen von PKD

Von PKD wurden drei C-terminal VSV-getagte verkürzte Mutanten auf gleiche Weise wie vom PDGF Rezeptor hergestellt, außerdem ein VSV-getagtes Konstrukt vom PKD-wt (PKD1). Die erste Mutante (PKD2) wurde um den C-Terminus verkürzt, die zweite (PKD3) außerdem um die Kinasedomäne, und die dritte (PKD4) weist nur noch die cysteinreiche Region auf (Abb. 3.26).

Während PKD3 und PKD4 so gut exprimiert werden wie PKD1 (Abb. 3.28, *oben*, Spuren 2, 4 und 5), hat PKD2 nur eine geringe Expression in HEK 293-Zellen (Spur 3), auch nach Erhöhung der DNA-Menge bei der Transfektion. Wie man sieht, resultiert aus letzterem eine sehr schwache Expression des PDGF Rezeptors (Abb. 3.28, *unten*, Spur 3).

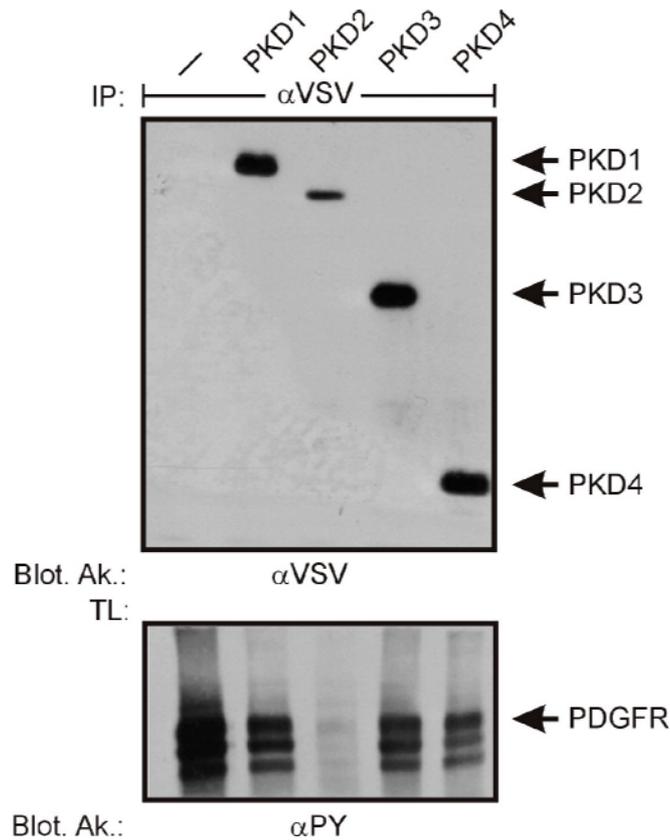


Abb. 3.28: Identifizierung PDGF Rezeptor-bindender Regionen von PKD in HEK 293-Zellen. Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293) wurden transient mit den Konstrukten für den PDGF Rezeptor und zusätzlich mit den VSV-getagten Konstrukten für PKD oder ihre verkürzten Mutanten PKD2, PKD3 und PKD4 kotransfiziert. Nach der Zellyse wurden PKD und ihre Mutanten mit dem monoklonalen Anti-VSV-Antikörper (α -VSV p5D4) immunpräzipitiert. Nach Auftrennung der Immunkomplexe mittels einer 12,5 %igen SDS-PAGE und dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit dem monoklonalen Anti-VSV-Antikörper (α -VSV p5D4) (*oben*). Die PDGFR-Expression in den Totallysaten wurde mit dem monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (α -PY 4G10) immun-detektiert (*unten*).

Die Immundetektion auf kopräzipitierten PDGF Rezeptor in den VSV-Immunpräzipitaten der VSV-PKD-Mutanten und des VSV-wt's zeigt kein Signal (Daten nicht gezeigt). Nachdem gewährleistet wurde, dass die Immunpräzipitation der VSV-PKD-Proteine stattgefunden hat (Abb. 3.28, *oben*) und für die Immundetektion des tyrosinphosphorylierten PDGF Rezeptors ein intakter Antikörper verwendet wurde, und dass der transfizierte PDGF Rezeptor in HEK 293-Zellen einen gut detektierbaren Phosphorylierungsgrad aufweist, ist davon auszugehen, dass der PDGF Rezeptor an keins der VSV-PKD-Proteine gebunden hat. Einen Grund für die inhibierte Assoziation des PDGF Rezeptors mit PKD kann das VSV-tag-Fragment darstellen. In diesem Fall käme für die Region von PKD, die für die Assoziation verantwortlich ist, nur der Carboxyterminus in Frage. Läge sie weiter in aminoterminaler Richtung, müsste zumindest VSV-PKD-wt den PDGF Rezeptor binden, da das tag-Fragment sich aufgrund der Distanz zur Bindestelle nicht mehr hinderlich auswirken dürfte.

3.3.6 Wechselwirkung von PKD mit PLC γ und Syk

Außer der Wechselwirkung von PKD mit dem PDGF Rezeptor wurde in Rat1- und 3T3 L1-Zellen ein weiteres tyrosinphosphoryliertes 150 kDa-Protein im Kopräzipitat von PKD entdeckt, bei dem es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um PLC γ handelt (Abschnitt 3.3.1). Die Wechselwirkung von PLC γ und Syk mit PKD wurde in B-Zellen beschrieben (Sidorenko *et al.*, 1996). Zur weiteren Untermauerung der Identität der 150 kDa-Bande sollte die Wechselwirkung von PKD und PLC γ in den oben beschriebenen transfizierten und endogenen Systemen untersucht werden.

3.3.6.1 Interaktion von PKD mit PLC γ in HEK 293-Zellen

Hierzu wurden HEK 293-Zellen mit den pRK5-Konstrukten für PLC γ und PKD einzeln transfiziert bzw. mit beiden kotransfiziert, und, nach Stimulation mit PDGF, PLC γ oder PKD immunpräzipitiert.

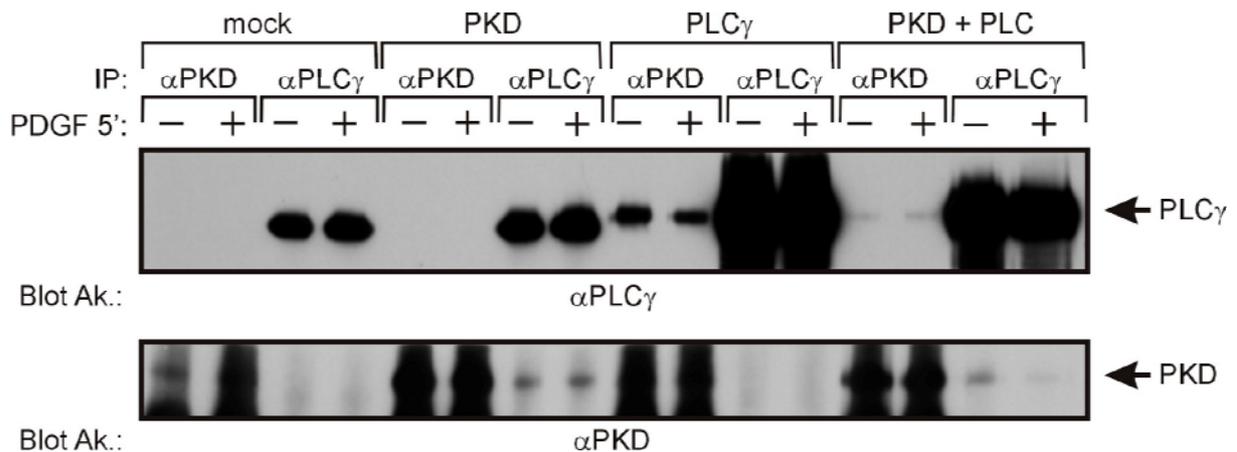


Abb. 3.29: Interaktion von PKD mit PLC γ in HEK 293-Zellen. Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293) wurden transient mit den Konstrukten für den PDGF Rezeptor und zusätzlich mit denen für PKD und PLC γ einzeln oder mit beiden kotransfiziert, serumgehungert und mit PDGF 5 min stimuliert. Nach der Zellyse wurde mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD Sugen) oder dem monoklonalen Anti-PLC γ -Antikörper (α -PLC γ ST) immunpräzipitiert, und die Proteine wurden mittels 7,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit monoklonalem Anti-PLC γ -Antikörper (α -PLC γ ST) (*oben*) und polyklonalem Anti-PKD-Antikörper (α -PKD D20) (*unten*).

In der Immundetektion gegen PLC γ sieht man deutliche stimulationsunabhängige Signale im PKD-Kopräzipitat der Zellen, die mit PLC γ transfiziert wurden (Abb. 3.29, *oben*). Diese Bande erscheint sowohl in den Präzipitaten von Zellen mit endogener PKD (Spuren 9 und 10) als auch von Zellen mit transfizierter PKD (Spuren 13 und 14). Dass die PLC γ -Bande in den kotransfizierten Zellen so schwach ausfällt, liegt an der Konkurrenz beider Konstrukte, ihr Protein zu exprimieren. Die gleichen Beobachtungen lassen sich für PKD machen (Abb. 3.29, *unten*). Auch

hier erscheint eine Bande stimulationsunabhängig im Kopräzipitat von transfizierter (Spuren 15 und 16) und auch von endogener PLC γ (Spuren 7 und 8), jedoch nur in Zellen, die mit PKD transfiziert wurden.

Zusammengefasst lässt sich aussagen, dass eine konstitutive Wechselwirkung zwischen PLC γ und PKD in HEK 293-Zellen vorliegt, die sich jedoch nur nachweisen lässt, wenn mindestens einer der Bindungspartner überexprimiert wird.

3.3.6.2 Interaktion von PKD mit PLC γ in Rat1-Fibroblasten, 3T3 L1-Fibroblasten und Glioblastomzellen

Nachdem die konstitutive Interaktion von PKD und PLC γ in HEK 293-Zellen gezeigt wurde, sollte sie zusätzlich in endogenen Systemen untersucht werden. So wurde sie in den Zellen überprüft, in denen die Wechselwirkung mit dem PDGF Rezeptor nachgewiesen wurde, also in Rat1-Fibroblasten, 3T3 L1-Fibroblasten und den Glioblastomzellen U-1242 und A-172.

Hierzu wurden Rat1-Zellen mit PDGF stimuliert, und PKD oder PLC γ aus dem Zellysat immunpräzipitiert.

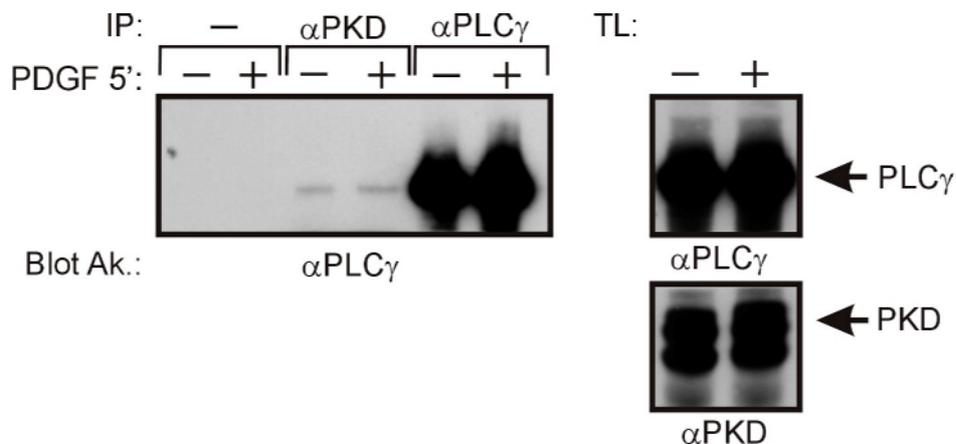


Abb. 3.30: Interaktion von PKD mit PLC γ in Rat1-Zellen. In Abwesenheit von Serum kultivierte Rat1-Zellen wurden 5 min mit PDGF stimuliert. Nach der Zellyse wurde mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD Sugen) oder dem monoklonalen Anti-PLC γ -Antikörper (α -PLC γ ST) immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden mittels 7,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt, und nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit dem α -PLC γ -Antikörper (*links*). Als Expressionskontrolle wurden die Totallysate mit dem α -PLC γ -Antikörper (*rechts, oben*) und polyklonalem Anti-PKD-Antikörper (α -PKD D20) (*rechts, unten*) immundetektiert.

In der Immundetektion lässt sich PKD nicht im Kopräzipitat von PLC γ ausmachen (nicht gezeigt). Jedoch erkennt man im Kopräzipitat von PKD eine schwache konstitutiv bindende Bande in der Höhe von PLC γ in Rat1-Zellen (Abb. 3.30, *links*, Spuren 3 und 4).

In einem weiteren Experiment wurden 3T3 L1-Zellen, A-172- und U-1242-Zellen mit PDGF stimuliert, und Immunpräzipitationen gegen PKD, den PDGF Rezeptor und PLC γ durchgeführt.

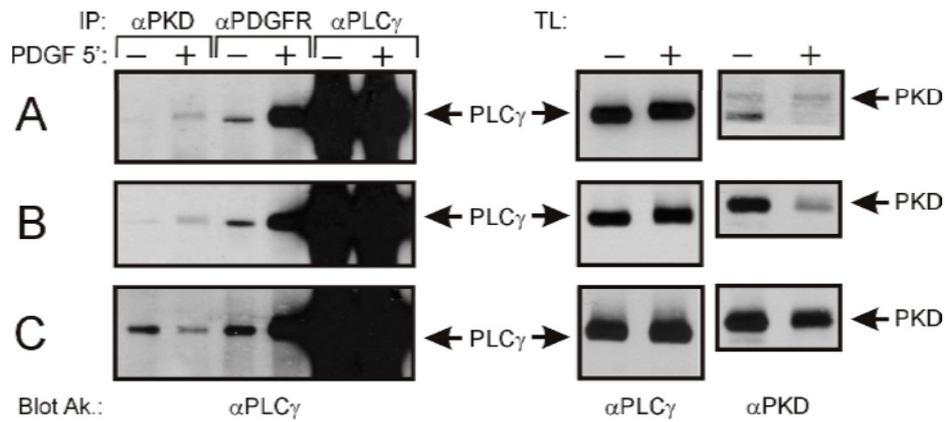


Abb. 3.31: Interaktion von PKD mit PLC γ in 3T3 L1-, A-172- und U-1242-Zellen. In Abwesenheit von Serum kultivierte 3T3 L1-Fibroblasten (A) und Zellen der humanen Glioblastom-Zelllinien A-172 (B) und U-1242 (C) wurden 5 min mit PDGF stimuliert. Nach der Zellyse wurde mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD Sugen), dem polyklonalen Anti-PDGF Rezeptor-Antikörper (α -PDGFR LJ9) oder dem monoklonalen Anti-PLC γ -Antikörper (α -PLC γ ST) immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden mittels 7,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt, und nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit monoklonalem Anti-PLC γ -Antikörper (α -PLC γ ST) (*links*). Als Expressionskontrolle wurden die Totallysate mit dem α -PLC γ -Antikörper (*Mitte*) und polyklonalem Anti-PKD-Antikörper (α -PKD D20) (*rechts*) immundetektiert.

Neben der bereits bekannten induzierten Interaktion von PLC γ mit dem PDGF Rezeptor (Abb. 3.31 A, *links*, Spuren 3 und 4) sieht man in allen drei Zelllinien ebenfalls eine PLC γ -Bande nach der Immunpräzipitation von PKD (Spuren 1 und 2). Hierbei ist sie in 3T3 L1-Zellen und in A-172-Zellen (Abb. 3.31 B, *links*, Spuren 1 und 2) nach Stimulation mit PDGF eindeutig stärker als in unstimulierten Zellen. Also kopräzipitiert PLC γ induziert mit PKD, wie auch mit dem PDGF Rezeptor, während letztere beiden konstitutiv assoziieren.

In U-1242-Zellen ist, im Gegensatz dazu, die Intensität der Bande in der stimulierten Probe schwächer als die aus unstimulierten Zellen (Abb. 3.31 C, *links*, Spuren 1 und 2).

3.3.6.3 Interaktion von PKD mit Syk in HEK 293-Zellen

Nachdem die Wechselwirkung von PKD mit PLC γ in transfizierten und endogenen Systemen außerhalb von B-Zellen gezeigt wurde, sollte ebenfalls die Interaktion von PKD mit Syk untersucht werden.

In transfizierten HEK 293-Zellen wurden, nach Stimulation mit PDGF, PKD, der PDGF Rezeptor oder Syk aus den Zellysaten immunpräzipitiert.

In diesem Experiment bestätigte sich, dass Syk und PKD auch außerhalb von immunologischen Zellsystemen wechselwirken (Abb. 3.32 A). Neben der bereits bekannten Interaktion von Syk mit dem PDGF Rezeptor, die sich hier mit den transfizierten Proteinen nachweisen lässt (*oben*, Spuren 11 und 12; *unten*, Spuren 9 und 10), beobachtet man die Kopräzipitation von PKD sowohl mit endogener (*mitte*, Spuren 5 und 6) als auch mit transfizierter Syk (Spuren 11 und 12).

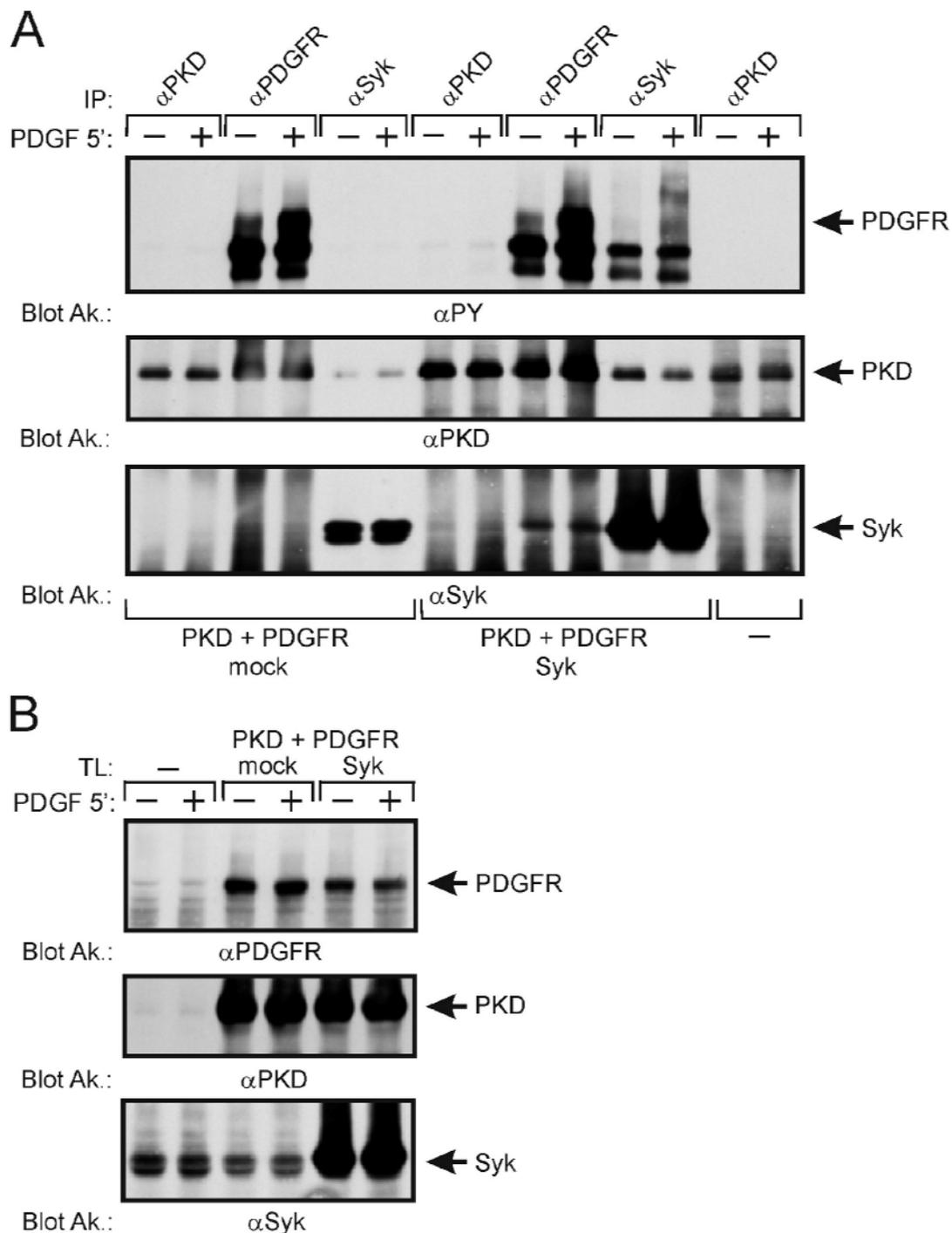


Abb. 3.32: Interaktion von PKD mit Syk in HEK 293-Zellen. Humane embryonale Nierenzellen (HEK 293) wurden transient mit den Konstrukten für PKD, den PDGF Rezeptor und zusätzlich mit oder ohne dem Konstrukt für Syk kotransfiziert, serumgehungert und mit PDGF 5 min stimuliert. Nach der Zellyse wurde mit dem monoklonalen Anti-PKD-Antikörper (α -PKD Sugem), mit dem polyklonalen Anti-PDGF Rezeptor-Antikörper (α -PDGFR LJ9) oder dem monoklonalen Anti-Syk-Antikörper (α -Syk mono) immunpräzipitiert, und die Proteine wurden mittels 7,5 %iger SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulosemembran folgte eine Immunoblot-Analyse mit monoklonalem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper (α -PY 4G10) (A, oben), polyklonalem Anti-PKD-Antikörper (α -PKD D20) (A, mitte) und polyklonalem Anti-Syk-Antikörper (α -Syk C19) (A, unten). Als Expressionskontrolle für die transfizierten Konstrukte wurden die Totallysate mit dem monoklonalen Anti-PDGFR-Antikörper (α -PDGFR ST) (B, oben), dem polyklonalen α -PKD-Antikörper (B, mitte) und dem polyklonalen α -Syk-Antikörper (B, unten) immundetektiert.

4 DISKUSSION

4.1 Transmodulation des EGF Rezeptors durch PKD

Die Transmodulation des EGF Rezeptors wurde bereits in den frühen Achtzigern beobachtet und ist durch drei wichtige Merkmale charakterisiert. So beobachtete man neben der Inhibition der EGF-Ligandenbindung an den Rezeptor eine Abnahme der Tyrosinphosphorylierung und gleichzeitig eine gesteigerte Serin-/Threoninphosphorylierung des EGF Rezeptors (Friedman *et al.*, 1984; Hunter *et al.*, 1984).

Letztere beiden Merkmale wurden im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Hierbei wurde jedoch eine Abnahme der EGF-induzierten Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptors durch Kostimulation mit PDGF oder TPA in Rat1- und 3T3 L1-Zellen nicht beobachtet, übereinstimmend mit früheren Daten (Bagowski, 1998).

Hingegen wurde in dieser Arbeit ein Anstieg der Threoninphosphorylierung des EGF Rezeptors nach PKC-Aktivierung bestätigt. Desweiteren wurde die Rolle von PKD in diesem Prozess durch den Einsatz der dominant-negativen PKD-KMDA-Mutante in HEK 293-Zellen, Cos7-Zellen und Rat1-Zellen verifiziert. Hierbei wird sowohl in HEK 293- als auch in Cos7-Zellen in Anwesenheit des transfizierten PKD-wt's eine Verstärkung der basalen Threoninphosphorylierung des EGF Rezeptors beobachtet, die nach TPA-Stimulation deutlich gesteigert wird. Dieser Effekt wird in Zellen, die mit der KMDA-Mutante infiziert wurden, nicht beobachtet. Dies spricht deutlich für die Relevanz von PKD in dem Mechanismus der PKC-vermittelten Threoninphosphorylierung des EGF Rezeptors.

Einen Hinweis auf die PKD-Abhängigkeit der PKC-induzierten Threoninphosphorylierung des EGF Rezeptors lieferten bereits Ergebnisse von (Bagowski *et al.*, 1999), welche die Phosphorylierung des EGF Rezeptors an den wichtigen Threoninresten 654 und 669 durch PDGF nachwiesen. Threonin 456 wurde zuvor als ein wichtiges Substrat für PKCs ermittelt, dessen Phosphorylierung einer Verminderung der Tyrosinkinaseaktivität des EGF Rezeptors führt (Hunter *et al.*, 1984; Davis und Czech, 1985). Threonin 669 wurde als Hauptphosphorylierungsstelle nach der Stimulation mit Phorbolestern identifiziert (Heisermann und Gill, 1988), außerdem ist es ein Substrat für MAP Kinasen (Northwood *et al.*, 1991; Takishima *et al.*, 1991).

In 293-Zellen wurde in dieser Arbeit desweiteren eine Assoziation der transfizierten PKD mit dem transfizierten EGF Rezeptor beobachtet, die im Falle des TPA-induzierten PKD-wt's eine Steigerung erfährt. Da PKD eine reine Serinkinase ist (Dieterich *et al.*, 1996; Nishikawa *et al.*,

1997), ist eine direkte Threoninphosphorylierung des EGF Rezeptors durch PKD nicht möglich. Somit muss mindestens ein weiteres Bindeglied zwischen PKD und dem EGF Rezeptor in dem Transmodulationsprozess existieren, das, von PKD aktiviert, eventuell einen Komplex mit PKD und dem EGF Rezeptor bildet und dessen Threoninphosphorylierung bewirkt. Da das Threonin 669 des EGF Rezeptors durch MAP Kinasen phosphoryliert wird, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Frage geprüft, ob PKD die Threoninphosphorylierung des EGF Rezeptors über MAP Kinasen vermittelt, jedoch kein Effekt von PKD auf MAP Kinasen festgestellt. Hingegen belegen neueste Ergebnisse von (Brändlin *et al.*, 2002) die Aktivierung der MAP Kinase ERK durch PKD im Komplex mit PKC η . Hieraus ergibt sich die Möglichkeit einer Rolle für PKD bei der Phosphorylierung des Threonin 669 durch MAP Kinasen.

Allerdings ist auch die Möglichkeit einer, womöglich direkten, Serinphosphorylierung des EGF Rezeptors durch PKD nicht auszuschließen. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit aufgrund unzureichender Qualität der verfügbaren Antikörper nicht geprüft werden.

In Cos7-Zellen wurde die Assoziation von PKD mit dem EGF Rezeptor nicht beobachtet, sie scheint zelltypspezifisch zu sein. Andererseits wurde die Wechselwirkung, auch im Rahmen dieser Arbeit, weder in endogenen Systemen, noch im Falle nur eines überexprimierten Partners beobachtet, womit ihre biologische Relevanz fragwürdig bleibt.

4.2 JNK-Inhibition durch PKD

Als Folge der PDGF-induzierten EGF Rezeptortransmodulation zeigten (Bagowski *et al.*, 1999) die Inhibition des EGF-induzierten JNK-Signalweges in Rat1-Zellen. In dieser Arbeit wurde die Rolle von PKD für die JNK-Inhibition durch den Einsatz der dominant-negativen PKD-KMDA-Mutante in Rat1-Zellen verifiziert und darüberhinaus eine Ligandenspezifität für diesen Prozess nachgewiesen. So wird die Aktivierung von PKD sowohl durch RTK n als auch durch GPCR n vermittelt (Zugaza *et al.*, 1997), jedoch wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Inhibition der EGF-induzierten JNK-Aktivierung nicht mit allen untersuchten Liganden zu erreichen ist.

Die Kostimulation mit PDGF ruft die Inhibition der EGF-induzierten JNK-Aktivierung in Rat1-Zellen hervor. In Gegenwart der dominant-negativen PKD-Mutante, welche die endogene PKD-Aktivität supprimiert, ist die EGF-induzierte JNK-Aktivität doppelt so hoch wie in Zellen, die mit PKD-wt infiziert wurden, ebenso die Basalaktivität. Dies untermauert die Tatsache, dass PDGF-induzierte PKD die EGF-induzierte JNK-Aktivität unterdrückt und ist übereinstimmend mit den Daten von (Bagowski *et al.*, 1999), welche die JNK-Inhibition als Folge der bereits gezeigten PKC-vermittelten EGF Rezeptortransmodulation durch PDGF darstellen (Friedman *et al.*, 1984; Hunter *et al.*, 1984).

Die Liganden Endothelin-1 und LPA, welche an GPCRn binden, stimulieren PKD in Rat1-Zellen noch effizienter als PDGF. Dennoch wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, dass die Stimulation dieser Zellen mit LPA oder Endothelin unterschiedliche Wirkungen auf den JNK-Signalweg zeigen. So wird die EGF-induzierte JNK-Aktivität durch Endothelin, ebenso wie durch PDGF, supprimiert. Die Kostimulation mit LPA hingegen beeinflusst die EGF-induzierte JNK-Aktivität eher in positiver Weise, was durch den Einsatz der KMDA-Mutante nahezu aufgehoben wird. Ein Anhaltspunkt für diese so offensichtlich unterschiedlichen PKD-vermittelten Mechanismen auf die JNK-Aktivität bildet die PKD-Aktivierung durch Endothelin und LPA über verschiedene G-Proteine. So vermitteln die Rezeptoren für Endothelin die PKD-Aktivierung über heterotrimäre G_q -Proteine (Zugaza *et al.*, 1997), deren α -Untereinheiten vor allem die Aktivierung von PLC β bewirken (Smrcka *et al.*, 1991; Wu *et al.*, 1993). LPA hingegen aktiviert PKD über PLCs und PKCs sowohl über G_q -Proteine als auch über die Pertussistoxin-sensitiven inhibitorischen G_i -Proteine (Paolucci *et al.*, 2000). Hierbei aktivieren die $\beta\gamma$ -Untereinheiten der letzteren auch PLC β (Katz *et al.*, 1992; Park *et al.*, 1993), während ihre α -Untereinheit die Aktivierung von Adenylatzyklasen (ACn) unterbindet (Wong *et al.*, 1991; Wong *et al.*, 1992). Eine Rolle für PKD in der Phorbol ester-vermittelten Inhibition der Glukagon-induzierten cAMP-Produktion wurde bereits aufgezeigt (Tobias *et al.*, 1997). Desweiteren wurde die Inhibition von JNK und demzufolge der c-Jun-Phosphorylierung durch das Neuropeptid PACAP (pituitary adenylate cyclase activating polypeptide) in Makrophagen, T-Zellen und Neuronen nachgewiesen (Shioda *et al.*, 1998; Delgado und Ganea, 2000; Wang *et al.*, 2000), wohingegen in Rattenastrozyten die Aktivierung von ERK2 durch PACAP gezeigt wurde (Moroo *et al.*, 1998).

Aus diesen Tatsachen ergibt sich, dass PKD sowohl durch Endothelin als auch durch LPA durch $G_q\alpha$ -Untereinheiten über PLCs aktiviert wird. Darüber hinaus bewirkt LPA die PLC-vermittelte PKD-Aktivierung zusätzlich über $G_i\beta\gamma$ -Untereinheiten. Da bekannt ist, dass $G\beta\gamma$ -Untereinheiten allgemein PKD über ihre PH-Domäne binden (Jamora *et al.*, 1999), erschließt sich die Möglichkeit eines Mechanismus, in dem PKD durch die $G\beta\gamma$ -Untereinheit des inhibitorischen G_i -Proteins sowohl aktiviert als auch an die Plasmamembran rekrutiert wird, um in die räumliche Nähe der $G_i\alpha$ -Einheit zu gelangen. Dort könnte PKD dann in die Inhibition der durch Glukagon oder andere Agonisten induzierten cAMP-Produktion involviert werden.

Weiterhin könnte dadurch ein inhibitorischer Effekt von cAMP auf JNK aufgehoben werden, was trotz der EGF Rezeptortransmodulation zu einer höheren JNK-Aktivität führen kann. Es besteht außerdem die Möglichkeit, dass sowohl die durch fehlendes cAMP geringere ERK-

Aktivität als auch eine Rekrutierung von PKD durch $\beta\gamma$ -Untereinheiten für den Einsatz der AC-Inhibition zu einer verminderten Threoninphosphorylierung des EGF Rezeptors führen kann, und die JNK-Inhibition auch von dieser Seite aufgehoben wird. Beide Möglichkeiten würden erklären, wieso die JNK-Aktivität bei Kostimulation mit EGF und LPA doppelt so hoch ist wie mit EGF alleine, wenn die LPA-vermittelte Inhibition der cAMP-Produktion durch die $G_i\alpha$ -Untereinheit nicht erfolgt. In Anwesenheit der dominant-negativen PKD-Mutante, welche die endogene PKD-Aktivität supprimiert, erfolgt dagegen keine Steigerung der EGF-induzierten JNK-Aktivität, weil die nötige Beteiligung von PKD bei der LPA-vermittelten Inhibition der cAMP-Produktion fehlt, und so der inhibitorische Effekt von cAMP auf JNK nicht aufgehoben werden kann.

Eine weitere interessante Fragestellung ergibt sich dadurch, dass Endothelin, welches bekannterweise Transaktivierung des EGF Rezeptors in Rat1-Zellen bewirkt (Daub *et al.*, 1996), ebenso zur gleichen Zeit die Aktivierung von PKD und somit die Transmodulation des EGF Rezeptors und die darauf folgende JNK-Inhibition herbeiführt, wie in dieser Arbeit beschrieben wurde. Es besteht also die Möglichkeit, dass Tyrosinphosphorylierung und Threoninphosphorylierung des EGF Rezeptors zur gleichen Zeit stattfinden, worauf im nächsten Abschnitt weiter eingegangen wird.

4.3 PKC-vermittelte Transaktivierung des EGF Rezeptors

Neben der negativ-regulatorischen Transmodulation des EGF Rezeptors ist ebenfalls eine positive Regulation bekannt, welche die Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptors bewirkt und vor allem durch GPCRn herbeigeführt wird. Dieses Phänomen wurde in den letzten Jahren intensiv untersucht und Ereignisse dieser Art unter dem Begriff Transaktivierung zusammengefasst (Daub *et al.*, 1996).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gefunden, dass in Rat1-Zellen eine Tyrosinphosphorylierung des EGF Rezeptors durch den PDGF Rezeptor stattfindet. Diese Transaktivierung ist PKC-abhängig und kann auch durch Phorbolster direkt ausgelöst werden. In 3T3 L1-Zellen hingegen findet man zwar auch eine PDGF-induzierte PKC-abhängige Transaktivierung des EGF Rezeptors, diese ist jedoch nach Stimulation mit TPA nicht zu beobachten. Diese Tatsache lässt auf eine Involvierung von PKCs der Phorbolster-unabhängigen atypischen PKCs in diesen Vorgang schließen.

Die Beobachtungen der EGF Rezeptor-Transaktivierung durch den PDGF Rezeptor wurden kurze Zeit später in zwei Publikationen anderer Arbeitsgruppen bestätigt, die ebenfalls einen derar-

tigen Mechanismus beschrieben. So wurde in B82L-Fibroblasten gezeigt, dass eine Transaktivierung des EGF Rezeptors durch den PDGF Rezeptor stattfindet, und dass diese Wechselwirkung essentiell für die Zellmotilität ist (Li *et al.*, 2000). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte darüber hinaus, dass die Heterodimerisierung des PDGF Rezeptors mit dem EGF Rezeptor essentiell für die Transaktivierung des EGF Rezeptors ist (Saito *et al.*, 2001).

Die Ergebnisse dieser Arbeit und der Publikationen belegen die Transaktivierung des EGF Rezeptors durch den PDGF Rezeptor in verschiedenen Zelltypen, wodurch sich eine Allgemeingültigkeit dieses Mechanismus' ergibt. Außerdem wurde in dieser Arbeit die zelltypspezifische Involvement sowohl von Phorbolster-abhängigen als auch -unabhängigen PKCs gezeigt. Darüber hinaus wird ersichtlich, dass die oben aufgestellte These der gleichzeitigen Tyrosin- und Threoninphosphorylierung des EGF Rezeptors durch Endothelin ebenfalls durch PDGF bewirkt werden kann.

Die Transaktivierung des EGF Rezeptors durch GPCRn erfolgt bekannterweise durch die extrazelluläre Aktion von Metalloproteasen (Prenzel *et al.*, 1999). Diese kann sowohl durch Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration oder Tyrosinphosphatasen erfolgen als auch durch PKC, die nachweislich zur Freisetzung der EGF-ähnlichen Liganden HB-EGF, AR und TGF α führt (Massague und Pandiella, 1993; Goishi *et al.*, 1995; Hooper *et al.*, 1997). Also ist auch im Falle der Stimulation mit Endothelin neben einer PKC-vermittelten Transmodulation des EGF Rezeptors, ebenso die PKC-vermittelte Transaktivierung des EGF Rezeptors möglich, wie im Rahmen dieser Arbeit durch den PDGF Rezeptor gezeigt wurde. Ob PKD nur bei der Transmodulation des EGF Rezeptors oder auch im Prozess der Transaktivierung involviert ist, bleibt zu untersuchen.

Aus der Möglichkeit der nebeneinander bestehenden Tyrosin- und Threoninphosphorylierung des EGF Rezeptors kann sich ein allgemeingültiger Regulationsmechanismus für den EGF Rezeptor ergeben, dessen Aktivierung und anschließende Desensitivierung und Endozytose bekannterweise zeitlich eng verknüpft sind. Die Feinabstimmung dieser Abläufe könnte zum Beispiel auf dem zeitlichen Ablauf der PKD-Aktivierung durch verschiedene RTKs und GPCRn beruhen.

4.4 Assoziation von PKD mit dem PDGF Rezeptor und seinen Substraten

Zur weiteren Aufklärung des Mechanismus' der EGF Rezeptortransmodulation und der Rolle von PKD in diesem Prozess wurden die Wechselwirkungen für PKD mit anderen Proteinen dieses Signalweges untersucht.

Dabei wurde in 3T3 L1-Zellen unter endogenen Bedingungen die bisher nicht bekannte Assoziation von PKD mit dem PDGF Rezeptor nachgewiesen, die unabhängig von der Aktivierung beider Bindungspartner und der von PKCs ist und somit konstitutiven Charakter hat. Diese Wechselwirkung wurde ebenfalls in NIH 3T3-Zellen und in Rat1-Zellen gefunden, aber auch in humanen Glioblastomzellen. Dies legt eine universelle Bedeutung dieser Assoziation nahe, die sowohl in Nagetierzellen als auch in humanen Zellen, und in gesunden Fibroblasten wie auch in entarteten Zellen stattfindet.

Weitere Untersuchungen in transfizierten HEK 293-Zellen, für die u.a. *getagte* PDGF Rezeptor-Konstrukte verwendet wurden, untermauerten die Assoziation von PKD und dem PDGF Rezeptor und zeigten die PDGF-abhängige Tyrosinphosphorylierung von PKD auf, welche auch in dieser Arbeit in endogenen Systemen beobachtet wurde. Auch (Sidorenko *et al.*, 1996) konnten die basale Tyrosinphosphorylierung von PKD in B-Zellen nachweisen, jedoch sind bis jetzt weder bestimmte Tyrosinphosphorylierungsstellen dieses Proteins bekannt, noch wurde untersucht, ob es sich um Trans- oder Autophosphorylierung von PKD handelt.

Beim Einsatz der Kinase-inaktiven K612M-Mutante von PKD wurde eine Verstärkung der Tyrosinphosphorylierung beobachtet, die nach Stimulation mit PDGF weiter zunahm. So kann mit der Abwesenheit der ATP-Bindestelle ein regulatorisches Element verloren gegangen sein, durch das die Tyrosinphosphorylierung von PKD im kontrollierten Maßstab erfolgen würde. Zumindest korreliert die Tyrosinphosphorylierung von PKD nicht mit ihrer Fähigkeit, Proteine zu phosphorylieren, was auch von (Sidorenko *et al.*, 1996) nachgewiesen wurde.

Die Assoziation von PKD und dem PDGF Rezeptor allerdings behält ihren konstitutiven Charakter, auch unabhängig vom Phosphorylierungsgrad von PKD und ihrer Fähigkeit ATP zu binden.

Weitere, bereits bekannte, Bindungspartner von PKD sind PLC γ und Syk, deren Assoziationen mit PKD in B-Zellen untersucht wurden (Sidorenko *et al.*, 1996). In dieser Arbeit wurde auch in 3T3 L1-Zellen und Rat1-Zellen, sowie in den verwendeten Glioblastom-Zelllinien, und darüber hinaus in transfizierten HEK 293-Zellen die Wechselwirkung von PKD mit PLC γ nachgewiesen. Im Gegensatz zu der konstitutiven Wechselwirkung von PKD mit dem PDGF Rezeptor ist diese

Assoziation in endogenen Systemen induzierter Natur, ebenso wie die von PLC γ mit dem PDGF Rezeptor, ein Anhaltspunkt dafür, dass PKD nicht indirekt über PLC γ an den PDGF Rezeptor bindet.

Lediglich in HEK 293-Zellen, die PLC γ oder PKD und zusätzlich den PDGF Rezeptor überexprimieren, wurde eine konstitutive Assoziation von PLC γ und PKD gefunden. Diese lässt sich auf eine höhere Basalaktivität des überexprimierten PDGF Rezeptors zurückführen, der so zur konstitutiven Aktivierung von PLC γ führt, welche daraufhin an den PDGF Rezeptor und an PKD bindet.

Ein weiterer Bindungspartner von PKD in B-Zellen ist Syk, dessen Expression in den hier verwendeten Systemen gering ist. Eine Wechselwirkung mit PKD wurde jedoch in mit PKD und Syk transfizierten HEK 293-Zellen nachgewiesen.

So ergibt sich ein Modell, in dem PKD konstitutiv an den PDGF Rezeptor gebunden vorliegt, welcher bekannterweise nach seiner Aktivierung PLC γ über ihre SH2-Domäne rekrutiert und sie durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert. PLC γ wiederum führt zur PKC-abhängigen Aktivierung von PKD. Ob PLC γ direkt mit PKD assoziiert, bleibt unklar, ist jedoch wahrscheinlich, da in B-Zellen eine solche Interaktion bereits nachgewiesen wurde (Sidorenko *et al.*, 1996). Hier wurde ein Mechanismus gefunden, der Parallelen zu den Ergebnissen dieser Arbeit aufweist. So liegt PKD in B-Zellen konstitutiv assoziiert sowohl mit dem B-Zellrezeptor (BCR) als auch mit Syk und PLC γ vor. Die Aktivierung von Syk, welches auch ständig an den BCR gekoppelt ist, führt zur Rekrutierung und Aktivierung von PLC γ , die wiederum PKD aktiviert. Daraufhin bewirkt PKD die Inhibition der Syk-vermittelten Tyrosinphosphorylierung von PLC γ . *In vitro* wurde gezeigt, dass PKD Syk und PLC γ an Serinresten phosphorylieren kann, was sich inhibitorisch auf diese Kinasen auswirkt. Es bleibt lediglich unklar, ob PKD die Phosphorylierung von PLC γ durch Syk direkt inhibiert oder sie durch Bindung an PLC γ sterisch blockiert. Auf jeden Fall kann PKD die Rolle in einem negativen Rückkopplungsmechanismus zugeschrieben werden, so wie sie auch durch verschiedene PKC-Isoformen auf andere zytoplasmatische Tyrosinkinase oder auf RTKn ausgeübt wird, wie z.B. durch PKC α unter Einbeziehung von PLC γ auf den EGF Rezeptor, den PDGF Rezeptor und den Insulinrezeptor (Seedorf *et al.*, 1995).

Anders als der BCR in Lymphozyten koppelt der PDGF Rezeptor direkt an PLC γ , so dass Syk, welches in diesem System nur gering exprimiert wird, keine Relevanz zukommt. Überträgt man den in Lymphozyten gefundenen Mechanismus auf die in dieser Arbeit untersuchten Systeme, so ist der PDGF Rezeptor äquivalent zu dem BCR und Syk, die konstitutiv an PKD assoziiert sind. PKD würde dann, parallel zu der Syk-vermittelten PLC γ -Aktivierung in B-Zellen, die Tyro-

sinphosphorylierung von PLC γ durch den PDGF Rezeptor verhindern. Dass PKD und PLC γ hier lediglich nach RTK-Aktivierung assoziieren, während sie in B-Zellen einen Komplex mit Syk und dem BCR bilden, scheint ein zelltypspezifisches Phänomen zu sein.

Da auch die Aktivierung von PKD durch den T-Zellrezeptor, den Fc ϵ 1 Rezeptor und den Rezeptor für CD19 belegt wurde, lässt sich hier auf einen allgemeingültigen Mechanismus schließen, in dem der konstitutiven Assoziation von PKD an Antigenrezeptoren oder Wachstumsfaktorrezeptoren aufgrund des negativen Rückkopplungsmechanismus' auf PLC γ oder auf Rezeptorkinasen eine physiologische Bedeutung zukommt.

Die Verwendung von C-terminal VSV-getagten C-terminal verkürzten Mutanten beider Proteine gab Aufschluss über die Regionen, die verantwortlich für die Assoziation sind. So legt die Bindung sowohl des VSV-PDGF Rezeptor-wt's als auch der generierten PDGF Rezeptor-Mutanten bei der Assoziation mit PKD die Involvierung des ersten Abschnitts der Kinasedomäne oder der Juxtamembranregion des PDGF Rezeptors nahe, so wie es bereits für den EGF Rezeptor gefunden wurde, der PKC α über diesen Bereich bindet (Seedorf *et al.*, 1995). Dieser Abschnitt weist zwei Tyrosinphosphorylierungsstellen auf, die u.a. verantwortlich für die Bindung von Src Kinasen sind (Mori *et al.*, 1993), welche die effiziente Phosphorylierung anderer Rezeptor-assoziierten Proteine, wie z.B. PLC γ bewirken (DeMali und Kazlauskas, 1998). Jedoch wurde ebenfalls die Phosphorylierung des PDGF β Rezeptors am Tyr934 durch Src Kinasen nachgewiesen, die sich negativ-regulatorisch auf die Phosphorylierung und Aktivierung von PLC γ auswirkt. Diese Tatsache könnte Licht auf einen Mechanismus werfen, in dem PKD über Src (welches die Rolle von Syk in B-Zellen einnehmen könnte) an den PDGF Rezeptor gekoppelt wird und über Src die Inhibition von PLC γ bewirkt.

Der Carboxyterminus des PDGF Rezeptors, der verantwortlich für die PLC γ -Bindung ist, scheint hingegen keine Relevanz für die Assoziation mit PKD zu haben. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die indirekte Kopplung von PKD über PLC γ an den PDGF Rezeptor ausgeschlossen ist. Analog hierzu ist bereits bekannt, dass der Carboxyterminus des EGF Rezeptors nicht essentiell für die Bindung von PKC α ist. Allerdings wird dieser Abschnitt, welcher die Bindestelle für PLC γ enthält, für die PKC-vermittelte Endozytose und Degradation des EGF Rezeptors benötigt (Seedorf *et al.*, 1995). Hiermit eröffnet sich die Möglichkeit, dass PKD durch die konstitutive Assoziation an den PDGF Rezeptor, nach Aktivierung durch diesen, ebensolche Langzeiteffekte auf ihn ausübt.

Die Untersuchungen mit den verkürzten VSV-PKD-Mutanten zeigen durch die Tatsache, dass weder der VSV-PKD-wt, noch die PKD-Mutanten an den PDGF Rezeptor binden, die Möglich-

keit auf, dass das VSV-Proteinfragment sich störend auf die Bindung an den PDGF Rezeptor auswirkt. Hieraus ergibt sich mit großer Wahrscheinlichkeit, dass der Carboxyterminus von PKD verantwortlich für die Assoziation mit dem PDGF Rezeptor ist.

Weiterhin zeigen Ergebnisse von (Li und Pierce, 1996) die direkte ligandenabhängige Assoziation *in vivo* des PDGF Rezeptors mit PKC δ , und ihre anschließende Aktivierung durch den Rezeptor. Im Gegensatz zu den meisten bekannten Substratproteinen des PDGF Rezeptors weist PKC δ keine SH2-Domänen auf, so dass der Assoziationsmechanismus auf andere Weise erfolgen muss. Obwohl die Bindung von PKD konstitutiver Natur ist, lässt sich nicht ausschließen, dass sie analog zur PKC δ -Bindung an den PDGF Rezeptor oder zur PKC α -Bindung an den EGF Rezeptor erfolgt.

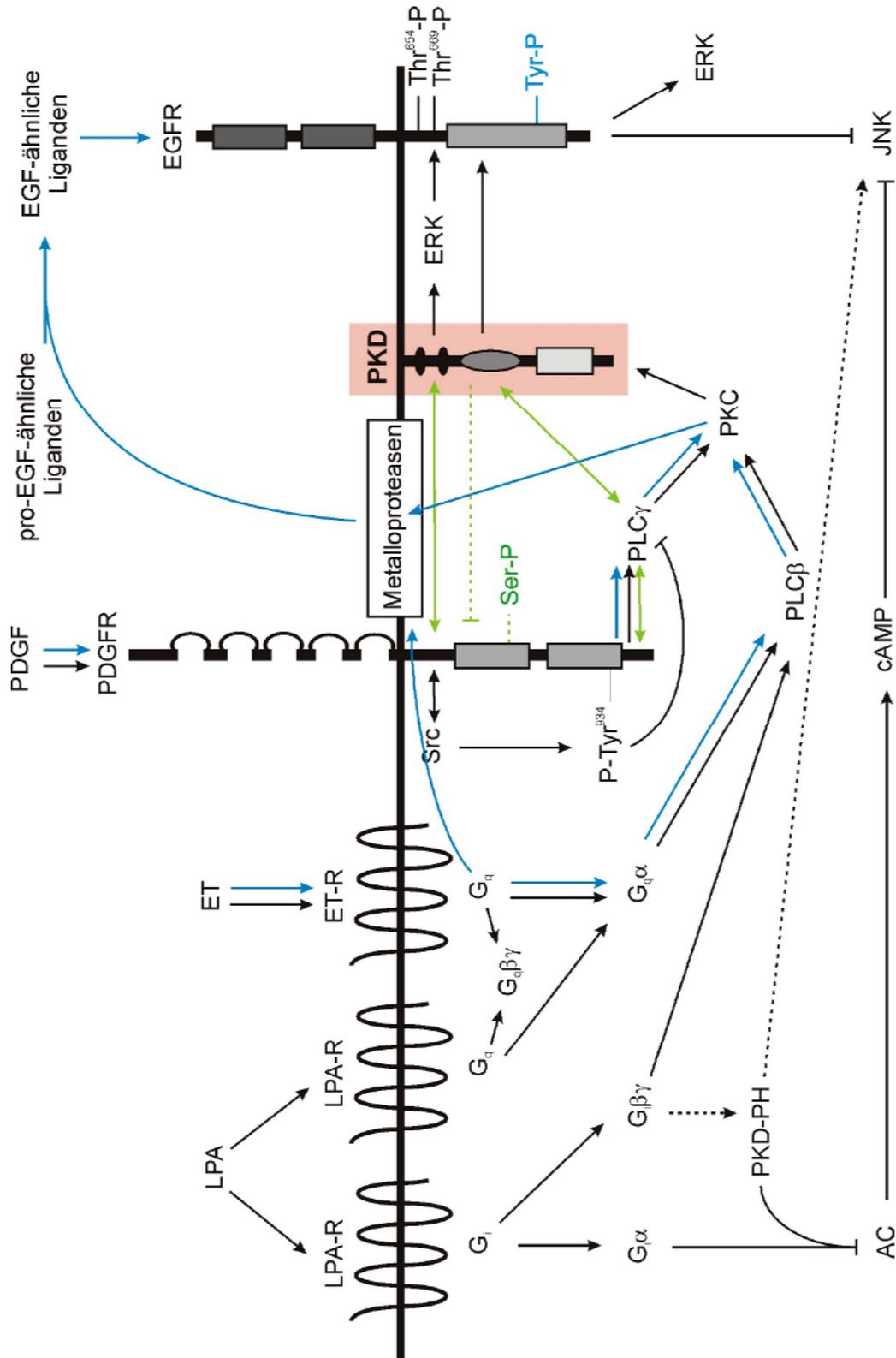


Abb. 4.1: Transmodulation und Transaktivierung des EGF Rezeptors durch den PDGF Rezeptor und GPCRn und die Rolle von PKD. In dieser Abbildung werden die Ergebnisse dieser Arbeit im Zusammenhang mit zuvor publizierten Ergebnissen dargestellt. Zur Hervorhebung des zentralen Proteins dieser Arbeit wird PKD rosa hinterlegt. Durchgezogene Pfeile: belegter Signalweg; gestrichelte Pfeile: vermuteter Signalweg; beidseitige Pfeile: Assoziation von zwei Proteinen; schwarze Pfeile: Transmodulationsprozesse; blaue Pfeile: Transaktivierungsprozesse; grüne Pfeile: Assoziationskomplexe.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum ersten Mal die PKC-vermittelte Inhibition der EGF-induzierten JNK-Aktivität durch GPCRn gezeigt, die durch Transmodulation des EGF Rezeptors verursacht wird. Darüber hinaus wurde anhand einer dominant negativen Mutante der Effekt von PKD auf diesen Prozess nachgewiesen und ihre Rolle in der bereits durch (Bagowski *et al.*, 1999) beschriebenen PDGF-vermittelten JNK-Inhibition verifiziert.

Weiterhin wurde gezeigt, dass die Liganden Endothelin und LPA, die ihre Signale über verschiedene G-Proteine vermitteln, in Rat1-Zellen über die Aktivierung von PKD unterschiedliche Signalwege verfolgen. So vermittelt Endothelin, welches PKD über G_q-Proteine aktiviert, ebenso wie PDGF die Inhibition der EGF-induzierten JNK-Aktivierung. Hingegen führt LPA, welches PKD zusätzlich über G_i-Proteine stimuliert, zu einer Verdopplung der EGF-induzierten JNK-Aktivität.

Neben der EGF Rezeptortransmodulation wurden in dieser Arbeit Untersuchungen zu seiner Transaktivierung durchgeführt. Hier wurde zum ersten Mal die PKC-abhängige Transaktivierung des EGF Rezeptors durch PDGF gezeigt. Hierbei werden dazu in Rat1-Zellen Phorbolster-abhängige PKCs, in 3T3 L1-Zellen dagegen Phorbolster-unabhängige PKCs benötigt.

Weiterhin wurde im Rahmen dieser Arbeit die konstitutive Assoziation von PKD mit dem PDGF Rezeptor nachgewiesen, die sowohl in gesunden Nagetierzellen als auch in humanen Glioblastomzellen stattfindet. Verantwortlich für diese Bindung scheint der Juxtamembranbereich des PDGF Rezeptors zu sein, während bei PKD mit hoher Wahrscheinlichkeit der Carboxyterminus involviert ist.

Auch die aus B-Zellen bereits bekannten Interaktionen von PKD mit PLC γ und Syk (Sidorenko *et al.*, 1996) wurden untersucht, und die PDGF-induzierte Assoziation von PKD mit PLC γ in denselben Systemen nachgewiesen, in denen auch die Assoziation von PKD mit dem PDGF Rezeptor gezeigt wurde. Eine Assoziation von PKD mit Syk fand sich dagegen nur in HEK 293-Zellen, die PKD und Syk überexprimierten.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- Allen, L. F., R. J. Lefkowitz, M. G. Caron und S. Cotecchia (1991). "G-protein-coupled receptor genes as protooncogenes: constitutively activating mutation of the alpha 1B-adrenergic receptor enhances mitogenesis and tumorigenicity." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(24): 11354-11358.
- Alroy, I. und Y. Yarden (1997). "The ErbB signaling network in embryogenesis and oncogenesis." *FEBS Lett*, **410**: 83-86.
- Asada, A., Y. Zhao, S. Kondo und M. Iwata (1998). "Induction of thymocyte apoptosis by Ca²⁺-independent protein kinase C (nPKC) activation and its regulation by calcineurin activation." *J Biol Chem*, **273**(43): 28392-28398.
- Asaoka, Y., S. Nakamura, K. Yoshida und Y. Nishizuka (1992). "Protein kinase C, calcium and phospholipid degradation." *Trends Biochem Sci*, **17**(10): 414-417.
- Asaoka, Y., K. Yoshida, M. Oka, T. Shinomura, H. Mishima, S. Matsushima und Y. Nishizuka (1992). "The signal-induced phospholipid degradation cascade and protein kinase C activation." *Ciba Found Symp*, **164**: 50-59; discussion 59-65.
- Bagowski, C. P. (1998). Regulation des Epidermalen Wachstumsfaktor Rezeptors durch Serin/Threoninphosphorylierung. Fakultät für Chemie. Berlin, Freie Universität.
- Bagowski, C. P., M. Stein-Gerlach, A. Choidas und A. Ullrich (1999). "Cell-type specific phosphorylation of threonines T654 and T669 by PKD defines the signal capacity of the EGF receptor." *Embo J*, **18**(20): 5567-5576.
- Bankaitis, V. A. (2002). "Cell biology. Slick recruitment to the Golgi." *Science*, **295**(5553): 290-291.
- Barbier, A. J., H. M. Poppleton, Y. Yigzaw, J. B. Mullenix, G. J. Wiepz, P. J. Bertics und T. B. Patel (1999). "Transmodulation of epidermal growth factor receptor function by cyclic AMP-dependent protein kinase." *J Biol Chem*, **274**(20): 14067-14073.
- Barnard, D., B. Diaz, D. Clawson und M. Marshall (1998). "Oncogenes, growth factors and phorbol esters regulate Raf-1 through common mechanisms." *Oncogene*, **17**(12): 1539-1547.
- Baron, C. L. und V. Malhotra (2002). "Role of diacylglycerol in PKD recruitment to the TGN and protein transport to the plasma membrane." *Science*, **295**(5553): 325-328.

- Bennett, A. M., S. F. Hausdorff, A. M. O'Reilly, R. M. Freeman und B. G. Neel (1996). "Multiple requirements for SHPTP2 in epidermal growth factor-mediated cell cycle progression." *Mol Cell Biol*, **16**(3): 1189-1202.
- Bergsten, E., M. Uutela, X. Li, K. Pietras, A. Ostman, C. H. Heldin, K. Alitalo und U. Eriksson (2001). "PDGF-D is a specific, protease-activated ligand for the PDGF beta-receptor." *Nat Cell Biol*, **3**(5): 512-516.
- Berridge, M. J. (1993). "Inositol trisphosphate and calcium signalling." *Nature*, **361**(6410): 315-325.
- Berridge, M. J. und R. F. Irvine (1989). "Inositol phosphates and cell signalling." *Nature*, **341**(6239): 197-205.
- Betsholtz, C., A. Johnsson, C. H. Heldin, B. Westermark, P. Lind, M. S. Urdea, R. Eddy, T. B. Shows, K. Philpott, A. L. Mellor und et al. (1986). "cDNA sequence and chromosomal localization of human platelet-derived growth factor A-chain and its expression in tumour cell lines." *Nature*, **320**(6064): 695-699.
- Blume-Jensen, P., L. Claesson-Welsh, A. Siegbahn, K. M. Zsebo, B. Westermark und C. H. Heldin (1991). "Activation of the human c-kit product by ligand-induced dimerization mediates circular actin reorganization and chemotaxis." *Embo J*, **10**(13): 4121-4128.
- Bonfini, L., E. Migliaccio, G. Pelicci, L. Lanfrancone und P. G. Pelicci (1996). "Not all Shc's roads lead to Ras." *Trends Biochem Sci*, **21**(7): 257-261.
- Boonstra, J., P. Rijken, B. Humbel, F. Cremers, A. Verkleij und P. van Bergen en Henegouwen (1995). "The epidermal growth factor." *Cell Biol Int*, **19**(5): 413-430.
- Bourne, H. R. (1997). "How receptors talk to trimeric G proteins." *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **9**: 134-142.
- Bowden, E. T., M. Barth, D. Thomas, R. I. Glazer und S. C. Mueller (1999). "An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKCmu associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation." *Oncogene*, **18**(31): 4440-4449.
- Brändlin, I., S. Hübner, T. Eiseler, M. Martinez-Moya, A. Horschinek, A. Hausser, G. Link, S. Rupp, P. Storz, K. Pfizenmaier und F. J. Johannes (2002). "Protein kinase C (PKC)eta-mediated PKC mu activation modulates ERK and JNK signal pathways." *J Biol Chem*, **277**(8): 6490-6496.
- Buhl, A. M., N. L. Johnson, N. Dhanasekaran und G. L. Johnson (1995). "G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly." *J Biol Chem*, **270**(42): 24631-24634.

- Chen, C. und H. Okayama (1987). "High-efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA." *Mol Cell Biol*, **7**: 2745-2752.
- Chenais, F., G. Virella, C. C. Patrick und H. H. Fudenberg (1977). "Isolation of soluble immunocomplexes by affinity chromatography using staphylococcal protein A-Sepharose as substrate." *J. Immunol. Meth.*, **18**: 183-192.
- Chiu, T. und E. Rozengurt (2001). "CCK2 (CCK(B)/gastrin) receptor mediates rapid protein kinase D (PKD) activation through a protein kinase C-dependent pathway." *FEBS Lett*, **489**(1): 101-106.
- Chiu, T. und E. Rozengurt (2001). "PKD in intestinal epithelial cells: rapid activation by phorbol esters, LPA, and angiotensin through PKC." *Am J Physiol Cell Physiol*, **280**(4): C929-942.
- Chung, C. T. und R. H. Miller (1988). "A rapid and convenient method for the preparation and storage of competent bacterial cells." *Nucl. Acids Res.*, **16**: 3580.
- Claesson-Welsh, L. (1994). "Platelet-derived growth factor receptor signals." *J Biol Chem*, **269**(51): 32023-32026.
- Claesson-Welsh, L., A. Eriksson, A. Moren, L. Severinsson, B. Ek, A. Ostman, C. Betsholtz und C. H. Heldin (1988). "cDNA cloning and expression of a human platelet-derived growth factor (PDGF) receptor specific for B-chain-containing PDGF molecules." *Mol Cell Biol*, **8**(8): 3476-3486.
- Claesson-Welsh, L., A. Eriksson, B. Westermark und C. H. Heldin (1989). "cDNA cloning and expression of the human A-type platelet-derived growth factor (PDGF) receptor establishes structural similarity to the B-type PDGF receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**(13): 4917-4921.
- Claesson-Welsh, L., A. Hammacher, B. Westermark, C. H. Heldin und M. Nister (1989). "Identification and structural analysis of the A type receptor for platelet-derived growth factor. Similarities with the B type receptor." *J Biol Chem*, **264**(3): 1742-1747.
- Claesson-Welsh, L. und C. H. Heldin (1989). "Platelet-derived growth factor. Three isoforms that bind to two distinct cell surface receptors." *Acta Oncol*, **28**(3): 331-334.
- Cockcroft, S. und G. M. Thomas (1992). "Inositol-lipid-specific Phospholipase C isoenzymes and their differential regulation by receptors." *Biochem J*, **288**(Pt 1): 1-14.
- Coffer, P. J., B. M. Burgering, M. P. Peppelenbosch, J. L. Bos und W. Kruijer (1995). "UV activation of receptor tyrosine kinase activity." *Oncogene*, **11**(3): 561-569.
- Cohen, S. und G. A. Elliott (1963). "The stimulation of epidermal keratinization by a protein isolated from the submaxillary gland of the mouse." *J Invest. Dermatol.*, **44**: 1-5.

- Conklin, B. R. und H. R. Bourne (1993). "Structural elements of G alpha subunits that interact with G beta gamma, receptors, and effectors." *Cell*, **73**(4): 631-641.
- Cooper, J. A. und A. Kashishian (1993). "In vivo binding properties of SH2 domains from GTPase-activating protein and phosphatidylinositol 3-kinase." *Mol Cell Biol*, **13**(3): 1737-1745.
- Coughlin, S. R. (1994). "Expanding horizons for receptors coupled to G proteins: Diversity and disease." *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **6**: 191-197.
- Countaway, J. L., A. C. Nairn und R. J. Davis (1992). "Mechanism of desensitization of the epidermal growth factor receptor protein-tyrosine kinase." *J Biol Chem*, **267**(2): 1129-1140.
- Coussens, L., T. L. Yang-Feng, Y. C. Liao, E. Chen, A. Gray, J. McGrath, P. H. Seeburg, T. A. Libermann, J. Schlessinger, U. Francke und et al. (1985). "Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene." *Science*, **230**(4730): 1132-1139.
- Daub, H., F. U. Weiss, C. Wallasch und A. Ullrich (1996). "Role of transactivation of the EGF receptor in signalling by G-protein-coupled receptors." *Nature*, **379**(6565): 557-560.
- Davidson-Moncada, J. K., G. Lopez-Lluch, A. W. Segal und L. V. Dekker (2002). "Involvement of protein kinase D in Fc gamma-receptor activation of the NADPH oxidase in neutrophils." *Biochem J*, **363**(Pt 1): 95-103.
- Davis, R. J. und M. P. Czech (1985). "Platelet-derived growth factor mimics phorbol diester action on epidermal growth factor receptor phosphorylation at threonine-654." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **82**(12): 4080-4084.
- Delgado, M. und D. Ganea (2000). "Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase activating polypeptide inhibit the MEKK1/MEK4/JNK signaling pathway in LPS-stimulated macrophages." *J Neuroimmunol*, **110**(1-2): 97-105.
- DeMali, K. A. und A. Kazlauskas (1998). "Activation of Src family members is not required for the platelet-derived growth factor beta receptor to initiate mitogenesis." *Mol Cell Biol*, **18**(4): 2014-2022.
- Derijard, B., M. Hibi, I. H. Wu, T. Barrett, B. Su, T. Deng, M. Karin und R. J. Davis (1994). "JNK1: a protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain." *Cell*, **76**(6): 1025-1037.
- Dhanasekaran, N. und E. Premkumar Reddy (1998). "Signaling by dual specificity kinases." *Oncogene*, **17**(11 Reviews): 1447-1455.
- Dhanasekaran, N., S. T. Tsim, J. M. Dermott und D. Onesime (1998). "Regulation of cell proliferation by G proteins." *Oncogene*, **17**(11 Reviews): 1383-1394.

- Dieterich, S., T. Herget, G. Link, H. Bottinger, K. Pfizenmaier und F. J. Johannes (1996). "In vitro activation and substrates of recombinant, baculovirus expressed human protein kinase C mu." *FEBS Lett*, **381**(3): 183-187.
- Ding, H., X. Wu, I. Kim, P. P. Tam, G. Y. Koh und A. Nagy (2000). "The mouse *Pdgfc* gene: dynamic expression in embryonic tissues during organogenesis." *Mech Dev*, **96**(2): 209-213.
- Dohlman, H. G., M. G. Caron und R. J. Lefkowitz (1987). "A family of receptors coupled to guanine nucleotide regulatory proteins." *Biochemistry*, **26**(10): 2657-2664.
- Doolittle, R. F., M. W. Hunkapiller, L. E. Hood, S. G. Devare, K. C. Robbins, S. A. Aaronson und H. N. Antoniades (1983). "Simian sarcoma virus onc gene, v-sis, is derived from the gene (or genes) encoding a platelet-derived growth factor." *Science*, **221**(4607): 275-277.
- Downward, J. (1997). "Cell cycle: routine role for Ras." *Curr Biol*, **7**(4): R258-260.
- Endo, K., E. Oki, V. Biedermann, H. Kojima, K. Yoshida, F. J. Johannes, D. Kufe und R. Datta (2000). "Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C [micro] by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1-beta -D-arabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents." *J Biol Chem*, **275**(24): 18476-18481.
- Engel, J. (1989). "EGF-like domains in extracellular matrix proteins: localized signals for growth and differentiation?" *FEBS Lett*, **251**(1-2): 1-7.
- Farrens, D. L., C. Altenbach, K. Yang, W. L. Hubbell und H. G. Khorana (1996). "Requirement of rigid-body motion of transmembrane helices for light activation of rhodopsin." *Science*, **274**(5288): 768-770.
- Franke, T. F., D. R. Kaplan, L. C. Cantley und A. Toker (1997). "Direct regulation of the Akt proto-oncogene product by phosphatidylinositol-3,4-bisphosphate." *Science*, **275**(5300): 665-668.
- Friedman, B., A. R. Frackelton Jr., A. H. Ross, J. M. Connors, H. Fujiki, T. Sugimura und M. R. Rosner (1984). "Tumor promoters block tyrosine-specific sphosphorylation of the epidermal growth factor receptor." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **81**: 3034-3038.
- Friedman, B. A., J. van Amsterdam, H. Fujiki und M. R. Rosner (1989). "Phosphorylation at threonine-654 is not required for negative regulation of the epidermal growth factor receptor by non-phorbol tumor promoters." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**(3): 812-816.
- Gerday, C., L. Bolis und R. Gilles, Eds. (1988). *Calcium and Calcium binding proteins*. Berlin, Springer Verlag.

- Gershoni, J. M. und G. E. Palade (1983). "Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to a positively charged membrane filter." *Anal. Biochem.*, **124**: 396-405.
- Goishi, K., S. Higashiyama, M. Klagsbrun, N. Nakano, T. Umata, M. Ishikawa, E. Mekada und N. Taniguchi (1995). "Phorbol ester induces the rapid processing of cell surface heparin-binding EGF-like growth factor: conversion from juxtacrine to paracrine growth factor activity." *Mol Biol Cell*, **6**(8): 967-980.
- Goldenberg, M. M. (1999). "Trastuzumab, a recombinant DNA-derived humanized monoclonal antibody, a novel agent for the treatment of metastatic breast cancer." *Clin Ther*, **21**(2): 309-318.
- Graus-Porta, D., R. R. Beerli, J. M. Daly und N. E. Hynes (1997). "ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling." *Embo J*, **16**(7): 1647-1655.
- Greenfield, C., I. Hiles, M. D. Waterfield, M. Federwisch, A. Wollmer, T. L. Blundell und N. McDonald (1989). "Epidermal growth factor binding induces a conformational change in the external domain of its receptor." *Embo J*, **8**: 4115-4123.
- Gschwendt, M., S. Dieterich, J. Rennecke, W. Kittstein, H. J. Mueller und F. J. Johannes (1996). "Inhibition of protein kinase C mu by various inhibitors. Differentiation from protein kinase c isoenzymes." *FEBS Lett*, **392**(2): 77-80.
- Gschwendt, M., F. J. Johannes, W. Kittstein und F. Marks (1997). "Regulation of protein kinase Cmu by basic peptides and heparin. Putative role of an acidic domain in the activation of the kinase." *J Biol Chem*, **272**(33): 20742-20746.
- Gullick, W. J. (1994). "A new model for the interaction of EGF-like ligands with their receptors: the new one-two." *Eur J Cancer*, **30**: 2186.
- Gutkind, J. S. (1998). "Cell growth control by G-protein coupled receptors: From signal transduction to signal integration." *Oncogene*, **17**: 1331-1342.
- Gutkind, J. S., E. A. Novotny, M. R. Brann und K. C. Robbins (1991). "Muscarinic acetylcholine receptor subtypes as agonist-dependent oncogenes." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(11): 4703-4707.
- Guy, P. M., J. V. Platko, L. C. Cantley, R. A. Cerione und K. L. Carraway, 3rd (1994). "Insect cell-expressed p180erbB3 possesses an impaired tyrosine kinase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(17): 8132-8136.

- Habib, A. A., T. Hognason, J. Ren, K. Stefansson und R. R. Ratan (1998). "The epidermal growth factor receptor associates with and recruits phosphatidylinositol 3-kinase to the platelet-derived growth factor beta receptor." *J Biol Chem*, **273**(12): 6885-6891.
- Hannum, C., J. Culpepper, D. Campbell, T. McClanahan, S. Zurawski, J. F. Bazan, R. Kastelein, S. Hudak, J. Wagner, J. Mattson und et al. (1994). "Ligand for FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase regulates growth of haematopoietic stem cells and is encoded by variant RNAs." *Nature*, **368**(6472): 643-648.
- Hausser, A., G. Link, L. Bamberg, A. Burzlaff, S. Lutz, K. Pfizenmaier und F. J. Johannes (2002). "Structural requirements for localization and activation of protein kinase C mu (PKC mu) at the Golgi compartment." *J Cell Biol*, **156**(1): 65-74.
- Hausser, A., P. Storz, S. Hubner, I. Braendlin, M. Martinez-Moya, G. Link und F. J. Johannes (2001). "Protein kinase C mu selectively activates the mitogen-activated protein kinase (MAPK) p42 pathway." *FEBS Lett*, **492**(1-2): 39-44.
- Hausser, A., P. Storz, G. Link, H. Stoll, Y. C. Liu, A. Altman, K. Pfizenmaier und F. J. Johannes (1999). "Protein kinase C mu is negatively regulated by 14-3-3 signal transduction proteins." *J Biol Chem*, **274**(14): 9258-9264.
- Haussermann, S., W. Kittstein, G. Rincke, F. J. Johannes, F. Marks und M. Gschwendt (1999). "Proteolytic cleavage of protein kinase Cmu upon induction of apoptosis in U937 cells." *FEBS Lett*, **462**(3): 442-446.
- Haworth, R. S. und M. Avkiran (2001). "Inhibition of protein kinase D by resveratrol." *Biochem Pharmacol*, **62**(12): 1647-1651.
- Haworth, R. S., M. W. Goss, E. Rozengurt und M. Avkiran (2000). "Expression and activity of protein kinase D/protein kinase C mu in myocardium: evidence for alpha1-adrenergic receptor- and protein kinase C-mediated regulation." *J Mol Cell Cardiol*, **32**(6): 1013-1023.
- Haworth, R. S., J. Sinnott-Smith, E. Rozengurt und M. Avkiran (1999). "Protein kinase D inhibits plasma membrane Na(+)/H(+) exchanger activity." *Am J Physiol*, **277**(6 Pt 1): C1202-1209.
- Hayashi, A., N. Seki, A. Hattori, S. Kozuma und T. Saito (1999). "PKCnu, a new member of the protein kinase C family, composes a fourth subfamily with PKCmu." *Biochim Biophys Acta*, **1450**(1): 99-106.
- Hayashi, H., S. Kamohara, Y. Nishioka, F. Kanai, N. Miyake, Y. Fukui, F. Shibasaki, T. Takenawa und Y. Ebina (1992). "Insulin treatment stimulates the tyrosine phosphorylation of the alpha-type 85-kDa subunit of phosphatidylinositol 3-kinase in vivo." *J Biol Chem*, **267**(31): 22575-22580.

- Heisermann, G. J. und G. N. Gill (1988). "Epidermal growth factor receptor threonine and serine residues phosphorylated in vivo." *J Biol Chem*, **263**(26): 13152-13158.
- Heisermann, G. J., H. S. Wiley, B. J. Walsh, H. A. Ingraham, C. J. Fiol und G. N. Gill (1990). "Mutational removal of the Thr⁶⁶⁹ and Ser⁶⁷¹ phosphorylation sites alters substrate specificity and ligand-induced internalization of the epidermal growth factor receptor." *J Biol Chem*, **265**(22): 12820-12827.
- Heldin, C. H. (1997). "Simultaneous induction of stimulatory and inhibitory signals by PDGF." *FEBS Lett*, **410**: 17-21.
- Heldin, C. H., A. Emlund, C. Rorsman und L. Ronnstrand (1989). "Dimerization of B-type platelet-derived growth factor receptors occurs after ligand binding and is closely associated with receptor kinase activation." *J Biol Chem*, **264**(15): 8905-8912.
- Heldin, C. H. und B. Westermark (1991). "Platelet-derived growth factor and autocrine mechanisms of oncogenic processes." *Crit Rev Oncog*, **2**(2): 109-124.
- Heldin, C. H. und B. Westermark (1999). "Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor." *Physiol Rev*, **79**(4): 1283-1316.
- Hepler, J. R. und A. G. Gilman (1992). "G proteins." *Trends Biochem Sci*, **17**(10): 383-387.
- Hibi, M., A. Lin, T. Smeal, A. Minden und M. Karin (1993). "Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain." *Genes Dev*, **7**(11): 2135-2148.
- Hill, C. S. und R. Treisman (1995). "Differential activation of c-fos promoter elements by serum, lysophosphatidic acid, G proteins and polypeptide growth factors." *Embo J*, **14**(20): 5037-5047.
- Hill, C. S., J. Wynne und R. Treisman (1995). "The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF." *Cell*, **81**(7): 1159-1170.
- Holgado-Madruga, M., D. R. Emler, D. K. Moscatello, A. K. Godwin und A. J. Wong (1996). "A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling." *Nature*, **379**(6565): 560-564.
- Hooper, N. M., E. H. Karran und A. J. Turner (1997). "Membrane protein secretases." *Biochem J*, **321**(Pt 2): 265-279.
- Huang, R. P., J. X. Wu, Y. Fan und E. D. Adamson (1996). "UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates." *J Cell Biol*, **133**(1): 211-220.
- Hug, H. und T. F. Sarre (1993). "Protein kinase C isoenzymes: divergence in signal transduction?" *Biochem J*, **291**(Pt 2): 329-343.

- Hunter, T. (1995). "Protein kinases and phosphatases: The Yin and Yang of protein phosphorylation and signaling." *Cell*, **80**: 225-236.
- Hunter, T. und M. Karin (1992). "The regulation of transcription by phosphorylation." *Cell*, **70**(3): 375-387.
- Hunter, T., N. Ling und J. A. Cooper (1984). "Protein Kinase C phosphorylation of the EGF receptor at a threonine residue close to the cytoplasmic face of the plasma membrane." *Nature*, **311**: 480-483.
- Hunter, T. und B. M. Sefton (1980). "Transforming gene product of Rous sarcoma virus phosphorylates tyrosine." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **77**: 1311-1315.
- Hurd, C. und E. Rozengurt (2001). "Protein kinase D is sufficient to suppress EGF-induced c-Jun Ser 63 phosphorylation." *Biochem Biophys Res Commun*, **282**(2): 404-408.
- Hurowitz, E. H., J. M. Melnyk, Y. J. Chen, H. Kouros-Mehr, M. I. Simon und H. Shizuya (2000). "Genomic characterization of the human heterotrimeric G protein alpha, beta, and gamma subunit genes." *DNA Res*, **7**(2): 111-120.
- Iglesias, T., N. Cabrera-Poch, M. P. Mitchell, T. J. Naven, E. Rozengurt und G. Schiavo (2000). "Identification and cloning of Kidins220, a novel neuronal substrate of protein kinase D." *J Biol Chem*, **275**(51): 40048-40056.
- Iglesias, T., S. Matthews und E. Rozengurt (1998). "Dissimilar phorbol ester binding properties of the individual cysteine-rich motifs of protein kinase D." *FEBS Lett*, **437**(1-2): 19-23.
- Iglesias, T. und E. Rozengurt (1998). "Protein kinase D activation by mutations within its pleckstrin homology domain." *J Biol Chem*, **273**(1): 410-416.
- Iglesias, T. und E. Rozengurt (1999). "Protein kinase D activation by deletion of its cysteine-rich motifs." *FEBS Lett*, **454**(1-2): 53-56.
- Iglesias, T., R. T. Waldron und E. Rozengurt (1998). "Identification of in vivo phosphorylation sites required for protein kinase D activation." *J Biol Chem*, **273**(42): 27662-27667.
- Jallal, B., J. Schlessinger und A. Ullrich (1992). "Tyrosine phosphatase inhibition permits analysis of signal transduction complexes in p185HER2/neu-overexpressing human tumor cells." *J Biol Chem*, **267**(7): 4357-4363.
- Jamora, C., N. Yamanouye, J. Van Lint, J. Laudenslager, J. R. Vandenheede, D. J. Faulkner und V. Malhotra (1999). "Gbetagamma-mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D." *Cell*, **98**(1): 59-68.
- Jan, L. Y. und Y. N. Jan (1997). "Receptor-regulated ion channels." *Curr Opin Cell Biol*, **9**(2): 155-160.

- Johannes, F. J., A. Hausser, P. Storz, L. Truckenmuller, G. Link, T. Kawakami und K. Pfizenmaier (1999). "Bruton's tyrosine kinase (Btk) associates with protein kinase C mu." *FEBS Lett*, **461**(1-2): 68-72.
- Johannes, F. J., J. Horn, G. Link, E. Haas, K. Siemienski, H. Wajant und K. Pfizenmaier (1998). "Protein kinase Cmu downregulation of tumor-necrosis-factor-induced apoptosis correlates with enhanced expression of nuclear-factor-kappaB-dependent protective genes." *Eur J Biochem*, **257**(1): 47-54.
- Johannes, F. J., J. Prestle, S. Dieterich, P. Oberhagemann, G. Link und K. Pfizenmaier (1995). "Characterization of activators and inhibitors of protein kinase C mu." *Eur J Biochem*, **227**(1-2): 303-307.
- Johannes, F. J., J. Prestle, S. Eis, P. Oberhagemann und K. Pfizenmaier (1994). "PKCu is a novel, atypical member of the protein kinase C family." *J Biol Chem*, **269**(8): 6140-6148.
- Karin, M., Z. Liu und E. Zandi (1997). "AP-1 function and regulation." *Curr Opin Cell Biol*, **9**(2): 240-246.
- Katz, A., D. Wu und M. I. Simon (1992). "Subunits beta gamma of heterotrimeric G protein activate beta 2 isoform of Phospholipase C." *Nature*, **360**(6405): 686-689.
- Kavanaugh, W. M., A. Klippel, J. A. Escobedo und L. T. Williams (1992). "Modification of the 85-kilodalton subunit of phosphatidylinositol-3 kinase in platelet-derived growth factor-stimulated cells." *Mol Cell Biol*, **12**(8): 3415-3424.
- Kavanaugh, W. M., C. W. Turck und L. T. Williams (1995). "PTB domain binding to signaling proteins through a sequence motif containing phosphotyrosine." *Science*, **268**(5214): 1177-1179.
- Kelly, J. D., B. A. Haldeman, F. J. Grant, M. J. Murray, R. A. Seifert, D. F. Bowen-Pope, J. A. Cooper und A. Kazlauskas (1991). "Platelet-derived growth factor (PDGF) stimulates PDGF receptor subunit dimerization and intersubunit trans-phosphorylation." *J Biol Chem*, **266**(14): 8987-8992.
- King, C. R., I. Borrello, L. Porter, P. Comoglio und J. Schlessinger (1989). "Ligand-independent tyrosine phosphorylation of EGF receptor and the erbB-2/neu proto-oncogene product is induced by hyperosmotic shock." *Oncogene*, **4**(1): 13-18.
- Knebel, A., H. J. Rahmsdorf, A. Ullrich und P. Herrlich (1996). "Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents." *Embo J*, **15**(19): 5314-5325.
- Kohler, N. und A. Lipton (1974). "Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity." *Exp Cell Res*, **87**(2): 297-301.

- Kraus, M. H., W. Issing, T. Miki, N. C. Popescu und S. A. Aaronson (1989). "Isolation and characterization of ERBB3, a third member of the ERBB/epidermal growth factor receptor family: evidence for overexpression in a subset of human mammary tumors." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**(23): 9193-9197.
- Kunkel, T. A. (1985). "Mutational specificity of depurination." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **86**: 9193-9197.
- Kuppuswamy, D., M. Dalton und L. J. Pike (1993). "Serine 1002 is a site of *in vivo* and *in vitro* phosphorylation of the epidermal growth factor receptor." *J Biol Chem*, **268**(21): 19134-19142.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature*, **227**: 680-685.
- Laird, A. D. und D. Shalloway (1997). "Oncoprotein Signaling and Mitosis." *Cell. Signal.*, **9**: 249-255.
- LaMorte, V. J., A. T. Harootunian, A. M. Spiegel, R. Y. Tsien und J. R. Feramisco (1993). "Mediation of growth factor induced DNA synthesis and calcium mobilization by Gq and Gi2." *J Cell Biol*, **121**(1): 91-99.
- LaRochelle, W. J., M. Jeffers, W. F. McDonald, R. A. Chillakuru, N. A. Giese, N. A. Lokker, C. Sullivan, F. L. Boldog, M. Yang, C. Vernet, C. E. Burgess, E. Fernandes, L. L. Deegler, B. Rittman, J. Shimkets, R. A. Shimkets, J. M. Rothberg und H. S. Lichenstein (2001). "PDGF-D, a new protease-activated growth factor." *Nat Cell Biol*, **3**(5): 517-521.
- Lee, S. Y. und S. Rasheed (1990). "A simple procedure for maximum yield of high-quality plasmid DNA." *Biotechniques*, **9**: 676-679.
- Lemmon, M. A. und D. Schlessinger (1994). "Regulation of signal transduction and signal diversity by receptor oligomerization." *Trends Biochem Sci*, **19**: 459-464.
- Lemoine, N. R., D. M. Barnes, D. P. Hollywood, C. M. Hughes, P. Smith, E. Dublin, S. A. Prigent, W. J. Gullick und H. C. Hurst (1992). "Expression of the ERBB3 gene product in breast cancer." *Br J Cancer*, **66**(6): 1116-1121.
- Lengyel, E., E. Stepp, R. Gum und D. Boyd (1995). "Involvement of a mitogen-activated protein kinase signaling pathway in the regulation of urokinase promotor activity by c-HA-ras." *J Biol Chem*, **270**: 23007-23010.
- Levitcki, A. (1988). "From epinephrine to cyclic AMP." *Science*, **241**(4867): 800-806.
- Li, J., Y. N. Kim und P. J. Bertics (2000). "Platelet-derived growth factor-stimulated migration of murine fibroblasts is associated with epidermal growth factor receptor expression and tyrosine phosphorylation." *J Biol Chem*, **275**(4): 2951-2958.

- Li, W. und J. H. Pierce (1996). "Protein kinase C-delta, an important signaling molecule in the platelet-derived growth factor beta receptor pathway." *Curr Top Microbiol Immunol*, **211**: 55-65.
- Li, X., A. Ponten, K. Aase, L. Karlsson, A. Abramsson, M. Uutela, G. Backstrom, M. Hellstrom, H. Bostrom, H. Li, P. Soriano, C. Betsholtz, C. H. Heldin, K. Alitalo, A. Ostman und U. Eriksson (2000). "PDGF-C is a new protease-activated ligand for the PDGF alpha-receptor." *Nat Cell Biol*, **2**(5): 302-309.
- Liljedahl, M., Y. Maeda, A. Colanzi, I. Ayala, J. Van Lint und V. Malhotra (2001). "Protein kinase D regulates the fission of cell surface destined transport carriers from the trans-Golgi network." *Cell*, **104**(3): 409-420.
- Lin, W. W. und B. C. Chen (1998). "Distinct PKC isoforms mediate the activation of cPLA2 and adenylyl cyclase by phorbol ester in RAW264.7 macrophages." *Br J Pharmacol*, **125**(7): 1601-1609.
- Linseman, D. A., C. W. Benjamin und D. A. Jones (1995). "Convergence of Angiotensin II and platelet-derived growth factor receptor signaling cascades in vascular smooth muscle cells." *J Biol Chem*, **270**(21): 12563-12568.
- Liou, H. C. und D. Baltimore (1993). "Regulation of the NF-kappa B/rel transcription factor and I kappa B inhibitor system." *Curr Opin Cell Biol*, **5**(3): 477-487.
- Lowenstein, E. J., R. J. Daly, A. G. Batzer, W. Li, B. Margolis, R. Lammers, A. Ullrich, E. Y. Skolnik, D. Bar-Sagi und J. Schlessinger (1992). "The SH2 and SH3 domain-containing protein GRB2 links receptor tyrosine kinases to ras signaling." *Cell*, **70**(3): 431-442.
- Lyons, J., C. A. Landis, G. Harsh, L. Vallar, K. Grunewald, H. Feichtinger, Q. Y. Duh, O. H. Clark, E. Kawasaki, H. R. Bourne und et al. (1990). "Two G protein oncogenes in human endocrine tumors." *Science*, **249**(4969): 655-659.
- Maeda, Y., G. V. Beznoussenko, J. Van Lint, A. A. Mironov und V. Malhotra (2001). "Recruitment of protein kinase D to the trans-Golgi network via the first cysteine-rich domain." *Embo J*, **20**(21): 5982-5990.
- Malarkey, K., C. M. Belham, A. Paul, A. Graham, A. McLees, P. H. Scott und R. Plevin (1995). "The regulation of tyrosine kinase signaling pathways by growth factor and G-protein-coupled receptors." *Biochem J*, **309**: 361-375.
- Margolis, B., F. Bellot, A. M. Honegger, A. Ullrich, J. Schlessinger und A. Zilberstein (1990). "Tyrosine kinase activity is essential for the association of Phospholipase C-gamma with the epidermal growth factor receptor." *Mol Cell Biol*, **10**: 435-441.

- Margolis, B., S. G. Rhee, S. Felder, M. Mervic, R. Lyall, A. Levitzki, A. Ullrich, A. Zilberstein und J. Schlessinger (1989). "EGF induces tyrosine phosphorylation of Phospholipase C-II: A potential mechanism for EGF receptor signaling." *Cell*, **57**: 1101-1117.
- Massague, J. und A. Pandiella (1993). "Membrane-anchored growth factors." *Annu Rev Biochem*, **62**: 515-541.
- Matthews, S., T. Iglesias, D. Cantrell und E. Rozengurt (1999). "Dynamic re-distribution of protein kinase D (PKD) as revealed by a GFP-PKD fusion protein: dissociation from PKD activation." *FEBS Lett*, **457**(3): 515-521.
- Matthews, S. A., T. Iglesias, E. Rozengurt und D. Cantrell (2000). "Spatial and temporal regulation of protein kinase D (PKD)." *Embo J*, **19**(12): 2935-2945.
- Matthews, S. A., G. R. Pettit und E. Rozengurt (1997). "Bryostatin 1 induces biphasic activation of protein kinase D in intact cells." *J Biol Chem*, **272**(32): 20245-20250.
- Matthews, S. A., E. Rozengurt und D. Cantrell (1999). "Characterization of serine 916 as an in vivo autophosphorylation site for protein kinase D/Protein kinase C μ ." *J Biol Chem*, **274**(37): 26543-26549.
- Matthews, S. A., E. Rozengurt und D. Cantrell (2000). "Protein kinase D. A selective target for antigen receptors and a downstream target for protein kinase C in lymphocytes." *J Exp Med*, **191**(12): 2075-2082.
- Mayer, B. J. und D. Baltimore (1993). "Signaling through SH2 and SH3 domains." *Trends Cell Biol.*, **3**: 8-13.
- Messing, J. (1983). "New M13 vectors for cloning." *Meth. Enzymol.*, **101**: 20-79.
- Migliaccio, E., S. Mele, A. E. Salcini, G. Pelicci, K. M. Lai, G. Superti-Furga, T. Pawson, P. P. Di Fiore, L. Lanfrancone und P. G. Pelicci (1997). "Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway." *Embo J*, **16**(4): 706-716.
- Miller, C. C., P. Hale und A. P. Pentland (1994). "Ultraviolet B injury increases prostaglandin synthesis through a tyrosine kinase-dependent pathway. Evidence for UVB-induced epidermal growth factor receptor activation." *J Biol Chem*, **269**(5): 3529-3533.
- Mori, S., L. Ronnstrand, K. Yokote, A. Engstrom, S. A. Courtneidge, L. Claesson-Welsh und C. H. Heldin (1993). "Identification of two juxtamembrane autophosphorylation sites in the PDGF beta-receptor; involvement in the interaction with Src family tyrosine kinases." *Embo J*, **12**(6): 2257-2264.

- Moroo, I., I. Tatsuno, D. Uchida, T. Tanaka, J. Saito, Y. Saito und A. Hirai (1998). "Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) stimulates mitogen-activated protein kinase (MAPK) in cultured rat astrocytes." *Brain Res*, **795**(1-2): 191-196.
- Morrison, D. K. und R. E. Cutler (1997). "The complexity of Raf-1 regulation." *Curr Opin Cell Biol*, **9**(2): 174-179.
- Mullis, K. B. und F. A. Faloon (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." *Meth. Enzymol.*, **155**: 335-350.
- Nakanishi, H., K. A. Brewer und J. H. Exton (1993). "Activation of the zeta isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate." *J Biol Chem*, **268**(1): 13-16.
- Newton, A. C. (1995). "Protein kinase C: structure, function, and regulation." *J Biol Chem*, **270**(48): 28495-28498.
- Nishikawa, K., A. Toker, F. J. Johannes, Z. Songyang und L. C. Cantley (1997). "Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes." *J Biol Chem*, **272**(2): 952-960.
- Nishikawa, K., A. Toker, K. Wong, P. A. Marignani, F. J. Johannes und L. C. Cantley (1998). "Association of protein kinase C μ with type II phosphatidylinositol 4-kinase and type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase." *J Biol Chem*, **273**(36): 23126-23133.
- Nishizuka, Y. (1992). "Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C." *Science*, **258**(5082): 607-614.
- Nishizuka, Y. (1992). "Membrane phospholipid degradation and protein kinase C for cell signaling." *Neurosci Res*, **15**(1-2): 3-5.
- Northwood, I. C., F. A. Gonzalez, M. Wartmann, D. L. Raden und R. J. Davis (1991). "Isolation and characterization of two growth factor-stimulated protein kinases that phosphorylate the epidermal growth factor receptor at threonine 669." *J Biol Chem*, **266**(23): 15266-15276.
- Obermeier, A., I. Tinhofer, H. H. Grunicke und A. Ullrich (1996). "Transforming potentials of epidermal growth factor and nerve growth factor receptors inversely correlate with their Phospholipase C gamma affinity and signal activation." *Embo J*, **15**(1): 73-82.
- O'Neil, K. T. und W. F. DeGrado (1990). "How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic alpha-helices." *Trends Biochem Sci*, **15**(2): 59-64.
- Palmantier, R., M. D. George, S. K. Akiyama, F. M. Wolber, K. Olden und J. D. Roberts (2001). "Cis-polyunsaturated fatty acids stimulate beta1 integrin-mediated adhesion of human breast carcinoma cells to type IV collagen by activating protein kinases C-epsilon and -mu." *Cancer Res*, **61**(6): 2445-2452.

- Paolucci, L. und E. Rozengurt (1999). "Protein kinase D in small cell lung cancer cells: rapid activation through protein kinase C." *Cancer Res*, **59**(3): 572-577.
- Paolucci, L., J. Sinnett-Smith und E. Rozengurt (2000). "Lysophosphatidic acid rapidly induces protein kinase D activation through a pertussis toxin-sensitive pathway." *Am J Physiol Cell Physiol*, **278**(1): C33-39.
- Park, D., D. Y. Jhon, C. W. Lee, K. H. Lee und S. G. Rhee (1993). "Activation of Phospholipase C isozymes by G protein beta gamma subunits." *J Biol Chem*, **268**(7): 4573-4576.
- Pawson, T. (1995). "Protein modules and signalling networks." *Nature*, **373**(6515): 573-580.
- Pawson, T. und J. D. Scott (1997). "Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins." *Science*, **278**(5346): 2075-2080.
- Pearson, R. B. und B. E. Kemp (1991). "Protein kinase phosphorylation site sequences and consensus specificity motifs: tabulations." *Methods Enzymol*, **200**: 62-81.
- Pelicci, G., L. Lanfrancone, F. Grignani, J. McGlade, F. Cavallo, G. Forni, I. Nicoletti, T. Pawson und P. G. Pelicci (1992). "A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction." *Cell*, **70**(1): 93-104.
- Pierce, J. H., P. Arnstein, E. DiMarco, J. Artrip, M. H. Kraus, F. Lonardo, P. P. Di Fiore und S. A. Aaronson (1991). "Oncogenic potential of erbB-2 in human mammary epithelial cells." *Oncogene*, **6**(7): 1189-1194.
- Plowman, G. D., J. M. Culouscou, G. S. Whitney, J. M. Green, G. W. Carlton, L. Foy, M. G. Neubauer und M. Shoyab (1993). "Ligand-specific activation of HER4/p180erbB4, a fourth member of the epidermal growth factor receptor family." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**(5): 1746-1750.
- Plowman, G. D., A. Ullrich und L. K. Shawver (1994). "Receptor tyrosine kinases as targets for drug intervention." *Drug News & Perspectives*, **7**: 334-339.
- Prenzel, N., E. Zwick, H. Daub, M. Leserer, R. Abraham, C. Wallasch und A. Ullrich (1999). "EGF receptor transactivation by G-protein-coupled receptors requires metalloproteinase cleavage of proHB-EGF." *Nature*, **402**(6764): 884-888.
- Prestle, J., K. Pfizenmaier, J. Brenner und F. J. Johannes (1996). "Protein kinase C mu is located at the Golgi compartment." *J Cell Biol*, **134**(6): 1401-1410.
- Prigent, S. A. und N. R. Lemoine (1992). "The type 1 (EGFR-related) family of growth factor receptors and their ligands." *Prog Growth Factor Res*, **4**(1): 1-24.
- Qiu, F. H., P. Ray, K. Brown, P. E. Barker, S. Jhanwar, F. H. Ruddle und P. Besmer (1988). "Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family--

- oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus.” *Embo J*, **7**(4): 1003-1011.
- Qiu, Y., L. Ravi und H. J. Kung (1998). “Requirement of ErbB2 for signalling by interleukin-6 in prostate carcinoma cells.” *Nature*, **393**(6680): 83-85.
- Raines, E. W. und A. H. Ross (1993). Biology of Platelet derived Growth Factor Cytokines. B. Westermarck und C. Sorg. Basel, S. Karger AG. **5**: 74-114.
- Rao, G. N., P. Delafontaine und M. S. Runge (1995). “Thrombin stimulates phosphorylation of insulin-like growth factor-1 receptor, insulin receptor substrate-1, and Phospholipase C-gamma 1 in rat aortic smooth muscle cells.” *J Biol Chem*, **270**(46): 27871-27875.
- Rennecke, J., P. A. Rehberger, G. Furstenberger, F. J. Johannes, M. Stohr, F. Marks und K. H. Richter (1999). “Protein-kinase-Cmu expression correlates with enhanced keratinocyte proliferation in normal and neoplastic mouse epidermis and in cell culture.” *Int J Cancer*, **80**(1): 98-103.
- Rettenmier, C. W., R. Sacca, W. L. Furman, M. F. Roussel, J. T. Holt, A. W. Nienhuis, E. R. Stanley und C. J. Sherr (1986). “Expression of the human c-fms proto-oncogene product (colony-stimulating factor-1 receptor) on peripheral blood mononuclear cells and choriocarcinoma cell lines.” *J Clin Invest*, **77**(6): 1740-1746.
- Rey, O. und E. Rozengurt (2001). “Protein kinase D interacts with Golgi via its cysteine-rich domain.” *Biochem Biophys Res Commun*, **287**(1): 21-26.
- Rey, O., J. Sinnott-Smith, E. Zhukova und E. Rozengurt (2001). “Regulated nucleocytoplasmic transport of protein kinase D in response to G protein-coupled receptor activation.” *J Biol Chem*, **276**(52): 49228-49235.
- Rey, O., S. H. Young, D. Cantrell und E. Rozengurt (2001). “Rapid protein kinase D translocation in response to G protein-coupled receptor activation. Dependence on protein kinase C.” *J Biol Chem*, **276**(35): 32616-32626.
- Riese, D. J., 2nd und D. F. Stern (1998). “Specificity within the EGF family/ErbB receptor family signaling network.” *Bioessays*, **20**(1): 41-48.
- Robinson, M. J. und M. H. Cobb (1997). “Mitogen-activated protein kinase pathways.” *Curr Opin Cell Biol*, **9**(2): 180-186.
- Rosen, L. B. und M. E. Greenberg (1996). “Stimulation of growth factor receptor signal transduction by activation of voltage-sensitive calcium channels.” *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(3): 1113-1118.

- Rosnet, O., C. Schiff, M. J. Pebusque, S. Marchetto, C. Tonnelle, Y. Toiron, F. Birg und D. Birnbaum (1993). "Human FLT3/FLK2 gene: cDNA cloning and expression in hematopoietic cells." *Blood*, **82**(4): 1110-1119.
- Ross, R., D. F. Bowen-Pope und E. W. Raines (1990). "Platelet-derived growth factor and its role in health and disease." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **327**(1239): 155-169.
- Ross, R., J. Glomset, B. Kariya und L. Harker (1974). "A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro." *Proc Natl Acad Sci USA*, **71**(4): 1207-1210.
- Rozakis-Adcock, M., R. Fernley, J. Wade, T. Pawson und D. Bowtell (1993). "The SH2 and SH3 domains of mammalian Grb2 couple the EGF receptor to the Ras activator mSos1." *Nature*, **363**(6424): 83-85.
- Rozakis-Adcock, M., J. McGlade, G. Mbamalu, G. Pelicci, R. Daly, W. Li, A. Batzer, S. Thomas, J. Brugge, P. G. Pelicci und et al. (1992). "Association of the Shc and Grb2/Sem5 SH2-containing proteins is implicated in activation of the Ras pathway by tyrosine kinases." *Nature*, **360**(6405): 689-692.
- Rozengurt, E., J. Sinnett-Smith und J. L. Zugaza (1997). "Protein kinase D: a novel target for diacylglycerol and phorbol esters." *Biochem Soc Trans*, **25**(2): 565-571.
- Sachsenmaier, C., A. Radler-Pohl, R. Zinck, A. Nordheim, P. Herrlich und H. J. Rahmsdorf (1994). "Involvement of growth factor receptors in the mammalian UVC response." *Cell*, **78**(6): 963-972.
- Saito, Y., J. Haendeler, Y. Hojo, K. Yamamoto und B. C. Berk (2001). "Receptor heterodimerization: essential mechanism for platelet-derived growth factor-induced epidermal growth factor receptor transactivation." *Mol Cell Biol*, **21**(19): 6387-6394.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch und T. Maniatis (1990). "Molecular cloning: A laboratory manual." *Cold Spring Harb Laboratory Press, New York, USA*.
- Savage, C. R., Jr., T. Inagami und S. Cohen (1972). "The primary structure of epidermal growth factor." *J Biol Chem*, **247**(23): 7612-7621.
- Scangos, G. und F. H. Ruddle (1981). "Mechanisms and applications of DNA-mediated gene transfer in mammalian cells." *Gene*, **14**: 1-10.
- Schlessinger, J. (1988). "Signal transduction by allosteric receptor oligomerization." *Trends Biochem Sci*, **13**(11): 443-447.
- Schneider, T., P. Igelmund und J. Hescheler (1997). "G protein interaction with K⁺ and Ca²⁺ channels." *Trends Pharmacol Sci*, **18**(1): 8-11.

- Seedorf, K., M. Shearman und A. Ullrich (1995). "Rapid and long-term effects on protein kinase C on receptor tyrosine kinase phosphorylation and degradation." *J Biol Chem*, **270**(32): 18953-18960.
- Seifert, R. A., C. E. Hart, P. E. Phillips, J. W. Forstrom, R. Ross, M. J. Murray und D. F. Bowen-Pope (1989). "Two different subunits associate to create isoform-specific platelet-derived growth factor receptors." *J Biol Chem*, **264**(15): 8771-8778.
- Sethi, T., S. Langdon, J. Smyth und E. Rozengurt (1992). "Growth of small cell lung cancer cells: stimulation by multiple neuropeptides and inhibition by broad spectrum antagonists in vitro and in vivo." *Cancer Res*, **52**(9 Suppl): 2737s-2742s.
- Shaw, G. (1996). "The pleckstrin homology domain: an intriguing multifunctional protein module." *Bioessays*, **18**(1): 35-46.
- Shioda, S., H. Ozawa, K. Dohi, H. Mizushima, K. Matsumoto, S. Nakajo, A. Takaki, C. J. Zhou, Y. Nakai und A. Arimura (1998). "PACAP protects hippocampal neurons against apoptosis: involvement of JNK/SAPK signaling pathway." *Ann N Y Acad Sci*, **865**: 111-117.
- Sidorenko, S. P., C. L. Law, S. J. Klaus, K. A. Chandran, M. Takata, T. Kurosaki und E. A. Clark (1996). "Protein kinase C mu (PKC mu) associates with the B cell antigen receptor complex and regulates lymphocyte signaling." *Immunity*, **5**(4): 353-363.
- Slamon, D. J., G. M. Clark, S. G. Wong, W. J. Levin, A. Ullrich und W. L. McGuire (1987). "Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene." *Science*, **235**(4785): 177-182.
- Slamon, D. J., W. Godolphin, L. A. Jones, J. A. Holt, S. G. Wong, D. E. Keith, W. J. Levin, S. G. Stuart, J. Udove, A. Ullrich und et al. (1989). "Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer." *Science*, **244**(4905): 707-712.
- Smrcka, A. V., J. R. Hepler, K. O. Brown und P. C. Sternweis (1991). "Regulation of polyphosphoinositide-specific Phospholipase C activity by purified Gq." *Science*, **251**(4995): 804-807.
- Soltoff, S. P., C. L. Carpenter, K. R. Auger, R. Kapeller, B. Schaffhausen und L. C. Cantley (1992). "Phosphatidylinositol-3 kinase and growth regulation." *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **57**: 75-80.
- Songyang, Z., S. E. Shoelson, M. Chaudhuri, G. Gish, T. Pawson, W. G. Haser, F. King, T. Roberts, S. Ratnofsky, R. J. Lechleider und et al. (1993). "SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences." *Cell*, **72**(5): 767-778.

- Stein-Gerlach, M., A. Kharitonov, W. Vogel, S. Ali und A. Ullrich (1995). "Protein-tyrosine phosphatase 1D modulates its own state of tyrosine phosphorylation." *J Biol Chem*, **270**(42): 24635-24637.
- Storz, P., A. Hausser, G. Link, J. Dedio, B. Ghebrehiwet, K. Pfizenmaier und F. J. Johannes (2000). "Protein kinase C [micro] is regulated by the multifunctional chaperon protein p32." *J Biol Chem*, **275**(32): 24601-24607.
- Strathmann, M. P. und M. I. Simon (1991). "G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(13): 5582-5586.
- Streuli, M. (1996). "Protein tyrosine phosphatases in signaling." *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **8**: 182-188.
- Sturany, S., J. Van Lint, F. Muller, M. Wilda, H. Hameister, M. Hocker, A. Brey, U. Gern, J. Vandenheede, T. Gress, G. Adler und T. Seufferlein (2001). "Molecular cloning and characterization of the human protein kinase D2. A novel member of the protein kinase D family of serine threonine kinases." *J Biol Chem*, **276**(5): 3310-3318.
- Su, B. und M. Karin (1996). "Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression." *Curr Opin Immunol*, **8**(3): 402-411.
- Sun, H. (1994). "The coordinated action of protein tyrosine phosphatases and kinases in cell signaling." *Trends in Biochem. Sci.*, **19**: 480-485.
- Takishima, K., I. Griswold-Prenner, T. Ingebritsen und M. R. Rosner (1991). "Epidermal growth factor (EGF) receptor T669 peptide kinase from 3T3-L1 cells is an EGF-stimulated "MAP" kinase." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**(6): 2520-2524.
- Tang, W. J. und A. G. Gilman (1992). "Adenylyl cyclases." *Cell*, **70**(6): 869-872.
- Taussig, R., J. A. Iniguez-Lluhi und A. G. Gilman (1993). "Inhibition of adenylyl cyclase by Gi alpha." *Science*, **261**(5118): 218-221.
- Tobias, E. S., E. Rozengurt, J. M. Connell und M. D. Houslay (1997). "Co-transfection with protein kinase D confers phorbol-ester-mediated inhibition on glucagon-stimulated cAMP accumulation in COS cells transfected to overexpress glucagon receptors." *Biochem J*, **326**(Pt 2): 545-551.
- Treisman, R. (1996). "Regulation of transcription by MAP kinase cascades." *Curr Opin Cell Biol*, **8**(2): 205-215.
- Tzahar, E., R. Pinkas-Kramarski, J. D. Moyer, L. N. Klapper, I. Alroy, G. Levkowitz, M. Shelly, S. Henis, M. Eisenstein, B. J. Ratzkin, M. Sela, G. C. Andrews und Y. Yarden (1997). "Bivalence of EGF-like ligands drives the ErbB signaling network." *Embo J*, **16**: 4938-4950.

- Tzahar, E., H. Waterman, X. Chen, G. Levkowitz, D. Karunakaran, S. Lavi, B. J. Ratzkin und Y. Yarden (1996). "A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor." *Mol Cell Biol*, **16**(10): 5276-5287.
- Ullrich, A., L. Coussens, J. S. Hayflick, T. J. Dull, A. Gray, A. W. Tam, J. Lee, Y. Yarden, T. A. Libermann, J. Schlessinger und et al. (1984). "Human epidermal growth factor receptor cDNA sequence and aberrant expression of the amplified gene in A431 epidermoid carcinoma cells." *Nature*, **309**(5967): 418-425.
- Ullrich, A. und J. Schlessinger (1990). "Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity." *Cell*, **61**: 203-212.
- Valverde, A. M., J. Sinnett-Smith, J. Van Lint und E. Rozengurt (1994). "Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a target for diacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**(18): 8572-8576.
- van Biesen, T., L. M. Luttrell, B. E. Hawes und R. J. Lefkowitz (1996). "Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors." *Endocr Rev*, **17**(6): 698-714.
- van der Geer, P., T. Hunter und R. A. Lindberg (1994). "Receptor protein tyrosine kinases and their signal transduction pathways." *Annu. Rev. Cell Biol.*, **10**(251-337).
- van der Geer, P., T. Hunter und R. A. Lindberg (1994). "Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways." *Annu Rev Cell Biol*, **10**: 251-337.
- van der Geer, P., S. Wiley, V. K. Lai, J. P. Olivier, G. D. Gish, R. Stephens, D. Kaplan, S. Shoelson und T. Pawson (1995). "A conserved amino-terminal Shc domain binds to phosphotyrosine motifs in activated receptors and phosphopeptides." *Curr Biol*, **5**(4): 404-412.
- Van Lint, J., Y. Ni, M. Valius, W. Merlevede und J. R. Vandenheede (1998). "Platelet-derived growth factor stimulates protein kinase D through the activation of Phospholipase Cgamma and protein kinase C." *J Biol Chem*, **273**(12): 7038-7043.
- Van Lint, J. V., J. Sinnett-Smith und E. Rozengurt (1995). "Expression and characterization of PKD, a phorbol ester and diacylglycerol-stimulated serine protein kinase." *J Biol Chem*, **270**(3): 1455-1461.
- Vanhaesebroeck, B., S. J. Leever, G. Panayotou und M. D. Waterfield (1997). "Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers." *Trends Biochem Sci*, **22**(7): 267-272.
- Vertommen, D., M. Rider, Y. Ni, E. Waelkens, W. Merlevede, J. R. Vandenheede und J. Van Lint (2000). "Regulation of protein kinase D by multisite phosphorylation. Identification

- of phosphorylation sites by mass spectrometry and characterization by site-directed mutagenesis." *J Biol Chem*, **275**(26): 19567-19576.
- Vogel, W., R. Lammers, J. Huang und A. Ullrich (1993). "Activation of a phosphotyrosine phosphatase by tyrosine phosphorylation." *Science*, **259**(5101): 1611-1614.
- Wahl, M. und G. Carpenter (1991). "Selective Phospholipase C activation." *Bioessays*, **13**(3): 107-113.
- Waldron, R. T., T. Iglesias und E. Rozengurt (1999). "Phosphorylation-dependent protein kinase D activation." *Electrophoresis*, **20**(2): 382-390.
- Waldron, R. T., T. Iglesias und E. Rozengurt (1999). "The pleckstrin homology domain of protein kinase D interacts preferentially with the eta isoform of protein kinase C." *J Biol Chem*, **274**(14): 9224-9230.
- Waldron, R. T., O. Rey, T. Iglesias, T. Tugal, D. Cantrell und E. Rozengurt (2001). "Activation loop Ser744 and Ser748 in protein kinase D are transphosphorylated in vivo." *J Biol Chem*, **276**(35): 32606-32615.
- Waldron, R. T. und E. Rozengurt (2000). "Oxidative stress induces protein kinase D activation in intact cells. Involvement of Src and dependence on protein kinase C." *J Biol Chem*, **275**(22): 17114-17121.
- Wallasch, C., F. U. Weiss, G. Niederfellner, B. Jallal, W. Issing und A. Ullrich (1995). "Heregulin-dependent regulation of HER2/neu oncogenic signaling by heterodimerization with HER3." *Embo J*, **14**(17): 4267-4275.
- Wang, H. Y., X. M. Jiang und D. Ganea (2000). "The neuropeptides VIP and PACAP inhibit IL-2 transcription by decreasing c-Jun and increasing JunB expression in T cells." *J Neuroimmunol*, **104**(1): 68-78.
- Wang, Y., R. T. Waldron, A. Dhaka, A. Patel, M. M. Riley, E. Rozengurt und J. Colicelli (2002). "The RAS effector RIN1 directly competes with RAF and is regulated by 14-3-3 proteins." *Mol Cell Biol*, **22**(3): 916-926.
- Waterfield, M. D., G. T. Scrace, N. Whittle, P. Stroobant, A. Johnsson, A. Wasteson, B. Westermark, C. H. Heldin, J. S. Huang und T. F. Deuel (1983). "Platelet-derived growth factor is structurally related to the putative transforming protein p28sis of simian sarcoma virus." *Nature*, **304**(5921): 35-39.
- Watson, S. und S. Arkininstall (1994). "The G-Protein linked receptor-facts book." *Academic Press, London*,: 1-129.

- Wedegaertner, P. B., D. H. Chu, P. T. Wilson, M. J. Levis und H. R. Bourne (1993). "Palmitoylation is required for signaling functions and membrane attachment of Gq alpha and Gs alpha." *J Biol Chem*, **268**(33): 25001-25008.
- Weidner, K. M., S. Di Cesare, M. Sachs, V. Brinkmann, J. Behrens und W. Birchmeier (1996). "Interaction between Gab1 and the c-Met receptor tyrosine kinase is responsible for epithelial morphogenesis." *Nature*, **384**(6605): 173-176.
- Westermark, B. und A. Wasteson (1976). "A platelet factor stimulating human normal glial cells." *Exp Cell Res*, **98**(1): 170-174.
- Wong, Y. H., B. R. Conklin und H. R. Bourne (1992). "Gz-mediated hormonal inhibition of cyclic AMP accumulation." *Science*, **255**(5042): 339-342.
- Wong, Y. H., A. Federman, A. M. Pace, I. Zachary, T. Evans, J. Pouyssegur und H. R. Bourne (1991). "Mutant alpha subunits of Gi2 inhibit cyclic AMP accumulation." *Nature*, **351**(6321): 63-65.
- Wu, D., A. Katz und M. I. Simon (1993). "Activation of Phospholipase C beta 2 by the alpha and beta gamma subunits of trimeric GTP-binding protein." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**(11): 5297-5301.
- Xu, Y., X. J. Fang, G. Casey und G. B. Mills (1995). "Lysophospholipids activate ovarian and breast cancer cells." *Biochem J*, **309**(Pt 3): 933-940.
- Yarden, Y., W. J. Kuang, T. Yang-Feng, L. Coussens, S. Munemitsu, T. J. Dull, E. Chen, J. Schlessinger, U. Francke und A. Ullrich (1987). "Human proto-oncogene c-kit: a new cell surface receptor tyrosine kinase for an unidentified ligand." *Embo J*, **6**(11): 3341-3351.
- Yarden, Y. und D. Schlessinger (1987). "Epidermal growth factor induces rapid, reversible aggregation of purified epidermal growth factor receptors." *Biochemistry*, **26**: 1443-1451.
- Yarden, Y. und A. Ullrich (1988). "Growth factor receptor tyrosine kinases." *Annu. Rev. Biochem.*, **57**: 443-478.
- Yeung, Y. G., P. T. Jubinsky, A. Sengupta, D. C. Yeung und E. R. Stanley (1987). "Purification of the colony-stimulating factor 1 receptor and demonstration of its tyrosine kinase activity." *Proc Natl Acad Sci U S A*, **84**(5): 1268-1271.
- Yu, H., J. K. Chen, S. Feng, D. C. Dalgarno, A. W. Brauer und S. L. Schreiber (1994). "Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains." *Cell*, **76**(5): 933-945.
- Yuan, J., D. Bae, D. Cantrell, A. E. Nel und E. Rozengurt (2002). "Protein kinase D is a downstream target of protein kinase Ctheta." *Biochem Biophys Res Commun*, **291**(3): 444-452.

- Yuan, J., L. Slice, J. H. Walsh und E. Rozengurt (2000). "Activation of protein kinase D by signaling through the alpha subunit of the heterotrimeric G protein G(q)." *J Biol Chem*, **275**(3): 2157-2164.
- Yuan, J., L. W. Slice und E. Rozengurt (2001). "Activation of protein kinase D by signaling through Rho and the alpha subunit of the heterotrimeric G protein G13." *J Biol Chem*, **276**(42): 38619-38627.
- Zhukova, E., J. Sinnett-Smith und E. Rozengurt (2001). "Protein kinase D potentiates DNA synthesis and cell proliferation induced by bombesin, vasopressin, or phorbol esters in Swiss 3T3 cells." *J Biol Chem*, **276**(43): 40298-40305.
- Zugaza, J. L., J. Sinnett-Smith, J. Van Lint und E. Rozengurt (1996). "Protein kinase D (PKD) activation in intact cells through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway." *Embo J*, **15**(22): 6220-6230.
- Zugaza, J. L., R. T. Waldron, J. Sinnett-Smith und E. Rozengurt (1997). "Bombesin, vasopressin, endothelin, bradykinin, and platelet-derived growth factor rapidly activate protein kinase D through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway." *J Biol Chem*, **272**(38): 23952-23960.

7 ABKÜRZUNGEN

| | |
|-------|--|
| ' | Minute |
| " | Sekunde |
| Abb. | Abbildung |
| Ak. | Antikörper |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| Arg | Arginin |
| AS | Aminosäuren |
| ATP | Adenosintri-phosphat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | Rinder-Serumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| °C | Grad Celsius |
| ca. | circa |
| CAM | Cell Adhesion Molecule |
| cDNA | komplementäre DNA |
| CHD | CAM Homology Domain |
| CTP | Cytosintri-phosphat |
| Da | Dalton (relative Molmasse) |
| DAB | Diaminobenzidin |
| DAG | Diazylglycerin |
| d. AG | diese Arbeitsgruppe |
| DMEM | Dulbecco's Modified Eagle Medium |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| dsDNA | doppelsträngige DNA |
| DTT | Dithiothreitol |
| ECL | Enhanced Chemoluminescence |
| ECM | Extrazelluläre Matrix |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EGF | Epidermal growth factor |
| EGFR | Epidermal growth factor receptor |
| ERK | Extracellular regulated kinase |
| FAK | Focal Adhesion Kinase |
| FCS | Fötale Kälberserum |
| FGF | Fibroblast growth factor |
| FGFR | Fibroblast growth factor receptor |
| Gab1 | Grb2-associated binder-1 |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| Gly | Glycin |
| GPCR | G-protein-coupled receptor |
| Grb2 | Growth factor receptor binding protein 2 |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| GTP | Guanosintri-phosphat |
| h | Stunde |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure |

| | |
|----------------------------------|---|
| HER | humaner EGFR |
| H ₂ O | Wasser |
| H ₂ O _{bide} | zweifach destilliertes Wasser |
| Ig | Immunglobulin |
| IP | Immunpräzipitation |
| IP ₃ | Inositol-1,4,5-triphosphat |
| JNK | c-Jun N-terminal kinase |
| kb | Kilobasen |
| kDa | Kilodalton |
| KCl | Kaliumchlorid |
| M | molar (Mole pro Liter) |
| MAP-Kinase | Mitogen activated protein kinase |
| MBP | Myelin Basic Protein |
| MEK | MAP/ERK Kinase |
| MG | Molekulargewicht |
| min | Minute |
| mRNA | messenger RNA |
| p.a. | zur Analyse |
| PBS | Phosphat-gepufferte Saline |
| PCR | Polymerase Kettenreaktion |
| PDGF | Platelet-derived growth factor |
| PDGFR | Platelet-derived growth factor receptor |
| PEG | Polyethylenglykol |
| PH-Domäne | Pleckstrin Homologie Domäne |
| PI 3-Kinase | Phosphatidylinositol 3-Kinase |
| PIP ₂ | Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat |
| PKC | Proteinkinase C |
| PKD | Proteinkinase D |
| PLC | Phospholipase C |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| POV | Pervanadat |
| PTB | Phosphotyrosine binding |
| PTP(n) | Proteintyrosinphosphatase(n) |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | Umdrehungen pro Minute |
| RT | Raumtemperatur |
| RTK(n) | Rezeptortyrosinkinase(n) |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| SDS-PAGE | SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| SHC | Src-homology-2 domain-containing transforming protein 1 |
| SH2-Domäne | Src-Homologie-2 Domäne |
| SH3-Domäne | Src-Homologie-3 Domäne |
| Sos | Son of sevenless |
| ssDNA | einzelsträngige DNA |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin |
| TGF | Transforming growth factor |
| TMD | Transmembrandomäne |
| Tris | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan |
| TTP | Thymintriphosphat |

| | |
|----------|------------------------------------|
| Tween 20 | Polyoxyethylensorbitan-monolaureat |
| U | Enzymaktivitätseinheit (Unit) |
| u.a. | unter anderem |
| ü.N. | über Nacht |
| UV | Ultraviolett |
| V | Volt |
| vEGF | Vascular endothelial growth factor |
| Vol. | Volumen |
| v/v | Volumen pro (Gesamt-)Volumen |
| w/v | Masse pro (Gesamt-)Volumen |
| w/w | Masse pro (Gesamt-)Masse |
| z.B. | zum Beispiel |

8 LEBENS LAUF

Name: Christina Besir, geb.Bauer
Geburtsdatum: 6. Februar 1973
Geburtsort: Hannover
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: verheiratet
Adresse: Filchnerstraße 104
81476 München

Schulausbildung:

1979 – 1983: Grundschule Isernhagen NB
1983 – 1985: Orientierungsstufe Isernhagen NB
1985 – 1992: Gymnasium Isernhagen – Abitur 1992

Akademische Ausbildung:

10/92 – 04/98: Studium der Biochemie an der Universität Hannover

09/93 Vordiplom in Biologie und Physik
09/94 Vordiplom in Biochemie, Organischer Chemie, Anorganischer Chemie und Physikalischer Chemie

03/96 – 05/96: Proteinchemisches Praktikum in der Abteilung für Z-DNA des Massachusetts Institute of Technology

04/97: Diplom in Biochemie, Biophysikalischer Chemie und Immunologie
05/97 – 11/97: Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Membranbiochemie, Prof. Dr. Dieter Oesterhelt

8. Lebenslauf

- 01/98 – 09/98: Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Membranbiochemie, Prof. Dr. Dieter
Oesterhelt
- 10/98 – 01/03: Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie
Abteilung für Molekularbiologie, Prof. Dr. Axel Ullrich
- 27.01.03: Mündliche Prüfung

DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank all jenen aussprechen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. Axel Ullrich für sein großes Interesse und seine großzügige Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit. Darüber hinaus möchte ich ihm für die besonderen Freiräume und für die Bereitstellung bester Arbeitsbedingungen danken.

Sehr herzlich möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Domdey für seine Bereitschaft danken, meine Dissertation als Doktorvater an der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität zu betreuen.

Ganz herzlich bedanken möchte ich mich natürlich bei meiner Familie, die mich während all der Jahre unterstützt hat und mir mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ein weiteres Dankeschön an Anja, Ingemarie, Charlie, Yingyie, Andy, Beatrice, Barbara, Christiane, Marta, Jochen, Johannes, Anil, Christoph, Norbert, Beatrix, Martin, Jens, Stefan, Esther, Michael, Jan, Marc, Andreas G., Oliver, Reimar, Kunkel, Roidl, Sylvia, Susanne, Markus, Lars und Miriam für viele nette Stunden im Labor, für gute Diskussionen und Ratschläge und natürlich für viele unvergessliche Feste. Ganz herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Pjotr Knyazev und Uta Eichelsbacher.

Schließlich möchte ich mich ganz besonders bei meinem Mann Hüseyin Besir bedanken, der mit mir all die Jahre verständnisvoll durch dick und dünn gegangen ist.

Allen Freunden und Verwandten, insbesondere meiner besten Freundin Andrea Rahaus, danke ich für die nie endende Unterstützung.