

Über die Rolle von PKC bei der Reorganisation des Zytoskeletts

Fachbereich für Biologie der Universität Hannover

**Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer.nat.)**

genehmigte Dissertation vorgelegt von Dominique Brandt

geboren am 26.06.1973 in Bonn/Bad Godesberg

Erscheinungsjahr: 2003

**Angefertigt in der Abteilung für Nephrologie der Medizinischen Hochschule
Hannover**

Referent: Prof. Dr. H. -P. Braun
Korreferent: PD Dr. Harald Mischak

Tag der Prüfung: 05.02.2003

Zusammenfassung

TPA-Stimulation führt in einer Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen zu einer kompletten Desintegration der Aktin-Stressfasern und zur Ausbildung von „ruffles“ in der Peripherie der Zelle. Dieses Phänomen aber vor allem die Aufklärung der Signaltransduktionskaskade, über die dieser Vorgang gesteuert wird, war die Grundlage dieser Arbeit.

Unter Zuhilfenahme spezifischer Inhibitoren konnte gezeigt werden, daß die TPA-induzierte Reorganisation des Zytoskeletts von der Kinase-Aktivität von PKC und ohne die Beteiligung des Translationellen Apparates abläuft.

Es konnte ferner gezeigt werden, dass der erste Schritt in der Signaltransduktionskaskade, die zur PKC-vermittelten Reorganisation des Zytoskeletts führt, in der Aktivierung der Tyrosin-Kinase Src besteht. Unter Verwendung spezifischer Inhibitoren und eines Kinase-inaktiven Src-Konstrukts konnte gezeigt werden, dass die Src-Aktivität notwendig für die PKC-induzierte Reorganisation des Zytoskeletts ist. Anhand von *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass PKC Src wahrscheinlich nicht direkt, sondern über die Protein Tyrosin Phosphatase PTP α aktiviert wird.

Src phosphoryliert und aktiviert in weiterer Folge das GTPase-aktivierende Protein p190RhoGap. Nach TPA-Stimulation ließ sich eine verstärkte Tyrosin-Phosphorylierung in p190RhoGap nachweisen. Mittels spezifischer Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Tyrosin-Phosphorylierung in p190 RhoGap über eine PKC-vermittelte Src-Aktivierung gesteuert wird.

Die Aktivität von p190RhoGap führt zu einer Aktivitätsverminderung von Rho.

Mit Hilfe von GST-Fusionproteinen, die spezifisch die aktive Konformation der „kleinen“ G-Proteine erkennt wurde der Aktivitätsstatus von Rac, Rho und Cdc42 analysiert. Die Aktivität von Rac und Cdc42 verblieb im Verlauf der TPA-Stimulation konstant, während für Rho nach TPA-Stimulation eine signifikante Aktivitätsverminderung verzeichnet werden konnte.

Die verminderte Rho-Aktivität nach TPA-Stimulation führte zur Ausbildung eines Rac-ähnlichen Phänotyps: die Auflösung der Aktin-Stressfasern und die Ausbildung von protrusiven Strukturen („ruffles“) in der Peripherie der Zelle.

Abstract

We have investigated the mechanism of PKC-induced actin reorganization in A7r5 vascular smooth muscle cells. PKC activation by 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) induces the disassembly of actin stress fibers concomitant with the appearance of membrane ruffles. PKC also induces rapid tyrosine phosphorylation in these cells. As we could show utilizing the Src-specific inhibitor PP2, actin reorganization is dependent on PKC-induced Src-activation. Subsequently, the activity of the small G-protein RhoA is decreased, while Rac and Cdc42 activities remain unchanged. Disassembly of actin stress fibers could also be observed using the Rho-kinase-specific inhibitor Y-27632, indicating that the decrease in RhoA activity by its own is responsible for actin reorganization. In addition, we show that tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP is increased upon TPA-stimulation, directly linking Src activation to a decrease in RhoA activity. Our data provide substantial evidence for a model elucidating the molecular mechanisms of PKC-induced actin rearrangements.

Schlagwörter

Protein Kinase C (PKC), Aktin Zytoskelett, Src

Keywords

Protein Kinase C (PKC), Actin Cytoskeleton, Src

1	Einleitung	9
1.1	Die Protein Kinase C-Enzymfamilie	9
1.1.1	Struktur und Einteilung	10
1.1.2	Regulation und Aktivierung	12
1.1.3	PKC Depletion und Hemmung	15
1.1.4	PKC Isoenzym Expression	16
1.1.5	Substrate	17
1.1.6	PKC-Isoenzyme in der Differenzierung und Transformation	19
1.2	Rho-GTPasen und das Zytoskelett	22
1.2.1	Regulation und Funktion	22
1.2.2	Effektoren für Rho	24
1.2.3	Effektoren für Rac und Cdc42	26
1.3	PKC und das Zytoskelett	28
1.4	Zielsetzung	30
2	Material und Methoden	32
2.1	Reagenzien/Materialien	32
2.1.1	Antikörper	33
2.1.2	Kits	34
2.1.3	Standardlösungen und – puffer	34
2.1.4	Biologisches Material	34
	Bakterienstämme	34
	Eukaryotische Zell-Linien	34
2.2	Methoden	35
2.2.1	Mikrobiologische Techniken	35
	Kultivierung von Bakterien	35
	Transformation von Bakterien	35
2.2.2	Eukaryotische Zellkultur	36
	Kultivierung von Insektenzellen	36
	Kultivierung und Transfektion von glatten Muskelzellen	36
	Kryokonservierung	37
2.2.3	Molekularbiologische Techniken	37
	Plasmidpräparation	37
	Konzentrationsbestimmung von DNA	37

Analytische Agarosegelelektrophorese	37
2.2.4 Biochemische Techniken	38
Aufreinigung von rekombinanten PKCs aus Sf-9 Zellen	38
Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus E.coli	39
In vitro Kinase-assay	39
SDS Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	41
Western-Blot	41
Immunpräzipitation	42
Immunologische Detektion von Src in fixierten Zellen	43
Konfokale Mikroskopie	44
Phosphatase-Assays	44
GTPase-Assays	45
3 Ergebnisse	46
3.1. PKC-Aktivierung führt zur Reorganisation des Zytoskeletts in A7r5- Zellen	46
3.2. Die PKC-vermittelte Reorganisation des Zytoskeletts wird über eine Aktivitätsverminderung von Rho gesteuert	48
3.3. Die PKC-induzierte Aktivierung der Tyrosin-Kinase Src ist notwendig für die Reorganisation des Zytoskeletts	52
3.4. TPA induziert die Tyrosin-Phosphorylierung von p190RhoGap über die Aktivierung von PKC und Src	58
3.5. TPA-Stimulation führt zu einem Anstieg der Phosphatase-Aktivität von PTP α gegenüber para-Nitro Phenyl Phosphat (pNPP) und Src	60
3.6. PKC δ phosphoryliert PTP α <i>in vitro</i>	62
3.7. PKC δ aktiviert PTP α <i>in vitro</i>	64
3.8. Dermale Fibroblasten aus PKC δ knock out Mäusen zeigen eine verminderte Fähigkeit, Src nach TPA-Stimulation zu aktivieren	66

4	Diskussion	68
4.1	Zum Mechanismus der PKC-vermittelten Src-Aktivierung	69
4.2	Über p190RhoGap	72
4.3	PKC und Rho	74
4.4	Über die PKC-vermittelte Reorganisation des Zytoskeletts	75
4.5	Über die Rolle von PKC bei der Migration	76
5	Zusammenfassung	80
	Literaturverzeichnis	
81		
	Abkürzungsverzeichnis	106
	Danksagung	107
	Eidesstattliche Erklärung	108
	Lebenslauf	109

1 Einleitung

Eine Zelle kann auf Reize aus ihrer Umwelt sehr differenziert reagieren. Damit es zu einer fein abgestimmten Reizantwort kommt, bedarf es eines komplizierten Netzwerkes für die Signalverarbeitung. Dieses muß dazu in der Lage sein, die Information, die durch Rezeptoren an der Zelloberfläche als solche erkannt und angenommen werden, innerhalb der Zelle weiterzuleiten und zu modulieren.

Am Ende der Signaltransduktion steht die zelluläre Antwort, die sehr unterschiedlich ausgeprägt sein kann. So kann es z.B. zur Expression von Genen, die für Stoffwechsellenzyme kodieren, oder zur Umorganisation des Zytoskeletts kommen.

Bei den Komponenten des Signaltransduktionssystems der Zelle handelt es sich unter anderem um Kinasen, bzw. um Kinasekaskaden und deren Antagonisten, den Phosphatasen. Der Grund für die Existenz dieser Kaskaden liegt vermutlich eher in der Bereitstellung einer Vielzahl von Verknüpfungspunkten für das Netzwerk, als in der Signalverstärkung, wie es in den klassischen biochemischen Mechanismen z.B. im Glycogenstoffwechsel, der Fall ist. Jeder Verknüpfungspunkt bietet vielfältige Möglichkeiten zur Interaktion mit weiteren Komponenten wie Regulatoren, Aktivatoren und Inhibitoren.

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Familie der Protein Kinase C (PKC), die durch viele extrazelluläre Signale aktiviert werden kann. Da sie relativ weit oben in der Hierarchie der zellulären Signaltransduktion steht, ist diese Gruppe von Kinasen in der Lage, eine Phosphorylierung vieler unterschiedlicher Zielproteine direkt oder indirekt hervorzurufen. Deshalb ist die Reihe der durch PKC-vermittelten Effekte vielfältig.

Im folgenden soll eine kurze Einführung über die Natur der PKC-Familie gegeben werden.

1.1 Die Protein Kinase C-Enzymfamilie

Protein Kinase C (PKC) wurde ursprünglich biochemisch als Serin / Threonin spezifische Kinase beschrieben, die durch Proteolyse, Phospholipid und Ca^{2+} aktiviert werden kann (Inoue et al., 1977). Die Entdeckung, dass PKC der

hauptsächliche intrazelluläre Rezeptor für Tumorpromotoren aus der Klasse der Phorbolster ist (Castagna et al., 1982), stellte eine direkte Verbindung zwischen PKC und Tumorgenese her und hat das Interesse an der Aufklärung der biologischen Rolle von PKC intensiviert. Wie aus der äußerst umfangreichen Literatur ersichtlich, ist PKC bei der Regulation einer ganzen Reihe von zellulären Prozessen beteiligt, welche die Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Zelltyp-spezifische Funktionen, wie z.B. Plättchenaktivierung, Sekretion von Antikörpern oder Neurotransmittern und die dynamischen Modulation des Zytoskeletts steuern. Für eine detaillierte Darstellung dieser diversen Funktionen von PKC sei auf kürzlich erschienene Übersichtsartikel verwiesen (Toker, 1998; Newton, 1995). Um den Rahmen dieser Einleitung nicht zu sprengen, soll hier daher nur auf die Aspekte eingegangen werden, die für das Verständnis der in der Folge beschriebenen eigenen Arbeiten relevant sind.

1.1.1 Struktur und Einteilung

Die PKC-Familie umfaßt eine Gruppe von 10 verwandten Serin-/Threoninkinasen, die eine bedeutende Stellung in vielen Signaltransduktionswegen innerhalb der Zelle einnimmt.

Schematisch läßt sich die PKC Struktur in eine N-terminale regulatorische Domäne von ca. 25-50kDa und eine katalytische Domäne von ca. 45kDa teilen (Fig. 1), die jeweils von konservierten (C1-C4) und variablen (V1-V5) Regionen gebildet werden (Newton, 1995). In der ersten konservierten Domäne, C1, befindet sich die sogenannte Pseudosubstratregion. Diese Region (RKGALRQK in den cPKSs) besitzt hohe Affinität zur Substratbindungsstelle von PKC (House and Kemp, 1987) und inhibiert im inaktiven Zustand des Enzyms vermutlich die Kinase Domäne. Des Weiteren beinhaltet C1 die Phospholipid- und sn-1,2-Diacylglycerol (DAG) / Phorbolster Bindungsdomäne. Die Bindung dieser Substanzen erfolgt über zwei Cystein-reiche Zinkfinger. Phorbolster, wie z.B. TPA konkurrieren mit DAG, dem physiologischen Aktivator von PKC, um dieselbe Bindungsstelle (Sharkey and Blumberg, 1985), führen aber aufgrund ihrer vergleichsweise größeren Stabilität zu einer stärkeren und länger anhaltenden Aktivierung. C2 ist die Ca^{2+} -bindende Domäne, deren Deletion oder Fehlen die PKC Aktivierung Ca^{2+} -unabhängig macht (Kaibuchi et al., 1989).

Die regulatorische Einheit ist durch eine relativ bewegliche Region, V3, von der katalytischen Domäne des Enzyms getrennt. Proteolytische Spaltung des Enzyms erfolgt primär in V3 und führt zu einem ca. 45-50 kd großen Fragment, das nunmehr konstitutive Kinaseaktivität aufweist. C3 repräsentiert die ATP-Bindungsstelle der Kinasedomäne sowie die Substratbindungsstelle.

Aufgrund struktureller und biochemischer Unterschiede kann man die PKC Familie in drei Untergruppen einteilen. PKC α , β_1 und β_2 (diese beiden Formen entsprechen alternativ gespleißten Transkripten desselben Gens) sowie PKC γ erfüllen alle Voraussetzungen der "klassischen" oder cPKCs: sie werden durch Ca²⁺, DAG und Phospholipide aktiviert (Knopf et al., 1986). PKC δ , ϵ , η und θ oft als "neue" oder nPKCs bezeichnet, zeichnen sich durch die Abwesenheit der C2 Domäne aus. Diese Enzyme zeigen daher auch keinerlei Ca²⁺ -Abhängigkeit und werden durch Phospholipide und DAG oder Phorbolster alleine aktiviert (Ohno et al., 1988a; Ohno et al., 1988b; Mischak et al., 1991a; Osada et al., 1990; Ono et al., 1989). Die "atypischen" oder aPKCs, PKC- λ und ζ , besitzen nur mehr einen der beiden Zinkfinger in C1, und können kein DAG oder Phorbolster binden bzw. dadurch aktiviert werden (Goodnight et al., 1992; Selbie et al., 1993; Akimoto et al., 1994) . Ihre Aktivität scheint nur mehr von der Anwesenheit von Phospholipiden abhängig. Die strukturelle und biochemische Heterogenität der PKC Familie ist ausführlich in Reviews von Ohno et al. (Ohno et al., 1991), Nishizuka (1992), und Goodnight et al. (Goodnight et al., 1994) diskutiert.

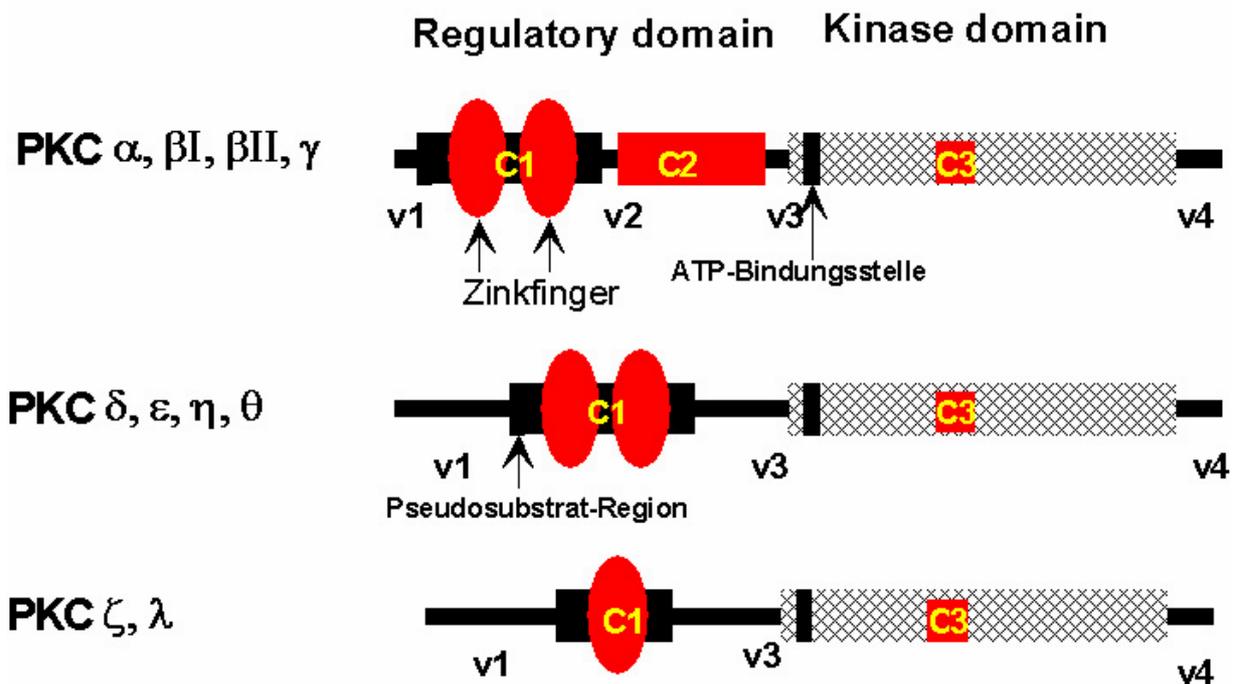


Abbildung 1.1 Struktur der PKC Isoenzyme. C1 bis C3 stellen die konservierten Regionen dar, während v1 bis v4 die variablen Regionen (in schwarz) repräsentiert.

1.1.2 Regulation und Aktivierung

Innerhalb der zellulären Signaltransduktion werden konventionelle und neuartige PKCs in erster Linie durch Lipidmediatoren aktiviert (Nishizuka, 1992; Nishizuka, 1995). Die Stimulierung durch Agonisten, wie z.B. Wachstumsfaktoren, führt zur rezeptorvermittelten Aktivierung von Phospholipasen (PLCs; (Valius and Kazlauskas, 1993). Dies kann im Fall von PLC γ und PLC δ über die Bindung der enzymeigenen SH2-Domäne (SH2=Src Homology-2) an Tyrosin- oder Rezeptor-kinasen geschehen (Rhee and Choi, 1992), oder aber G-Protein vermittelt, wie bei den PLCs β 1-3 (Taylor et al., 1991). Daraufhin werden membranständige Phospholipide wie Phosphatidylinositol (PI), PI-4-phosphat oder PI-4,5-diphosphat (PIP₂) zu DAG und löslichen Inositolphosphaten gespalten. Die letzteren fungieren als sekundäre Botenstoffe und sind für die Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Kalziumspeichern verantwortlich. Das membranständige DAG bindet an die cysteinreiche C1-Domäne von PKCs.

Darüber hinaus werden in der Literatur Phosphoinositide, im Besonderen die Phosphoinositid 3-kinase (PI 3-K) Produkte PtdIns-3,4-P2 und PtdIns-3,4,5-P3 als Aktivatoren für nPKCs (δ , ϵ und η) und aPKC (ζ) beschrieben und diskutiert (Singh et al., 1993; Toker et al., 1994).

Erst vor kurzem wurde aber ein indirekter Aktivierungsmechanismus beschrieben, der von der PI 3-K abhängigen Aktivierung der PDK1 (Phosphoinositol-dependent kinase 1) ausgeht (Le Good et al., 1998; Belham et al., 1999; Dutil et al., 1998). PDK1 wird durch Phosphoinositide, die durch PI3-K gebildet werden, aktiviert und phosphoryliert PKCs an einer kritischen Position innerhalb der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne (Dutil et al., 1998). Diese Phosphorylierung führt zu einer Konformationsänderung im Protein und befähigt die Kinase nun eine Autophosphorylierung an zwei Stellen im Carboxyterminus zu vollziehen. Diese Abfolge von Phosphorylierungen wird in der Literatur als wichtige Voraussetzung für die Aktivierbarkeit von PKCs diskutiert (Le Good et al., 1998; Belham et al., 1999; Dutil et al., 1998).

Der molekulare Mechanismus der vollständigen PKC-Aktivierung ist sehr komplex und wegen des Mangels an Strukturdaten weitgehend spekulativ. Ein Modell für konventionelle PKCs ist in Abbildung 2 dargestellt. In diesem Modell werden mehrere Stufen der Aktivierung unterschieden (Newton, 1997).

1. Neu synthetisierte PKC-Moleküle befinden sich lose mit Bestandteilen des Zytoskeletts assoziiert vorrangig im Zytoplasma. Die Aktivierungsschleife, ein Region nahe dem aktiven Zentrum in der C4-Domäne, ist für zytosolische Proteine frei zugänglich, während der C-Terminus sterisch das aktive Zentrum blockiert. Mögliche PKC-Kinasen, wie sie von Keranen et al. (Keranen et al., 1995) postuliert und vor kurzem gefunden wurden (PDK 1 (Chou et al., 1998; Le Good et al., 1998)), sind nach Aktivierung in der Lage, ein Threonin in der Aktivierungsschleife zu phosphorylieren. Dadurch wird die Konformation so beeinflusst, dass die PKC nun katalytisch aktiv ist und sich selbst an zwei Stellen in C4 phosphoryliert (kin+). Durch diese Autophosphorylierung wird die Assoziation mit dem Zytoskelett aufgehoben, und die N-terminale Pseudosubstratsequenz blockiert jetzt die im Zytosol frei vorliegende PKC. Darüber hinaus stellen zusätzliche Phosphorylierungen von nicht-konservierten Aminosäureresten eventuell einen Mechanismus für isoformselektive und stimulusspezifische

Regulation der PKCs dar, wie z.B. die Tyrosinphosphorylierung in PKC δ (Li et al., 1996a; Soltoff and Toker, 1995; Li et al., 1994a).

2. Der weitere Fortgang der Aktivierung wird sehr kontrovers diskutiert. Es wurde beschrieben, dass für cPKCs intrazelluläre Ca²⁺-Ionen notwendig sind, um diese Isoformen durch den sekundären Membranbotenstoff DAG zu aktivieren (Kruger et al., 1991). Darüber hinaus wurden von Mochley-Rosen und Mitarbeitern die RACK-Proteine (Receptor for activated C kinase) entdeckt (Mochly-Rosen and Gordon, 1998). Aufgrund ihrer PKC-bindenden Eigenschaften, ohne als Substrat zu fungieren, wurde postuliert, dass es sich hierbei um Isoenzym-spezifische Adapterproteine handelt. Diese könnten dafür sorgen, dass die reife PKC an die Membranen der Zellkompartimente gelangt, an denen sie rasch auf den Sekundärbotenstoff DAG und spezifische Substrate reagieren kann (Jaken, 1996).
3. Der finale Aktivierungsschritt beinhaltet die Bindung von DAG an die C1-Domäne. Dieses entsteht nach erfolgter Signalrezeption und -weiterleitung durch die hydrolytische Spaltung von Phospholipiden (Nishizuka, 1995). Dieser Prozess wird durch die Bindung des membranständigen Kofaktors Phosphatidylserin (PS an C2 - bei cPKCs Ca²⁺-abhängig- unterstützt. Andererseits kommt es durch die induzierte Konformationsänderung auch zur Entfernung der Pseudosubstratsequenz aus dem aktiven Zentrum (Azzi et al., 1992). Die aktivierte PKC (Kin*) ist nun in der Lage, Substrate zu binden und zu phosphorylieren.

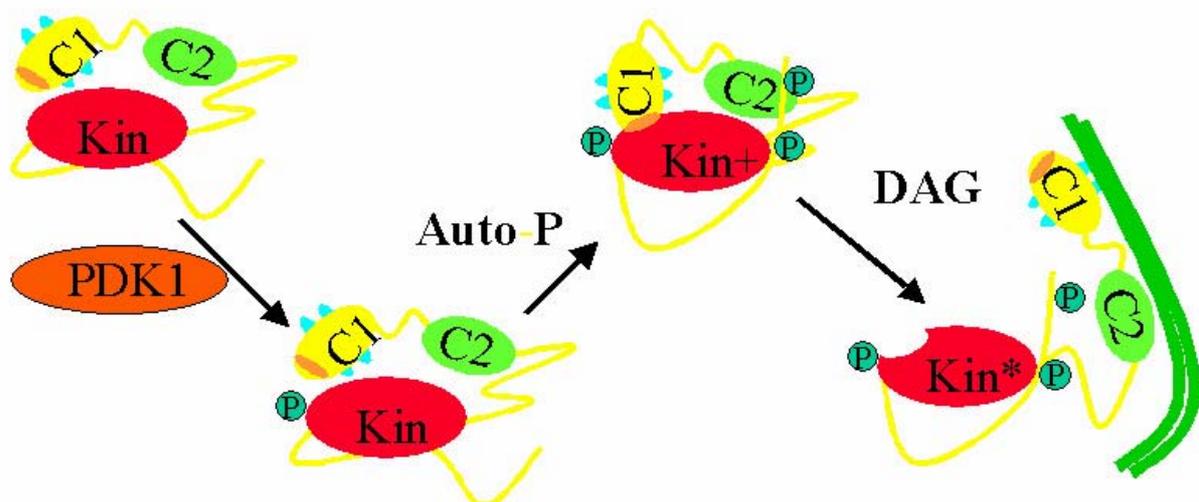


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung der PKC-Aktivierung

PDK1 phosphoryliert PKC in der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne (Threonin 500 in PKC β_2). Auf diese Transphosphorylierung folgt eine Autophosphorylierung am Carboxyterminus (Threonin 641 und Serin 660 in PKC β_2 , welche die Kinase in einer katalytisch kompetenten Konformation hält (Kin+). Die Bindung von DAG führt zur Translokation der "reifen" PKC an die Membran, wo die Interaktion der beiden konservierten Regionen C1 und C2 mit DAG und Phosphatidylserin zu konformationellen Änderungen im Protein führen, die letztlich die Pseudosubstrat-Region aus der Substrat-Bindungsstelle drängen. Die Kinase ist jetzt aktiv und kann Substrate phosphorylieren (Kin*).

1.1.3 PKC Depletion und Hemmung

Neben der Dissoziation von DAG von der C1-Domäne, ist der Hauptweg zur Deaktivierung von PKC in der Zelle nach TPA-oder DAG-Stimulation die Ubiquitinierung und die nachfolgende proteolytische Degradation über das Proteasom (Lee et al., 1997; Lu et al., 1998).

Die Beobachtung, dass längere PKC Aktivierung mit TPA *in vivo* zum Verschwinden von immunologisch detektierbarer PKC führt wurde relativ bald ausgenützt, um Zellen von PKC zu depletieren und somit die Rolle von PKC in verschiedenen Signaltransduktionswegen zu studieren. Diese Methode ist jedoch nach heutigem Wissensstand aus mehreren Gründen problematisch: i) Diese Methode führt keineswegs zur Depletion von aPKCs, u.a. vermutlich da diese durch TPA auch nicht aktiviert werden (Goodnight et al., 1992). ii) Neusynthese von PKC mRNA kann dadurch nicht gehemmt werden (Rose-John et al., 1988) und somit wird PKC auch kontinuierlich neu synthetisiert. iii) die Effizienz der proteolytischen Spaltung ist abhängig von Zelltyp, Isoenzym, sowie dem verwendeten Aktivator (Blackshear et al., 1991; Arnold et al., 1993; Szallasi et al., 1994) und eine vollständige Depletion aller PKC Isoenzyme konnte bis jetzt noch in keiner genauer untersuchten Zelllinie festgestellt werden.

Der mittlerweile immer häufiger angewandte Weg zur Inhibition der PKC Aktivität *in vivo* ist der Einsatz von spezifischen PKC Inhibitoren. Die ersten

Inhibitoren, H-7 und Staurosporin, waren nicht nur relativ stark zelltoxisch, sondern auch sehr unspezifisch und hemmen viele Kinasen z.T. sogar besser als PKC (Hidaka et al., 1984). Untersuchungen einer großen Zahl von synthetischen Staurosporin-verwandten Verbindungen führte zur Entdeckung von sehr spezifischen PKC Inhibitoren aus der Klasse der Indolocarbazole und Bisindolylmaleimide, welche PKC sehr selektiv bereits im nanomolaren Bereich hemmen und erst ab etwa 10 μ M zytotoxisch wirken. Der am weitesten verbreitete Inhibitor ist das Bisindolylmaleimidderivat GF 109203X (Toullec et al., 1991). Allerdings besitzen auch diese Inhibitoren den Nachteil, dass sie die α PKCs nur ineffizient hemmen. Um nur ein bestimmtes PKC Isoenzym zu hemmen bzw. auch α PKCs zu inhibieren, wurden daher zwei weitere Strategien eingesetzt: die Verwendung von Antisense-Konstrukten bzw. Oligonukleotiden (Farese et al., 1991) sowie die Expression von "dominant negativen" Mutanten (Berra et al., 1993). Diese Strategien sind jedoch ebenfalls umstritten, da beide Methoden nicht immer zu reproduzierbaren Resultaten führen.

1.1.4 PKC Isoenzym Expression

Die Expression der verschiedenen PKC Isoenzyme ist relativ strikt kontrolliert. Es konnten in jedem Organ- bzw. Zelltyp spezifische Isoenzym-Muster nachgewiesen werden, wobei in der Regel mehrere Isoenzyme gleichzeitig exprimiert werden. PKC- δ ist ubiquitär exprimiert, ebenso PKC- α (mit Ausnahme von murinen myeloiden Zellen) während andere Isoformen ausschließlich oder preferentiell in bestimmten Geweben exprimiert werden. Zum Beispiel wird PKC- γ ausschließlich in neuronalen Geweben gefunden, PKC- η ist nur in der Epidermis und in T Zellen hoch exprimiert, und PKC- θ in Skelettmuskelgewebe und T Zellen (Osada et al., 1990; Mischak et al., 1991a; Mischak et al., 1991b; Osada et al., 1992; Dlugosz et al., 1992; Mischak et al., 1993a). Die gewebsspezifischen Expressionsmuster und auch die biochemischen Unterschiede zwischen den einzelnen Isoenzymen gaben erste Hinweise, dass die Isoenzyme unterschiedliche biologische Funktionen erfüllen sollten. Bisher konnten unterschiedliche biologische Aktivitäten einzelner PKC Isoenzyme allerdings nur

anhand weniger Beispiele in überzeugender Weise gezeigt werden (Watanabe et al., 1992; Mishima et al., 1994; Mischak et al., 1993b; Mischak et al., 1993a; Hata et al., 1993).

1.1.5 Substrate

In der Literatur lassen sich bis auf wenige Ausnahmen nur wenige isoformspezifische Substrate finden. Dazu gehören die Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK 3 β , (Goode et al., 1992), Raf 1-Kinase (Sozeri et al., 1992), heterogenes Ribonucleoprotein A1 (Municio et al., 1995) und Elogationsfaktor eEF-1 α (Kielbassa et al., 1995). Bei allen anderen beschriebenen putativen Substraten ist bislang noch unklar, welche Isoform für die Phosphorylierung verantwortlich ist.

Häufig ist die Frage danach, ob PKC diese Phosphorylierung direkt, oder indirekt über die Aktivierung einer anderen Kinase steuert, ebenfalls ungeklärt. Deshalb wird im Folgenden auf eine Listung der putativen Substrate verzichtet.

Wie in Kapitel 1.1.2 schon angedeutet, ist die Substratspezifität der einzelnen PKC-Isoenzyme nur sehr bedingt durch eine Konsensussequenz in mögliche Substrate definiert (Kazanietz et al., 1993). Das allgemeine Charakteristikum für ein Substrat kann auf das Sequenzmotiv RXXS(T)XR (X ist eine beliebige Aminosäure) reduziert werden (Nishikawa et al., 1997). Vielmehr entsteht die Spezifität aufgrund des Wechselspiels von räumlicher Struktur, zellulärer Lokalisation, d.h. der räumlichen Nähe zu Zielproteinen, und akzessorischen Proteinen, die eventuell diese gerichtete Lokalisation vermitteln.

Die differentielle Verteilung von PKC-Isoformen in Kombination mit unterschiedlichen biologischen Effekten wurde durch Überexpression in diversen Zellkultursystemen gezeigt (Mischak et al., 1993b; Mischak et al., 1993a; Goodnight et al., 1995; Kiley and Parker, 1995). Auch Experimente mit PKCs, die mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) fusioniert wurden und somit eine Detektion in lebenden Zellen zuließen, zeigten schon kurz nach Zugabe von stimulierenden Agenzien eine isoformspezifische Verteilung ((Sakai et al., 1997; Feng et al., 1998), und eigene Beobachtungen).

Zu den bestuntersuchtsten und bekanntesten PKC-Substraten zählt das 80kDa ubiquitär exprimierte myristoyliertes Alanin-reiches C Kinase Substrat (MARCKS) (Wu et al., 1982; Rozengurt et al., 1983; Blackshear, 1993).

MARCKS bindet vermutlich über dieselbe Domäne entweder Ca^{2+} -abhängig an Calmodulin oder an Aktin und führt in zweiterem Fall zur Vernetzung von Aktin-Filamenten (Hartwig et al., 1992). Phosphorylierung von MARCKS reduziert sowohl die Affinität für Calmodulin als auch seine Aktivität als Aktin-Filament bündelndes Protein. Darüber hinaus konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von MARCKS durch PKC mit einer veränderten subzellulären Lokalisation des Proteins einher geht (Allen and Aderem, 1995).

In einer Arbeit von Überall et al. konnte anhand von Experimenten mit konstitutiv-aktiven oder kinase-inaktiven PKC-Isoenzymen gezeigt werden, dass MARCKS in intakten NIH 3T3 Fibroblasten spezifisch von $PKC\alpha$, ϵ und θ phosphoryliert wird (Überall et al., 1997).

Nachdem lange Zeit spekuliert wurde, dass es sich bei MARCKS um einen Mediator für die PKC-kontrollierte Zellmotilität und Sekretion handelt, konnte erst kürzlich die PKC-vermittelte MARCKS Phosphorylierung in einen physiologischen Zusammenhang gestellt werden. Rose et al. (Rose et al., 2001) konnte zeigen, dass in permeabilisierten Chromaffinen Zellen, die TPA-induzierte Auflösung des korikalen Netzwerkes von Aktinfilamenten und damit die Sekretion von Catecholamin-haltigen Vesikeln durch die Bereitstellung eines Peptides welches die Phosphorylierungssequenz von MARCKS enthielt, inhibiert werden konnte. Damit konnte direkt die Aktivität von PKC an der Modulation der Dynamik des Zytoskeletts festgemacht werden.

Lamin B wurde ebenfalls als PKC-Substrat beschrieben. Phosphorylierung von Lamin B im Zuge der Mitose führt zum Zusammenbruch der nukleären Hülle, was ein notwendiger Schritt in der Zellteilung ist (Murray et al., 1994).

Ferner konnte gezeigt werden, dass PKC eine Reihe von Signaltransduktionsfaktoren phosphoryliert und in ihrer Funktion moduliert. So führt die Phosphorylierung des EGF-Rezeptors durch PKC zur Internalisierung und proteolytischen Spaltung des Rezeptors (Hunter et al., 1984). Die PKC-abhängige Phosphorylierung G-Protein gekoppelter Rezeptoren (z.B. Acetylcholin- oder Photorezeptoren) bewirkt eine verstärkte Desensitivierung der Signaltransduktion dieser Rezeptoren (Hardie et al., 1993; Downing and Role, 1987). Des weiteren

resultiert die direkte Phosphorylierung von Raf-1 durch cPKCs (Sozeri et al., 1992) in einer Aktivierung der Kinase, was bei gemeinsamer Überexpression von Raf-1 und PKC α zu maligner Transformation in Mausfibroblasten führt (Kolch et al., 1993).

GSK 3 β wird durch die PKC-abhängige Phosphorylierung deaktiviert, wodurch eine durch diese Kinase ausgeführte inhibierende Phosphorylierung des c-Jun Proteins in dessen DNA-Bindungsdomäne unterbleibt (Goode et al., 1992). C-Jun ist Bestandteil des AP-1 Transkriptionsfaktors, der ursprünglich als nukleärer Effektor von PKC beschrieben wurde.

1.1.6 PKC-Isoenzyme in der Differenzierung und Transformation

Bereits 1982 beschrieben Castagna und Mitarbeiter (Castagna et al., 1982), dass Phorbolster und damit vermutlich auch deren hauptsächlichen Zielmoleküle, die PKCs, die Differenzierung induzieren. Auch die tumorpromovierende Wirkung der Phorbolster ist schon länger bekannt.

Diese Phänomene wurden vorrangig im Zusammenhang mit myeloider Differenzierung, der Differenzierung von Keratinozyten, Adipozyten und neuronalen Zellen sowie bei der Tumorentstehung im Hautgewebe und der Transformation von Fibroblasten untersucht.

Die Verknüpfung von Differenzierung und Tumorpromotion durch PKC wurde ausführlich an Keratinozyten studiert. Keratinozyten in Kultur differenzieren nach Erhöhung der Ca²⁺-Konzentration im Medium. In diesem Vorgang, der mit einem erhöhten Spiegel an DAG einher geht, ist auch PKC involviert (Isseroff et al., 1989; Denning et al., 1995).

Die Keratinozytendifferenzierung lässt sich durch Gabe von TPA wesentlich beschleunigen, was in Kombination mit weiteren Untersuchungen zu einem Modell der Phorbolster-vermittelten Tumorpromotion führte. Bei der Tumorentstehung kommt es durch Mutagenese zum Auftreten von Zellen, die nicht mehr differenzieren können.

Die Gabe von TPA induziert in diesem System nur die terminale Differenzierung normaler Zellen, was bei diesen schließlich zum apoptotischen Absterben führt (Whitfield, 1992).

Dadurch wird Platz frei für die Expansion der in diesem Stadium kontakthemmten, mutagenisierten Zellen. In der Folge kommt es zur vollständigen malignen

Transformation, weil im Laufe des raschen Wachstums des entarteten Zellklons, stochastisch weitere Mutationen akkumulieren.

Dass PKC-Isoenzyme an der Karzinogenese beteiligt sind, zeigt auch die erhöhte Aktivität PKC vermittelter Signalwege in Tumoren gegenüber normalen Gewebe (Rotenberg and Weinstein, 1991).

Durch Untersuchung an Fibroblasten wurden weitere Erkenntnisse in diesem Zusammenhang gewonnen. So führte die Überexpression von PKC δ , eine der Hauptisoformen in Säugerzellen, in NIH 3T3 Mäusefibroblasten zu einer Verminderung des Zellwachstums. Die Zellen wuchsen außerdem zu geringen Zelldichten heran und zeigten dramatische morphologische Veränderungen. Die Überexpression von PKC ϵ dagegen resultierte in gesteigertem Zellwachstum bei erhöhter Zelldichte. Außerdem waren diese Fibroblasten in der Lage, im Weichagar zu wachsen und zur Entstehung von subkutanen Tumoren in Nacktmäusen zu führen; beides klassische Parameter onkogener Transformation (Mischak et al., 1993b).

Die Tatsache, dass die Überexpression von PKC δ nicht zur Transformation führt, zeigt aber nicht, dass diese Isoform nicht in der Tumorentstehung in anderen Systemen involviert sein kann. Für diese Vermutung sprechen die Ergebnisse von Experimenten an Mäusefibroblasten, die durch Transfektion mit dem *Sis*-Onkogen transformiert wurden. Der Wachstumsfaktor PDGF-B ist hochgradig homolog zu dem *v-sis* Onkogen, und PKC δ wird durch PDGF stimuliert (Li et al., 1994b). Vor diesem Hintergrund führte die Überexpression von einer dominant-negativen Mutante von PKC δ in den Zellen dazu, dass keine Transformation durch das *Sis*-Onkogen mehr beobachtet werden konnte (Li et al., 1996b). Das weist auf eine Beteiligung an der *Sis*-abhängigen Signaltransduktion hin und ist gleichzeitig ein Beispiel dafür, wie virale Proteine die zelluläre Signalmaschinerie benutzen.

Für die PKC-Isoformen δ und ϵ wurde in ruhenden 3Y1 Rattenfibroblasten eine Aktivierung während mitogener Stimulierung nachgewiesen, was auf eine besondere Rolle der nPKC bei der Zellteilung hinweist (Ohno et al., 1994). Diese Hypothese wird durch die Tatsache unterstützt, dass PKC η die Expression Zellzyklus relevanter Faktoren, wie Cyclin E und Inhibitoren cyclinabhängiger Kinasen erhöht (Livneh et al., 1996). Neuere Experimente in Cos-7 Zellen mit dominant-negativen Mutanten aller PKC-Isoformen zeigten, dass sowohl konventionelle als auch neuartige und atypische PKCs die ERK/MAPK-Signalkaskade aktivieren (Schonwasser et al.,

1998). Dies ist der Hauptsignalweg, über den die Signalweiterleitung von Mitogenen und anderen extrazellulären Stimuli in der Zelle erfolgt.

Die Rolle von PKC in der myeloiden Differenzierung wurde vor allem an HL-60 und 32D-Zellen untersucht. HL-60 ist eine von einer Promyelozytenleukämie etablierte humane Zell-Linie, die durch Phorbolster oder andere PKC-Aktivatoren analog den Keratinozyten terminal differenziert werden kann (Castagna et al., 1982; Tonetti et al., 1994). Dabei ist die Differenzierung zumindest für einige Stunden von der andauernden Aktivierung von PKC abhängig. Danach läuft sie auch ohne weitere PKC-Aktivität fort, was durch Studien mit Inhibitoren gezeigt wurde, und endet letztlich in der Apoptose der Zellen (Aihara et al., 1991).

Die Zellen scheinen durch PKC-Aktivierung über einen "point of no return" getrieben zu werden. Hierbei handelt es sich nicht um einen artifiziellen Prozess, denn auch durch Stimulierung mit physiologischen Aktivatoren myeloider Differenzierung wie GCSF (granulocyte colony stimulating factor) werden PKCs aktiviert (Deshpande et al., 1997). Besonders PKC β scheint in diesem System für das Anschalten der MEKK1—SEK1—SAPK Kaskade, die in der weiteren Signaltransduktion von Bedeutung ist, verantwortlich zu sein (Kaneki et al., 1999).

In hämatopoetischen Zellen der Maus werden PKC-Isoformen differentiell expremiert (Mischak et al., 1991b; Mischak et al., 1991a). Während die Isoformen α und β kaum zu detektieren sind, ist das Vorkommen der δ -Isoform vergleichsweise stark, ubiquitär und durch Wachstumsfaktoren reguliert (Bassini et al., 1999). Überexpressionstudien wurden von Mischak und Mitarbeitern (Mischak et al., 1993a) an prämyeloide Mäusezellen (32D-Zellen) durchgeführt. Die Experimente zeigten, dass die durch Phorbolster hervorgerufene Differenzierung zu Makrophagen nur von den PKC-Isoenzymen α und δ vermittelt wird, während PKC β , ϵ , η und ζ in dieser Hinsicht keine Effekte hatten.

Im folgenden soll eine kurze Einführung über die Organisation des Zytoskeletts, wie sie für das Verständniss dieser Arbeit notwendig sind, gegeben werden, um dann im Detail auf die Rolle von PKC im Rahmen der Reorganisation des Zytoskeletts und der Migration einzugehen.

1.2 Rho-GTPasen und das Zytoskelett

Die lebende Zelle hat ein dynamisches Aktin-Zytoskelett. Um Prozesse wie Migration, Adhesion und Zellteilung zu gewährleisten, benötigt die Zelle ein hoch koordiniertes System, das die Polymerisation und Depolymerisation von Aktinfilamenten reguliert. Die Proteine der Rho (Ras-Homology)-Familie -Rho, Rac und Cdc42- spielen eine zentrale Rolle bei der dynamischen Regulation des Zytoskeletts. Sie werden als "kleine" G-Proteine bezeichnet, weil es sich hierbei, im Gegensatz zu den heterotrimeren G-Proteinen, um monomere GTPasen von ca 21KDa handelt.

1.2.1 Regulation und Funktion

Wie Ras bewegen sich diese Proteine zwischen einem GTP-gebundenen aktiven, und einem GDP-gebundenen inaktiven Status. Die Aktivierung der GTPasen erfolgt über den Austausch von GDP gegen GTP. Dieser Prozess wird durch die Aktivität so genannter "Guanine-nucleotid exchange factors" (GEF's) gewährleistet. Die Inaktivierung wird über GTPase-aktivierende Proteine (GAP's) gesteuert. Sie stimulieren die intrinsische GTPase-Aktivität der kleinen G-Proteine.

Darüber hinaus stabilisieren s.g. "Rho guanine nucleotide dissoziation inhibitors" (Rho-GDI's) die GDP-gebundene Form und halten so die GTPase in einem inaktiven Zustand (Bar-Sagi and Hall, 2000; Mackay and Hall, 1998; Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997) (siehe Abbildung 1.2).

Die Aktivierung der GTPasen geht mit einer Konformationsänderung im Protein einher und ermöglicht so die Bindung und damit Aktivierung von s.g. Effektor-Proteinen. Über diesen Vorgang werden zahlreiche zelluläre Prozesse, wie die Reorganisation des Zytoskeletts aber auch Änderungen in der Gentranskription gesteuert (Aspenstrom, 1999; Bar-Sagi and Hall, 2000; Mackay and Hall, 1998; Van Aelst and D'Souza-Schorey, 1997).

Anhand von unterschiedlichen experimentellen Bedingungen konnte gezeigt werden, dass Rho-Proteine für die Organisation des Zytoskeletts in allen eukaryotischen Zellen verantwortlich sind. Dabei wird die Aktivität von Rho für die Bündelung von Aktinfilamenten zu s.g. Stressfasern und die Anhäufung von Integrinen und assoziierenden Proteinen zu focalen Adhensionen verantwortlich gemacht. Rac hingegen fördert die *de novo* Aktin Polymerisation in der Peripherie der Zelle und

trägt so zur Bildung von Lamellipodien (handförmige Ausläufer der Zelle) und damit "ruffles" (Lamellipodien, die nach ausbleibender Anheftung am Substrat dorsalwärts auf den Zellkörper zurückfallen) bei. Die Aktivität von Cdc42 wiederum ist für die Ausbildung von fingerförmigen Auswüchsen s.g. Filopodien oder "microspikes" verantwortlich (Nobes and Hall, 1995; Kozma et al., 1995). Die Aktin-Filamente in Lamellipodien und Filopodien werden, wie die Stressfasern, in Assoziation mit Integrin-haltigen Adhesions-Komplexen gefunden (Small et al., 1996). Diese Komplexe zeigen die gleiche Komposition von Proteinen (z.B. Integrin, Vinculin, Paxillin usw.) sind aber im Unterschied zu den Rho-abhängig gebildeten focalen Adhensionen viel kleiner, sehr motil und weisen zudem eine veränderte Morphologie auf. Sie werden deshalb als fokale Kontakte bezeichnet (Nobes and Hall, 1995).

Für den Migrationsprozess aber auch bei der Adhesion ist die koordinierte Abfolge der Aktivität von Cdc42, Rac und Rho notwendig. So läßt sich auch anhand zahlreicher Beispiele aufzeigen, dass sich diese GTPasen direkt oder indirekt in ihrer Aktivität beeinflussen. Z.B. konnte gezeigt werden, dass Cdc42 Rac aktivieren kann ((Ridley et al., 1992; Nobes and Hall, 1995) und eigene Beobachtungen), weshalb die Bildung von Filopodien häufig im Zusammenhang mit der Ausbildung von Lamellipodien beobachtet werden kann. Ein Beweis für die direkte Aktivierung von Rac durch Cdc42 fehlt bisher, so dass angenommen wird, dass diese Aktivierung wahrscheinlich über eine Cdc42-vermittelte PAK-Aktivierung stattfindet. PAK wiederum bindet und aktiviert den Rac spezifischen GEF PIX (PAK-interacting exchange factor), was mit einer Aktivierung von Rac einher geht (Obermeier et al., 1998).

Des weiteren wurde berichtet, dass Rac Rho inhibieren oder aktivieren kann ((Ridley et al., 1992; Nobes and Hall, 1995) und eigene Beobachtungen) . Der biochemische Mechanismus der dem zu Grunde liegt ist aber bislang nicht aufgeklärt.

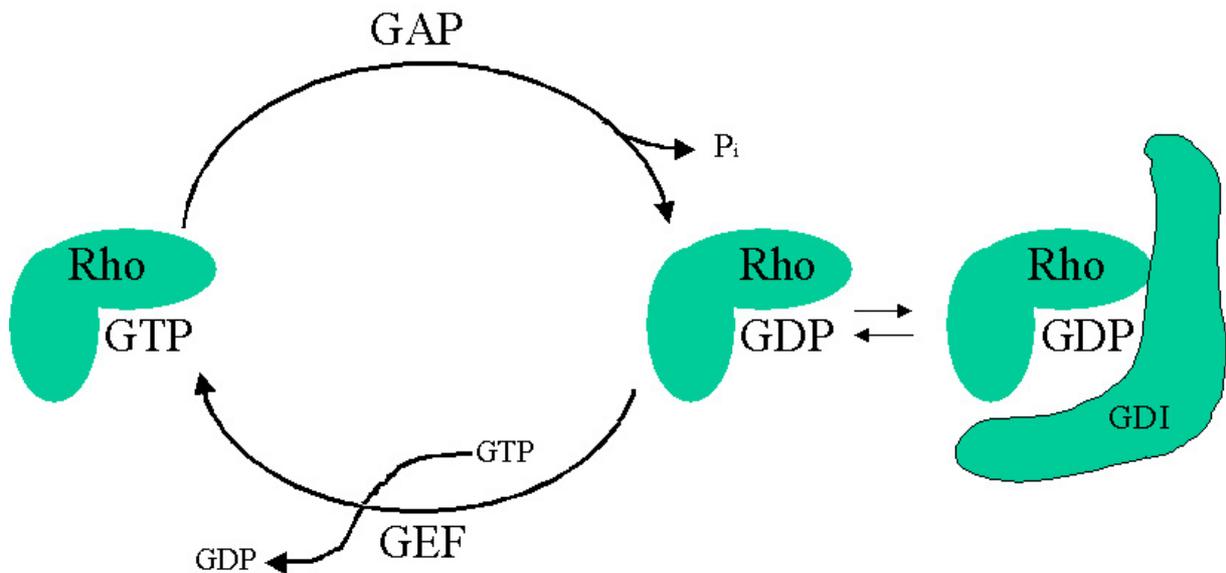


Abbildung 1.2 Schematische Repräsentation der Regulation der kleinen G-Proteine

1.2.2 Effektoren für Rho

Die GTP-Beladung führt zu einer Konformationsänderung im Protein und befähigt die GTPase nun an sog. Effektorproteine zu binden. Über diese Effektorproteine wird die Aktivität der GTPasen in eine zelluläre Antwort umgewandelt (siehe Übersichtsartikel von (Aspenstrom, 1999).

Unterhalb von Rho wird beispielsweise p160ROCK (Rho-activated kinase) angesteuert. Diese Serin/Threonin-Kinase wird durch die Rho-Bindung aktiviert. Wie die Aktivierung von ROCK allerdings mit der Ausbildung von Stressfasern in Zusammenhang zu bringen sein soll, ist der Zeit noch nicht vollständig geklärt. Als Substrate dieser Kinase wurden bisher 3 Proteine sicher identifiziert: "Myosine light chain" (Amano et al., 1996) und eine Untereinheit der "Myosine light chain phosphatase" (Kimura et al., 1996). Es wurde deshalb vermutet, dass die Phosphorylierung dieser beiden Substrate mit einer verstärkten Phosphorylierung der leichten Myosin-Kette, der Bildung von Myosin-Filamenten und F-Aktin-Bündelung einhergeht. Ein weiteres wichtiges Substrat stellt die Serin/Threonin-Kinase Lim-Kinase-1/2 dar (Ohashi et al., 2000; Sumi et al., 2001). Diese Kinase wird positiv

durch die ROCK-abhängige Phosphorylierung reguliert und phosphoryliert wiederum ADF-Cofilin, ein Aktin-Filament depolymerisierendes Protein. Die Aktin-Depolymerisierende Aktivität von ADF-Cofilin wird durch Lim-Kinase1/2 -abhängige Phosphorylierung inhibiert.

Damit kann ein Modell postuliert werden, in dem Rho über ROCK und ADF-Cofilin die Bildung von Stressfasern begünstigt (siehe Abbildung 1.3.).

Ein weiterer Effektor von Rho ist das p140mDia (Watanabe et al., 1997; Nakano et al., 1999; Watanabe et al., 1999). p140mDia ist das Säugetierhomolog von Diaphanous aus *Drosophila*, wo es für die Ausbildung einer zellulären Polarität verantwortlich zu sein scheint. Im Kontext der Säugetierzelle ist über die Funktion bisher sehr wenig bekannt. Es scheint als eine Art Gerüst (scaffold)-gebendes Protein die Aktivität von Profilin (Watanabe et al., 1997), einem Aktin-Filament polymerisierenden Protein, zu modulieren. Dieser Mechanismus ist aber noch wenig erforscht und soll hier nicht weiter behandelt werden. Die wichtige Funktion als Rho-Effektor wird aber durch die Tatsache verdeutlicht, dass sich die Inhibition von ROCK über Y-27632 morphologisch und auch in Hinblick auf Signaltransduktionsprozesse anders äußert als eine Inhibition von Rho (Tsuji et al., 2002; Rivelino et al., 2001). Ferner konnte anhand von vorläufigen Experimenten gezeigt werden, dass die Überexpression eines konstitutiv-aktiven mDia-Konstrukt, die TPA-induzierte Reorganisation des Zytoskeletts inhibiert (persönliche Kommunikation mit M. Gimona). Auch hierbei ist der Mechanismus bisher noch völlig ungeklärt, weshalb die Frage danach, welche Proteine unterhalb von mDia angesteuert werden, das Ziel zukünftiger Studien sein muß.

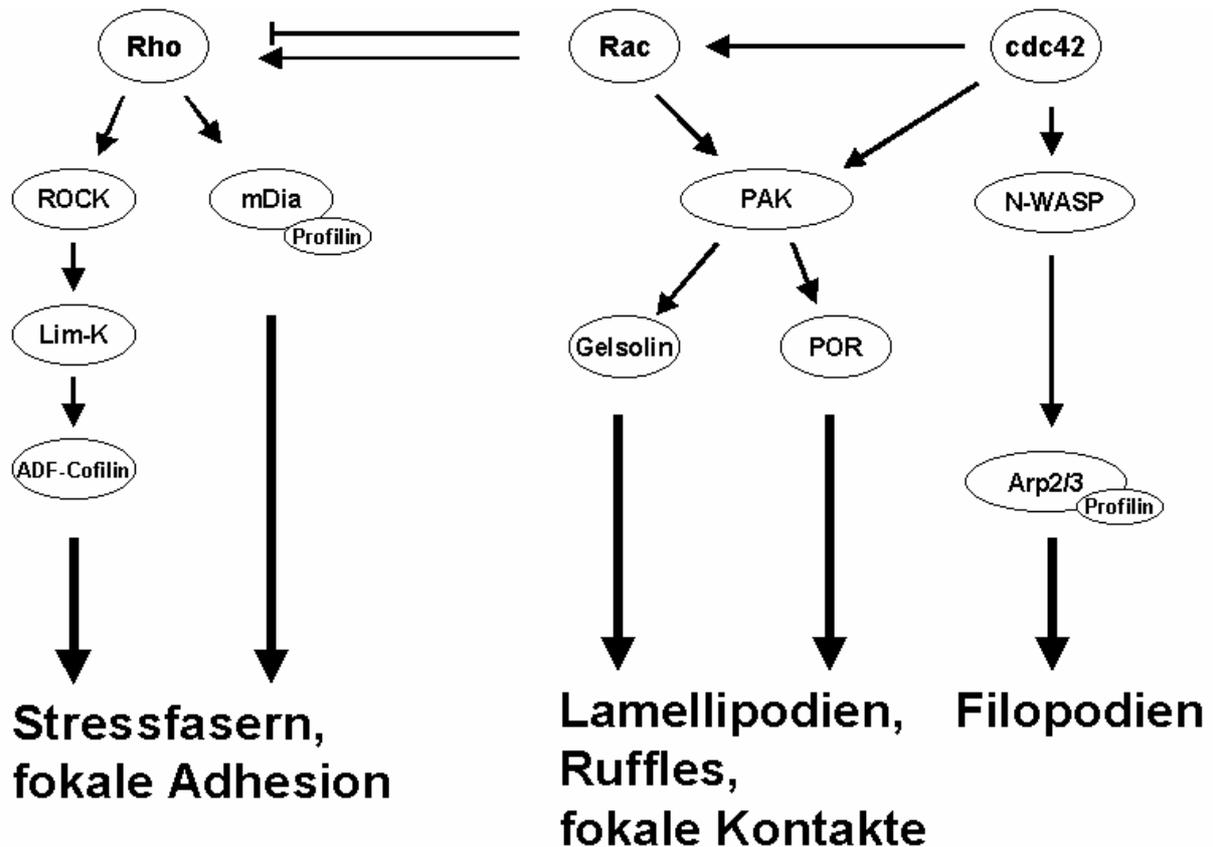


Abbildung 1.3. Schematische Repräsentation der Signaltransduktionskaskade, die von Rho, Rac und Cdc42 gesteuert wird (Erläuterung im Text).

1.2.3 Effektoren für Rac und Cdc42

Der prominentesten Effektoren für Rac und Cdc42 sind die Proteine der PAK (p21-activated kinase) –Familie (Bagrodia et al., 1995; Brown et al., 1996; Knaus et al., 1995; Manser et al., 1995; Martin et al., 1995). Rac und Cdc42 binden eine hoch konservierte Region innerhalb von PAK, die s.g. CRIP (Cdc42/Rac interacting binding)-Domäne und aktivieren so diese Serin/Threonin-Kinase. Die Funktion von PAK innerhalb der Zelle ist äußerst vielfältig. Neben der Beteiligung an der Rac- und Cdc42-abhängigen Aktin Reorganisation wird die Funktion dieser Kinase im Zusammenhang mit Apoptose, JNK-Aktivierung und Transformation diskutiert (siehe Übersichtsartikel von (Aspenstrom, 1999) und (Coso et al., 1996; Coso et al., 1995; Minden et al., 1995; Seger and Krebs, 1995).

Welches Substrat unterhalb von PAK im Zuge der Aktin-Reorganisation angesteuert wird, ist bislang noch unklar.

Ein putatives Substrat ist ebenfalls das ROCK-Substrat Lim-Kinase 1 (Dan et al., 2001) (siehe oben). Ein weiteres PAK-Substrat, das innerhalb der Literatur diskutiert wird, ist POR1 (Van Aelst et al., 1996; D'Souza-Schorey et al., 1997). Die Funktion von POR1 (Partner of Rac) wird vor allem im Zusammenhang mit der Bereitstellung neuer Membranbestandteile, wie sie für die Bildung von Lamellipodien benötigt wird, diskutiert. Inwieweit POR1 aber ein direktes oder indirektes PAK-Substrat ist, oder seine Aktivität über einen PAK unabhängigen Mechanismus reguliert wird, konnte bislang nicht gezeigt werden.

Das gleiche wie für POR1 gilt für Gelsolin. Gelsolin bindet die Enden von Aktinfilamenten und verhindert so die Polymerisierung (Azuma et al., 1998; Kwiatkowski, 1999; Arcaro, 1998). Nach Aktivierung von Rac/PAK dissoziiert Gelsolin von den Aktin-Filamenten ab und gibt so den Weg für das Wachsen von Aktin-Filamenten frei.

Für diese beiden Proteine wurde anhand von Experimenten, in denen gezeigt werden konnte, dass die Überexpression zu einem Rac-ähnlichen Phänotyp führt, bzw. dass die Überexpression von mutierten Varianten, die Ausbildung eines Rac-Phänotyps stört, auf eine Funktion in der Rac- und PAK abhängigen Signaltransduktion geschlossen (Referenzen siehe oben). Eine genaue Zuordnung ihrer Funktion und Hierarchie innerhalb der Rac-abhängigen Signaltransduktion muß daher das Ziel zukünftiger Studien sein.

Im Fall von Cdc42 ist die Situation etwas klarer. Neben PAK existiert vor allem ein prominenter Effektor, WASP (Wiskott Aldrich Syndrom Protein) bzw. das ubiquitär exprimierte Homolog N-WASP (Symons et al., 1996), welches unterhalb von Cdc42 angesteuert wird. N-WASP bindet und rekrutiert nach Aktivierung durch Cdc42 Profilin und darüber den Arp2/3-Komplex (Machesky and Gould, 1999; Rohatgi et al., 1999). Profilin ist wie oben bereits erwähnt ein Aktin-Filament polymerisierendes Protein, welches im Zusammenhang mit dem Arp2/3 Komplex für die Ausbildung von Filopodien verantwortlich ist. Damit kann die Aktivität von Cdc42 direkt mit dynamischen Modulation des Zytoskeletts in Verbindung gebracht werden.

Cdc 42 ist darüber hinaus, über einen bisher ungeklärten Mechanismus, für die Ausrichtung des Golgi-Apparates verantwortlich, was notwendig für die gerichtete Migration ist (Nobes and Hall, 1999). Dem Golgi-Apparat wird im Rahmen des

Migrationsgeschehens vor allem eine Rolle beim Recycling von Membranbestandteilen aber auch Oberflächenproteine wie z.B. Rezeptoren zugesprochen (Musch et al., 2001).

1.3 PKC und das Zytoskelett

PKC-Isoenzyme nehmen eine zentrale Rolle in Signaltransduktionsprozessen zur Steuerung von Zell-Proliferation, Differenzierung und Apoptose ein. Darüber hinaus wird ihnen eine Rolle bei der dynamischen Modulation des Aktin-Zytoskeletts und damit eine entscheidene Bedeutung für die Migration zugeschrieben (siehe Übersichtsartikel von Keenan et al.(Keenan and Kelleher, 1998)).

Anhand von zahlreichen Studien mit unterschiedlichen Zelltypen und chemoattraktiven Substanzen, konnte belegt werden, dass die Aktivität von PKC-Isoenzymen essentiell für die Migration ist (Ikeo et al., 2001; Wang et al., 2000; Rabinovitz et al., 1999; Sliva et al., 2002; Podar et al., 2002; Ng et al., 1999; Ng et al., 2001; Harrington et al., 1997; Li et al., 2002; Derman et al., 1997; Zimmermann et al., 1988).

Durch die stabile oder transiente Überexpression von PKC-Isoenzymen sowie deren Kinase-inaktive oder Konstitutiv-aktiven Varianten konnte der Effekt von PKC auf die Migration an der Aktivität spezieller Isoenzymen festgemacht werden.

Harrington et al. (1997) konnte z.B. zeigen, dass die reine Überexpression von PKC α in Endothel-Zellen die induzierte und basale Migration beschleunigt. Einen ähnlich positiven Effekt von PKC α wurde in MCF-7 Zellen und einer humanen „multiple myeloma“ Zellen nachgewiesen (Podar et al., 2002; Ng et al., 2001). Hier wurde die Aktivität von PKC α direkt mit der dynamischen Exposition und Internalisierung von β 1-Integrinen im Zuge des Migrationsgeschehens in Zusammenhang gestellt.

Die differentielle Hemmung der PKC-Aktivität durch Überexpression verschiedener Kinase-inaktiver PKC-Isoenzymen wirkt sich dagegen negativ auf die Migration aus. In humane Keratinozyten konnten Li und Kollegen (Li et al., 2002) z.B. anhand der stabilen Überexpression eines Kinase-inaktiven Konstrukts zeigen, dass PKC δ essentiell für die Migration dieser Zellen ist.

Zudem konnte in drei unabhängigen Studien gezeigt werden, dass den atypischen PKC-Isoformen eine wichtige Rolle bei der Polarität der Zelle im Rahmen der Migration zukommt (Imamura et al., 1998; Laudanna et al., 1998; Legg et al., 2002). Neben diesen Befunden lassen sich auch Beispiele aufzeigen, in denen PKC Aktivität einen hemmenden Einfluss auf die Motilität von Zellen ausübt. So konnte gezeigt werden, dass bei lymphoiden Zellen die Hemmung von PKC eine Zunahme der Motilität zur Folge hat (Thorp et al., 1996; Southern et al., 1995). Solche Unterschiede zwischen Zelltypen bzw. Isoenzymen sind wahrscheinlich als Folge der Zelltyp-spezifischen Funktion von PKCs anzusehen.

Die molekularen Mechanismen über die PKC-Isoenzymen die Migration beeinflussen konnten bisher im Detail nicht entschlüsselt werden.

Ein wichtiger Aspekt für die Migration von Zellen, besteht in der dynamischen Modulation des Aktin-Zytoskeletts. Dieser Prozess wird über Aktin-bindende Proteine reguliert, die die gerichtete Polymerisation und Depolymerisation von Aktinfilamenten gewährleisten. In der Modulation der Aktivität von solchen Zielmolekülen wurde die Funktion von PKC-Isoenzymen im Rahmen des Migrationsgeschehens vermutet.

So wurde beispielsweise von einigen Forschergruppen eine Kollokalisierung von PKC-Isoenzymen mit Bestandteilen des Zytoskeletts beobachtet ((Goodnight et al., 1995; Jaken et al., 1989; Haller et al., 1998) und eigene Beobachtungen). Daneben konnten verschiedene Aktin-bindenden sowie Aktin-modulierenden Proteinen wie MARCKs (Uberall et al., 1997), SSeCKS (Lin et al., 1996), Fascin (Adams et al., 1999), Vinculin (Werth et al., 1983), Talin (Litchfield and Ball, 1986), Ezrin (Ng et al., 2001) und Moesin (Pietromonaco et al., 1998) als PKC-Substrate *in vivo* und *in vitro* beschreiben werden.

Ferner konnte auch die dynamische Modulation des Zytoskeletts an der Aktivität von PKC-Isoenzymen festgemacht werden. So konnte z.B. gezeigt werden, dass die Überexpression eines Kinase-inaktiven PKC θ -Konstrukts in rat capillary endothel cells (RCE) die Ausbildung von Stressfasern und Filopodien verhindert (Tang et al., 1997). In der murinen pre-B Zell-Linie Baf-3 konnte gezeigt werden, dass die Überexpression eines Kinase-inaktiven PKC δ -Konstrukts die IL-3 induzierte Ruffle-Bildung unterhalb von Rac inhibiert (Romanova et al., 1999). Anhand von Versuchen mit Isoenzym-spezifischen Ribozymen konnte in Megakaryozyten gezeigt werden,

dass PKC α für die Reorganisation des Zytoskeletts und damit der Differenzierung zu Blut-Plättchen, verantwortlich ist (Rojnuckarin and Kaushansky, 2001). Ferner konnte in zwei unabhängigen Studien durch die Expression von Konstitutiv-aktiven und Kinase-inaktiven Konstrukten aufgezeigt werden, dass die Ras-induzierte Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts über die Aktivierung der atypischen PKC-Isoenzymen gesteuert wird (Uberall et al., 1999; Coghlan et al., 2000).

Die Mechanismen jedoch, wie PKC-Isoenzyme die Aktin-Dynamik modulieren können, wurden in all diesen Arbeiten im Detail nicht entschlüsselt.

Der wohl prominenteste TPA-Effekt auf die Organisation des Zytoskeletts besteht in der Desintegration von Aktin-Stressfasern und der Bildung von Ruffles in der Peripherie der Zelle. Dieser Effekt konnte anhand einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen beobachtet werden (Lin et al., 1996; Roger et al., 1989; Vouret-Craviari et al., 1998; Arber et al., 1998; Kam and Exton, 2001; Imamura et al., 1998). Der Mechanismus nach dem dieser Prozess abläuft, blieb bisher unberücksichtigt.

Dieses Phänomen, und vor allem der Signaltransduktions-Mechanismus, der für die PKC-vermittelte Reorganisation des Zytoskeletts verantwortlich ist, war die Grundlage dieser Promotionsarbeit.

1.4 Zielsetzung

Ziel der Arbeit war es, die Funktion von PKC im Rahmen der Aktin-Reorganisation zu analysieren. Viele adherente Zellen sind im ruhenden Zustand von einem dichten Netzwerk aus Aktin-Stressfasern (bezeichnet eine massive Bündelung von Aktin-Filamenten) durchzogen. Diese müssen für die Ausbildung von motilen Strukturen aufgelöst bzw. umorganisiert werden. Dieses Phänomen, die Auflösung der Aktin Stressfasern und Reorganisation des Zytoskeletts, wurde in zahlreichen Publikationen nach TPA-Behandlung von Zellen beschrieben. Die Signaltransduktion jedoch, die zu dieser Reorganisation führt, aber auch die Frage inwieweit PKC selbst und nicht andere Phorbolster-responsive Proteine wie z.B. RasGRF (Ebinu et al., 1998) oder β -Chimerin (Caloca et al., 2001), für diesen Effekt verantwortlich sind, wurde bis dato nicht entschlüsselt.

In der hier vorgelegten Arbeit wurde ein Modell erarbeitet, das die Signaltransduktionskaskade von PKC bis hin zur Reorganisation des Zytoskeletts

beschreibt. Dieses Modell wurde nachfolgend dann in einem komplexeren Zusammenhang, der Migration von Zellen, diskutiert.

Material und Methoden

2. 1 Reagenzien/Materialien

Reagenzien wurden von den folgenden Firmen bezogen:

Amersham:

GSSH-Sepharose, Protein-G-Sepharose, PVDF- und Nitrocellulose-Membranen, [γ - ^{32}P]-ATP (6000 Ci/mmol)

Gibco BRL:

Dulbeccos Medium w/o Phenol Red (1000mg/l Glucose),
Glutamin (200mM), Trypsin/EDTA, Penicillin/Streptomyzine, LB Broth Base, LB Agar

Nunc-GmbH, Wiesbaden:

Zellkulturflaschen, Kryoröhrchen, Chamber-slides

Seromed Biochrom (Berlin):

Fötale Kälber Serum (FCS)

Calbiochem:

Tetra Decanoyl Phorbol-13-Acetate (TPA), Bisindolylmaleimide und PP2

Molekular Probes:

Alexa 488- und Alexa 468- konjugiertes Phalloidine

New England Biolabs (NEB):

Restriktionsendonucleasen

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Sigma bezogen

2.1.1 Antikörper

Transduktion Laboratories:

Rho1, Rac1, Cdc42 und p190

Calbiochem:

Src (Ab-1)

New England Biolabs (NEB):

Phosphor-Tyrosin spezifischer Antikörper (pTyr-100)

Phosphor-ERK

Phosphor-(Tyr416)Src

Biosource

Phosphor-(Tyr416)Src

Dianova GmbH, Hamburg:

Peroxidase gekoppelte sekundäre Antikörper gegen Maus, Ratte und Kaninchen.

Cy2 gekoppelte sekundäre Antikörper gegen Maus.

Upstate Biotechnologies:

Phospho-Tyrosin spezifischer Antikörper (4G10)

Roche:

HA-spezifischer Antikörper

Der polyklonale Antikörper gegen PTP α wurde mir von Joeren den Hertog (Hubrecht Laboratories, Utrecht, Netherlands) zur Verfügung gestellt. Der monoklonale Src-spezifische Antikörper (2-17) wurde mir von Suzanne Simon (Salk Institute, La Jolla, CA) zur Verfügung gestellt.

2.1.2 Kits

Amersham (Braunschweig): ECL-Detection-Kit
Qiagen (Hilden): High Speed Plasmid Mini- und Midi-Kit

2.1.3 Standardlösungen und – puffer

PBS: 140mM NaCl₂
30mM KCl
6,5mM Na₂HPO₄
1,5mM KH₂PO₄

TBS: 20mM Tris-HCl pH7,5
50mM NaCl₂

TBE: 10mM Tris-HCl pH 8,0
20mM Borsäure
20mM EDTA pH 8,0

2.1.4 Biologisches Material

Bakterienstämme

E.coli DH5 α

Eukaryotische Zell-Linien

A/r5 glatte Muskelzellen aus der Rattenaorta (VSMC)
Sf-9 Insektenzellen

2.2 Methoden

Alle Standard-Methoden, die hier nicht im einzelnen beschrieben wurden, wurden nach Protokollen aus Sambrook et al. (Molecular Cloning, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press) durchgeführt.

2.2.1 Mikrobiologische Techniken

Kultivierung von Bakterien

E. coli wurde in LB-Medium mit Antibiotika, je nach Resistenz (je 50 µg/ml) über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert.

LB-Medium: 1% Bacto Trypton (w/v)
 1% Hefeextrakt (w/v)
 0,5% NaCl₂ (w/v)

Zur Aufzucht von Kolonien wurden LB-Agarplatten (1,5% w/v) über Nacht bei 37°C inkubiert.

Transformation von Bakterien

Transformationskompetente DH5α-Bakterien wurden auf Eis aufgetaut, die Plasmid-DNA (0,1-1 µg) hinzupipettiert und für 5-10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Suspension für 1 min bei 42°C inkubiert und sofort danach für 2 min auf Eis abgekühlt. Die Bakteriensuspension wurde dann auf LB-Agar Platten mit dem erforderlichen Antibiotikum ausgetrichen und inkubiert wie oben beschrieben.

2.2.2 Eukaryotische Zellkultur

Kultivierung von Insektenzellen

Sf-9 Zellen wurden in Grace's insect medium in Rollflaschen im Inkubator bei 27°C angezogen und regelmäßig bei einer Dichte von $1,2 \times 10^6$ Zellen/ml 1:5 gespalten. Die Infektion mit Bakuloviren erfolgte mit einer m.o.i. von 2-3 durch einstündige Vorinkubation von Virus und Sf-9 Zellen bei hoher Dichte. Anschließend wurden die Zellen in Zellkulturschalen (14,5 cm Durchmesser) ausgesät und für 3 Tage inkubiert, bevor sie nach optischer Kontrolle des Infektionserfolges (stark gerundete, vergrößerte Zellen) abzentrifugiert und aufgeschossen wurden.

Die Titerbestimmung wurde wie folgt durchgeführt: 1ml des Viren-haltigen Überstandes wird in einer auf $0,75 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellten Spinnerflasche bis zum vollständigen Absterben der Zellen kultiviert. Der Überstand wird durch Zentrifugation bei 4300 rpm geklärt. Der Virustiter wird abgeschätzt durch eine serielle Verdünnung von dem Virushaltigen Überstand (0-300µl/je $0,75 \times 10^6$ Zellen in einem 6-well). Eine optimale Expression der jeweiligen Proteine wurde im Western-Blot überprüft.

Kultivierung und Transfektion von glatten Muskelzellen

Bei der Zell-Linie A7r5 handelt es sich um glatte Muskelzellen aus der Rattenaorta. Diese Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagles Medium (DMEM) ohne Phenolrot, mit 10% FCS und 2mM Glutamin (Medium komplett) bei 37°C und 5%CO₂ gehalten und alle 3 Tage 1:4 gespalten.

Für Transfektionen wurden die Zellen so ausgesät, dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 50-70% aufwiesen.

Expressionvektoren wurden mit DMEM ohne FCS und Superfect (Qiagen) nach dem Protokoll des Herstellers gemischt und für 20-30min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde mit Serum-haltigen („komplett“) Medium versehen und auf die Zellen gegeben. Nach 3-5h Inkubation bei 37°C und 5%CO₂ wurde der Transfektionsansatz gegen normales komplett Medium ausgetauscht. Je nach Erfordernis wurden die Zellen für 24-48h im Inkubator gehalten und dann weiter verarbeitet.

Kryokonservierung

Zur langfristigen Lagerung wurden eukaryotische Zellen nach dem Passagieren bzw. nach dem Abzentrifugieren in DMSO-haltigem Einfriermedium aufgenommen, in speziellen Einfriegefäßen („Kryotubes“, NUNC) möglichst langsam (ca 1°C/min) abgekühlt und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Einfriermedium: 90 Vol% FCS
 10 Vol% DMSO

Zur erneuten Kultivierung wurden die Zellen im 37°C Wasserbad aufgetaut, mit einem großen Überschuss Medium gewaschen und in geeignet Zellkulturgefäße ausgesäht.

2.2.3 Molekularbiologische Techniken

Plasmidpräparation

DNA-Präparationen wurden ausnahmslos mit Kits der Firma Qiagen nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch über die Absorbtion bei 260nm im Spektralphotometer gegen ddH₂O bestimmt.

Dabei galt folgender Umrechnungsfaktor:

DNA: $c = A_{260} \times 50 \mu\text{g/ml}$

Analytische Agarosegelelektrophorese

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe erfolgte in 0,8-1,5%igen TBE/Agarosegelen, welche 1µg/ml Ethidiumbromid enthielten. Als Größenstandard wurde die 1kB-Leiter von Stratagene verwendet. Vor dem Auftrag wurden die Proben mit dem entsprechenden Volumen Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 1V/cm². Die Gele wurden im UV-Durchlicht betrachtet (256nm) und mit einer Kamera (POLAROID) photographiert.

10x Probenpuffer	40% (w/v)	Glycerin
	0,25% (w/v)	Bromphenolblau
	0,25% (w/v)	Xylencyanol
	in TBS	

2.2.4 Biochemische Techniken

Aufreinigung von rekombinanten PKCs aus Sf-9 Zellen

PKC-Isoformen und c-Src wurden mit Hilfe des Baculovirus-System in Sf-9 Zellen als GST-Fusionsproteine überexprimiert. Die Zellen wurden 2-3 Tage (je nach Protein) nach erfolgter Infektion mit Bakuloviren 2x mit PBS gewaschen und dann in eiskaltem Lyse-Puffer resuspendiert.

Lyse-Puffer (Sf-9 Zellen)	TBS
	1% n-Octylglykosid
	10mM β -Glycerophosphat
	1mM NaF
	1mM EDTA
	1mM EGTA
	10 μ g/ml Leupeptin
	1mM Phenylmethylsulonyl Fluorid (PMSF)

Die Suspension wurde für 5-10min unter leichtem Schütteln bei 4°C gehalten. Nachfolgend wurden die unlöslichen Bestandteile durch eine 30min Zentrifugation bei 16.000rpm und 4°C abgetrennt und der Überstand mit einer entsprechenden Menge (300-500 μ l) GSSH-Sepharose beads, bei 4°C unter Schütteln für 2-4h inkubiert. Die GSSH-beads wurden nachfolgend 2x mit einem großen Überschuss an Lyse-Puffer und 2x mit dem Thrombinprotease-Puffer (TBS/ 0,1mM EDTA) gewaschen und anschließen mit Thrombin (2800U/mg 1U pro 10 μ g Fusionsprotein) bei 4°C für 2h inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von PMSF und Leupeptin gestoppt und die beads mehrfach in einem kleiner Volumen Thrombinprotease-Puffer (+Proteinase-Inhibitoren) gewaschen. Die Überstände wurden vereinigt, mit 5mM DTT versehen und mit Centricons (30 μ M) eingengt. Die Proteine wurden mit 50% Glycerin versehen und bei -20°C gelagert. Zur Mengenbestimmung wurde ein analytisches Comassie-Gel mit einem BSA-Standard angefertigt (siehe unten). Die Aktivität wurde gegenüber MBP in einem *in vitro* Kinase-assay bestimmt (siehe unten).

Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen aus E.coli

Zur Expression von rekombinanten Proteinen wurden frisch transformierte DH5 α -Bakterien über Nacht in LB-Medium bei 37°C angezogen, morgens 1:10 mit dem gleichen Medium verdünnt und nach 1,5 h mit 1mM IPTG induziert. Dauer der Induktion und Temperatur wurde je nach Erforderniss variiert.

Die Zellen wurden bei 6000rpm für 20min bei 4°C abzentrifugiert, in Lyse-Puffer resuspendiert (der Lyse-Puffer unterscheidet sich zu dem Lyse-Puffer für die Sf-9 Zellen nur durch den Austausch von Ocyglykosid gegen Triton X100) und soniziert (3x bei 50% Leistung für 5 Sekunden).

Unlösliche Bestandteile wurden wie oben beschrieben durch einen Zentrifugationsschritt abgetrennt und der Überstand mit einer entsprechenden Menge an GSSH-Sepharose beads bei 4°C unter Schütteln für 1-4h (teilweise auch über Nacht) inkubiert.

Die beads wurden 2x mit einem großen Überschuss an Lyse-Puffer gewaschen und nachfolgend durch 2 weitere Waschschritte in dem gewünschten Reaktionspuffer (z.B. Kinase-Puffer oder GTPase-assay-Puffer) äquilibriert.

Zur Mengenbestimmung wurde ein analytisches Coomassie-Gel mit einem BSA-Standard angefertigt (siehe unten).

In vitro Kinase-assay

Aufgereinigte rekombinante PKCs wurden in einem Reaktionsansatz von 50 μ l in Gegenwart von 10nM TPA, 5 μ g/ml Phosphatidylserin, 1 μ g MBP und 5 μ Ci in Kinase-Puffer bei 30°C unter Schütteln für 15min inkubiert.

Kinase-Puffer: 20mM Tris-HCl pH 7,5
 5mM MgCl₂
 1mM CaCl₂
 0,1% NP-40
 1mM DTT
 1mg/ml Leupeptin
 1mM β -Glycerophosphat
 1mM NaF
 1mM NaF

Die Reaktion wurde durch Zugabe von Laemmli-Probenpuffer (siehe unten) gestoppt, für 5min bei 95°C gekocht und über eine SDS-PAGE getrennt. Die Proben wurden auf einem SDS-Gel mit nachfolgender Autoradiographie analysiert.

Auf diese Weise wurde die Aktivität der einzelnen Präparationen aufeinander abgestimmt.

Für die nachfolgenden Kinase-assays wurden dann eine äquivalente Kinase-Aktivität (ca 5-30ng Enzym) nach dem oben beschriebenen Protokoll verwendet.

SDS Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine zu trennen oder immunologisch zu detektieren (Western-Blot), wurden die Proteinlösungen (Lysate, Kinasereaktionsansätze, Proteinpräparationen) auf SDS-Polyacrylamidgelen analysiert. Verwendet wurde hierzu die MightySmall-Aparaturen von Höfer. Die Acrylamidkonzentration wurde je nach erwarteter Größe der zu analysierenden Proteine zwischen 7 und 15% variiert. Die Gele wurden nach einem allgemein gültigen Protokoll hergestellt. Im Bedarfsfall wurden 4-20%ige „precast“ Gradienten-Gele der Firma Invitrogen verwendet.

Die Durchführung erfolgte in SDS-Laufpuffer bei 40mA pro Gel und maximal 250V. Die zu analysierende Probe wurde zuvor mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und aufgekocht (5min, 95°C)

Laemmli-Probenpuffer (5x):	250mM	Tris-HCl pH 6,8
	50%	Glycerin
	2,5%	SDS
	5mM	EDTA
	50mM	DTT

SDS-Laufpuffer (10x)	720g	Glycin
	150g	Tris
	50g	SDS
	mit H ₂ O auf 5l auffüllen	

Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Zur Anfärbung von Proteinen im Polyacrylamidgel wurden die die Gele in die Färbelösung überführt und für 30-60min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert.

Coomassie-Lösung: 30% Essigsäure
 10% Methanol
 0,04% Coomassie-Brilliant Blue

Anschließend wurde das überschüssige nicht Protein-gebundene Coomassie durch mehrmaliges Waschen in der selben Lösung ohne Coomassie-Blau entfernt.

Western-Blot

Auf einer SDS-PAGE analysierte Proteine wurden zur immunologischen Detektion mit spezifische Antikörpern auf PVDF- oder Nitrocellulose-Membranen in einer Höfer-Nassblot-Aperatur in Transferpuffer für 1h und 80V bei konstanter Spannung transferiert.

Transfer-Puffer: 9,5% Glycin
 3% Tris

Die Membranen wurden nachfolgend für 30-60min (bei Raumtemperatur) oder über Nacht (bei 4°C) in Blockierungslösung geschwenkt. Die Inkubation mit primärem Antikörper erfolgte mit einer geeigneten Verdünnung des Antikörpers (1:250-1:5000) in Blockierungslösung über Nacht bei 4°C unter Rollen. Im Anschluß wurde die Antikörperlösung entfernt und der Blot mindestens 3x für 5-10min mit TBS inkl. 0,1% Tween (TBST) gewaschen. Danach wurde der Blot im Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper in Blockierungslösung (1:20.000) für 2h bei Raumtemperatur inkubiert. Der Blot wurde erneut 3-5x für 5-10min mit TBST gewaschen und der gebundene Peroxidase-gekoppelte sekundäre Antikörper mit Hilfe des ECL-Kits auf

einem Röntgenfilm dargestellt (Expositionszeiten je nach Antikörper und Proteinmenge zwischen 2sec und 5min).

Blockierungslösung:	5% (w/v)	fettfreies Milchpulver
	0,1 %	Tween 20
		in TBS

Immunpräzipitation

Um ein bestimmtes Protein aus einem Zelllysat mittels eines spezifischen Antikörpers zu präzipitieren, wurden Zellen einer 80-90% konfluente 10cm Zellkulturschalen für die angegebenen Zeitpunkte mit TPA stimuliert, mit PBS gewaschen und in eiskaltem RIPA-Puffer (low-salt) auf Eis lysiert. Die Lysate wurden für 10min bei 13.000 rpm und 4°C geklärt und nachfolgend mit einem Gemisch aus G-Sepharose beads (30µl) und dem spezifischen Antikörper (1-5µg) für 2-4h (optional auch über Nacht) bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Präzipitat wurde nachfolgend 2x mit Lyse-Puffer gewaschen und je nach weiterer Vorgehensweise durch erneute Waschschriffe umgepuffert.

RIPA	50mM Tris-HCl pH 7,5
	150mM NaCl ₂ (für RIPA high salt wurden 500mM verwendet)
	10mM MgCl ₂
	1% Triton
	0,1% SDS
	0,5% DOC
	1mM EDTA
	1mM NaVO ₄
	1mg/ml Leupeptin
	1mM β-Glycerophosphat
	1mM NaF
	1mM PMSF

Src wurde nach der Immunpräzipitation mit Kinase-Puffer gewaschen und in einem Kinase-assay gegenüber 1µg Säure-denaturierter Enolase verwendet (Protokoll siehe oben). Für die Immunpräzipitation von PTP α wurden die Phosphatase-Inhibitoren weggelassen.

P190 wurde wegen der besseren Darstellung von Tyrosine-Phosphorylierung in mRIPA immunpräzipitiert.

mRIPA	50mM Tris-HCl
	150mM NaCl ₂
	10mM MgCl ₂
	1% NP40
	1mM EDTA
	1mM Na ₂ VO ₄
	1mg/ml Leupeptin
	1mM β-Glycerophosphat
	1mM NaF
	1mM NaF
	1mM PMSF

Immunologische Detektion von Src in fixierten Zellen

Die immunologische Detektion von Src wurde mit fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörpern durchgeführt. Hierzu wurden A7r5 Zellen auf Glass Deckgläschen gezogen. Die Zellen wurden mit den unterschiedlichen Src-Konstrukten transfiziert und 24h nach Transfektion mit TPA stimuliert. Die Zellen wurden 1x mit PBS gewaschen, für 20min mit 4% para Formaldehyd fixiert und für 1min mit 0,3% Triton X-100 permeabilisiert.

Der primäre Src-spezifische Antikörper 2-17 wurde 1:200 in PBS mit 10% „normal goat serum“ (NGS) verdünnt und für 2h bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben. Anschließend wurden die Zellen mehrfach mit PBS gewaschen und der sekundäre Cy2 gekoppelte Maus-spezifische Antikörper in einer Konzentration von 1:100 in PBS für 1h bei Raumtemperatur unter Ausschluß von Licht auf den Zellen belassen.

Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden auf einen Objektträger ein Tropfen 4% Moviol/n-Propyl-Galat (9:1) gegeben und die Deckgläschen in den Tropfen gelegt.

Für die Aktinfärbung wurde verfahren wie oben. Alexa 488- und Alexa 568-konjugiertes Phalloidine, wurde 1:300 in PBS verdünnt und für 1h bei Raumtemperatur auf den Zellen belassen.

Die Objektträger wurden unter Lichtausschluss bei 4°C gelagert.

Die Präparate wurden unter einem Zeiss Axioscope, ausgestattet mit einer Axiokamera, analysiert und mit der Software des Herstellers dokumentiert.

Konfokale Mikroskopie

A7r5 Zellen wurden mit Expressionsvektoren für EGFP- β -Aktin transfiziert, nach 48h für die angegebenen Zeitpunkte mit TPA stimuliert und unter einem Konfokalen Lasermikroskop analysiert. Die Aufnahmen wurden an einem Zeiss Axiovert 35MM Mikroskop, das mit einem BioRad MRC Argon Laser ausgestattet war, gewonnen. Die Bilder wurden mit Hilfe der „confocal assistant“ Software dargestellt.

Phosphatase-Assays

A7r5 Zellen wurden mit einem Expressionsvektor für HA-PTP α transfiziert, 48h später mit TPA behandelt und PTP α über den HA-Tag immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden 1x mit RIPA (low salt) und 2x mit dem Phosphatase-assay Puffer (PPase-assay Puffer) gewaschen und nachfolgend in 200 μ l Ppase-assay Puffer, der 10 μ M para Nitrophenolphosphat enthielt aufgenommen. Der Reaktionsansatz wurde für 30min bei 30°C unter Schütteln inkubiert, abzentrifugiert und der Überstand wurde nach Zugabe von 200 μ l 2M NaOH im Photometer analysiert. Die Absorbtion wurde bei 415nm bestimmt.

Die beads wurden in 50 μ l 2x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und die analysierte Menge an PTP α im Western-Blot bestimmt.

PPase-assay Puffer:	0,1M Succinic acid pH 6
	150mM NaCl ₂
	1mM EDTA
	1mg/ml Leupeptin
	1 μ M PMSF

Für die *in vitro* Phosphorylierung mit den PKC-Isoenzymen wurde PTP α aus nicht stimulierten, gehungerten Zellen immunpräzipitiert und in einem *in vitro* Kinase-assay mit den verschiedenen PKC Isoenzymen verwendet.

Nach der Kinase-Reaktion wurde PTP α 2x mit PPase-Puffer gewaschen und die Phosphatase-Aktivität gegenüber pNPP wie oben beschrieben bestimmt.

Die Phosphatase-Aktivität wurde ebenfalls gegenüber Src bestimmt.

PTP α wurde aus TPA-stimulierten Zellen immunpräzipitiert und mit rekombinanten Src aus Sf-9 Zellen in einem 200 μ l Ansatz in PPase-Puffer für 30min bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde Src aus dem Reaktionsgemisch in Gegenwart hoher Konzentrationen an Phosphatase-Inhibitoren (Na₂VO₄, pNPP, β -Glycerophosphat, Pyrophosphat, NaF) immunpräzipitiert, 2x mit Kinase-Puffer gewaschen und einer Auto-Kinase Reaktion unterzogen.

GTPase-assay

Um den Aktivitätsstatus der kleinen G-Proteine Rac, Cdc42 und Rho zu bestimmen, wurden Zellen einer 80-90% konfluente 10cm Schalen für die angegebenen Zeitpunkte mit TPA stimuliert, mit PBS gewaschen und in eiskaltem RIPA-Puffer (high salt) auf Eis lysiert. Die Lysate wurden für 2min bei 13.000 rpm und 4°C geklärt und mit 10-15 μ g GST-Rhotekin oder mit 3-5 μ g GST-CRIP für 1h bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Die Protein Komplexe wurden nachfolgend 1x mit RIPA-Puffer gewaschen, in 30 μ l 3x Laemmli Probenpuffer aufgenommen, aufgeköcht und der gesamte Ansatz gelelektrophoretisch über eine SDS-PAGE aufgetrennt. Die Abundanz der Proteine wurde mittels spezifischer Antikörper im Western-Blot analysiert.

Ergebnisse

3.1 PKC-Aktivierung führt zur Reorganisation des Zytoskeletts in A7r5- Zellen

Um die Rolle von PKC bei der Reorganisation des Aktin-Zytoskeletts zu analysieren, wurde die glatte Muskel Zell-Linie A7r5 aus der Rattenaorta verwendet. Diese Zell-Linie exprimiert die meisten der Phorbol ester-responsiven PKC Isoenzyme (PKC- α , - β_1 , - δ , - η , - θ) (Fukumoto et al., 1997), und zeigt im ruhenden Zustand ein wohl entwickeltes Netzwerk von Aktin-Stressfasern, welches den ganzen Zellkörper durchzieht (Abbildung 3.1.A).

Nach TPA-Stimulation und damit PKC-Aktivierung konnte eine komplette Reorganisation des Zytoskeletts beobachtet werden. Wie in Abbildung 3.1.A zu sehen, beginnt die sichtbare Reorganisation des Zytoskeletts bereits nach 30min TPA-Stimulation. Nach 2h konnte bei fast allen Zellen eine komplette Auflösung der Stressfasern beobachtet werden. Einhergehend mit der Auflösung der Stressfasern, konnte die Bildung von Lamellipodien und "Ruffles" beobachtet werden.

Phorbol ester aktivieren nicht nur PKCs sondern auch andere Signal-Proteine wie β -chimerin (Caloca et al., 2001) und Ras-guanyl nucleotide-releasing protein (Ras-GRF) (Ebinu et al., 1998). Diesen Proteinen konnte zudem eine Rolle bei der Reorganisation des Zytoskeletts zugesprochen werden (Kozma et al., 1996; Kiyono et al., 2000; Ahmed et al., 1993). Daher war es notwendig zu klären, ob das beobachtete Phänomen tatsächlich auf PKC-Aktivierung zurückzuführen ist, oder auf andere Phorbol ester-Rezeptoren. Zur Klärung dieser Frage wurden die Zellen 10min vor TPA-Administration mit dem PKC-spezifischen Inhibitor GF 109203X (Endkonzentration 2 μ M) behandelt. Wie aus Abbildung 3.1.B zu ersehen ist, konnte keine nennswerte Reorganisation des Zytoskeletts nach TPA-Stimulation in Gegenwart von GF 109203X beobachtet werden.

Damit war bewiesen, dass die Kinase-Aktivität von PKC für die TPA-induzierte Reorganisation des Zytoskeletts verantwortlich ist.

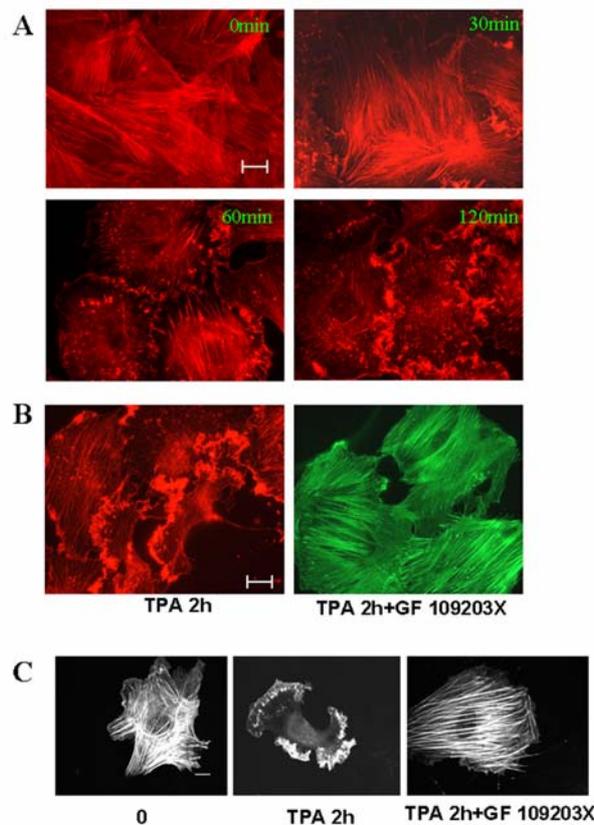


Abbildung 3.1.A/B/C: Reorganisation des Zytoskeletts nach PKC-Aktivierung. A7r5 Zellen wurden mit 1µM TPA stimuliert und das Zytoskelett wurde analysiert. In A und B wurden die Zellen fixiert und das Zytoskelett mittels Phalloidin-Färbung dargestellt. In C wurden EGFP-β-Aktin exprimierende Zellen unter einem konfokalen Mikroskop in vivo beobachtet. Die Dauer der Stimulation ist angegeben. Die Skalierungs-Balken repräsentieren 20µM. A: Nach 30min Stimulation beginnt die Auflösung der Stressfasern, gleichzeitig werden “ruffles” in der Peripherie sichtbar. Nach 1h sind nur noch wenige Stressfasern zu erkennen. Nach 2h ist die Reorganisation vollständig abgeschlossen: alle Stressfasern sind desintegriert und nahezu das gesamte F-Aktin befindet sich organisiert in “ruffles” in der Peripherie der Zelle. B: Als Kontrolle wurde die TPA-Stimulation in der Gegenwart von 2µM GF 109203X durchgeführt. Unter diesen Bedingungen konnte keine Reorganisation beobachtet werden. Alexa 488-konjugiertes Phalloidin wurde bei den Experimenten mit GF 109203X verwendet, weil der Inhibitor im roten Kanal eine intensive Fluoreszenz zeigt. C: A7r5 Zellen wurden mit einem EGFP-β-Aktin Konstrukt transfiziert und das Zytoskelett nach TPA-Stimulation in Gegenwart oder der Abwesenheit von GF109203X unter einem konfokalen Lasermikroskop analysiert.

Zusätzlich zu den oben gewonnenen Daten wurden EGFP- β -Aktin exprimierende Zellen nach TPA-Stimulation im konfokalen Lasermikroskop analysiert. Auch hier konnte eine GF 109203X -sensitive Reorganisation des Zytoskeletts beobachtet werden (Abbildung 3.1.C). Diese Experimente wurden ursprünglich deshalb durchgeführt, um die Dynamik des Prozesses der Reorganisation *in vivo* besser beobachten und damit analysieren zu können. Allerdings zeigten die Zellen außerhalb des Brutschranks (fehlendes CO₂) nicht das gewünschte Verhalten, weshalb hierbei ebenfalls nur Momentaufnahmen gemacht werden konnten.

Der relativ lange Zeitverlauf, der für die Reorganisation benötigt wurde, legte die Vermutung nahe, dass hierbei nicht nur die post-translationelle Modifikation sondern vielleicht auch die *de novo* Synthese von Proteinen eine Rolle spielen könnte. Für die Beantwortung der Frage, ob die PKC-induzierte Reorganisation des Zytoskeletts tatsächlich die Neusynthese von Proteinen benötigt, wurden die Zellen mit Cycloheximid (10 μ g/ml) vorbehandelt und dann mit TPA stimuliert. Unter diesen Bedingungen konnte ebenfalls eine Reorganisation beobachtet werden (nicht gezeigt), womit eine Beteiligung des Translationellen Apparates bei diesem Prozess, ausgeschlossen werden konnte.

3.2 Die PKC-vermittelte Reorganisation des Zytoskeletts wird über eine Aktivitätsverminderung von Rho gesteuert

Die Dynamik des Zytoskeletts wird durch die Aktivität der "kleinen" G-Proteine Rho, Rac und Cdc42 gesteuert (siehe Einleitung). Um die Rolle der kleinen G-Proteine im Rahmen der PKC-vermittelten Signaltransduktion zu untersuchen, wurde der Aktivitätsstatus der einzelnen G-Proteine im Verlauf der TPA-Stimulation analysiert. Die Analyse der Aktivität dieser Proteine wurde mit Hilfe von bakteriell exprimierten GST-Fusionproteinen durchgeführt, die spezifisch die aktive Konformation der kleinen G-Proteine erkennen und binden (siehe Einleitung und Methoden). Diese Versuche zeigten, dass die Aktivität von Rac und Cdc42 im Verlauf der TPA-Stimulation unverändert bleibt, die Aktivität von Rho dagegen eine dramatische Reduktion erfährt (Abbildung 3.2.A).

Bereits nach 30min TPA-Stimulierung konnte eine leichte Aktivitätsverminderung verzeichnet werden, die sich im weiteren Verlauf der Stimulation immer deutlicher darstellen ließ.

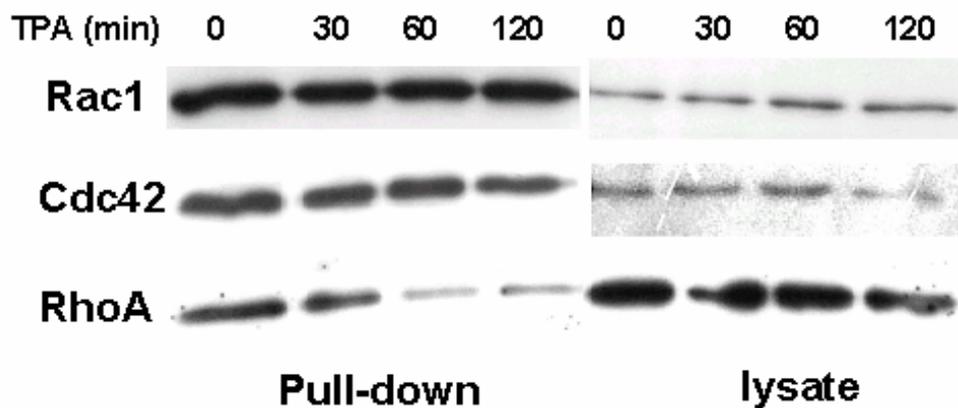


Abbildung 3.2.A: TPA-abhängige Reduktion der Rho-Aktivität in A7r5 Zellen. A7r5 Zellen wurden mit 1 μ M TPA für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert. Der Aktivitätsstatus der kleinen G-Proteine wurde mit Hilfe von GST-Fusionsproteinen, die spezifisch die aktive Konformation der G-Proteine erkennen, gewährleistet (siehe Methoden). Die Menge an präzipitierten Proteinen wurde im Western-Blot mit spezifischen Antikörpern analysiert. Als Kontrolle, dass vergleichbare Mengen an Protein analysiert wurden, wurden Zelllysate verwendet. Während die Aktivität von Rac und Cdc42 im Verlauf der TPA-Stimulation konstant blieb, konnte eine deutliche Reduktion der Rho-Aktivität nachgewiesen werden.

Um zu prüfen, ob die Kinase-Aktivität von PKC für die Aktivitätsverminderung von Rho verantwortlich ist, wurden die Zellen mit dem PKC-spezifische Inhibitor GF 109203X inkubiert und dann mit TPA stimuliert. Wie aus den vorhergehenden Befunden zu erwarten, ließ sich die TPA-induzierte Aktivitätsverminderung von Rho durch die Gegenwart von GF 109203X inhibieren (Abbildung 3.2.B).

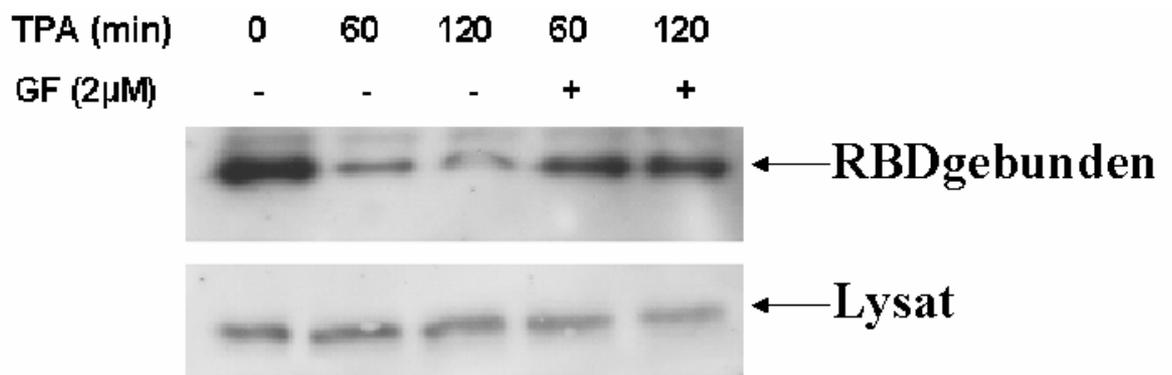
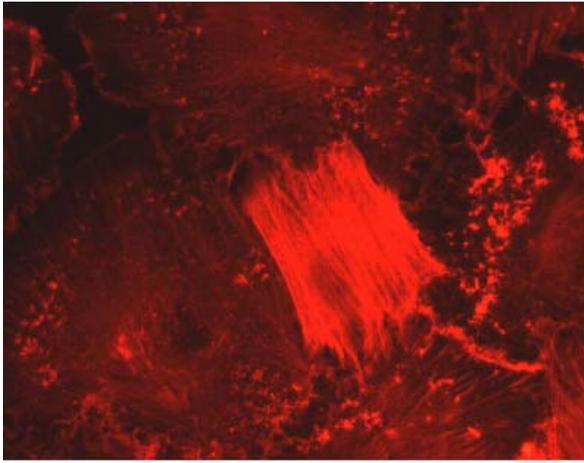
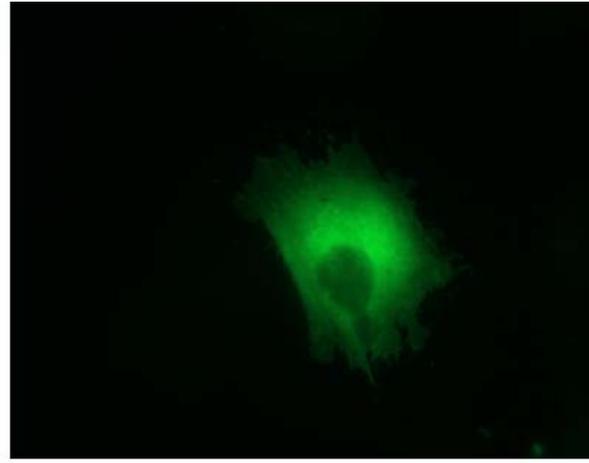


Abbildung 3.2.B: Die Kinase-Aktivität von PKC ist für die Aktivitätsverminderung von Rho nach TPA-Stimulation verantwortlich. Um zu testen, ob die Kinase-Aktivität von PKC für die Reduktion der Rho-Aktivität verantwortlich ist, wurde die Aktivität von Rho in Gegenwart des PKC-spezifischen Inhibitors GF-109203X nach TPA-Stimulation analysiert. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die nur mit TPA stimuliert wurden. In den Kontroll-Zellen konnte wiederum eine deutliche TPA-abhängige Verminderung der Rho-Aktivität verzeichnet werden. In Gegenwart von GF-109203X blieb die Rho-Aktivität unbeeinflusst.

Zur weiteren Überprüfung, ob die Aktivitätsverminderung von Rho alleine für das beobachtete Phänomen verantwortlich ist, wurde ein Expressionsvektor für RhoV14, welches an EGFP fusioniert wurde, verwendet. Die Zellen, die die konstitutiv-aktive Variante des Rho-Proteins exprimierten (zu sehen an der grünen Färbung), zeigten noch nach 2h TPA-Stimulation ein dichtes Netzwerk aus Aktin-Stressfasern, wohingegen die umliegenden Zellen bereits alle Stressfasern aufgelöst hatten (Abbildung 3.2.C).



Phalloidin

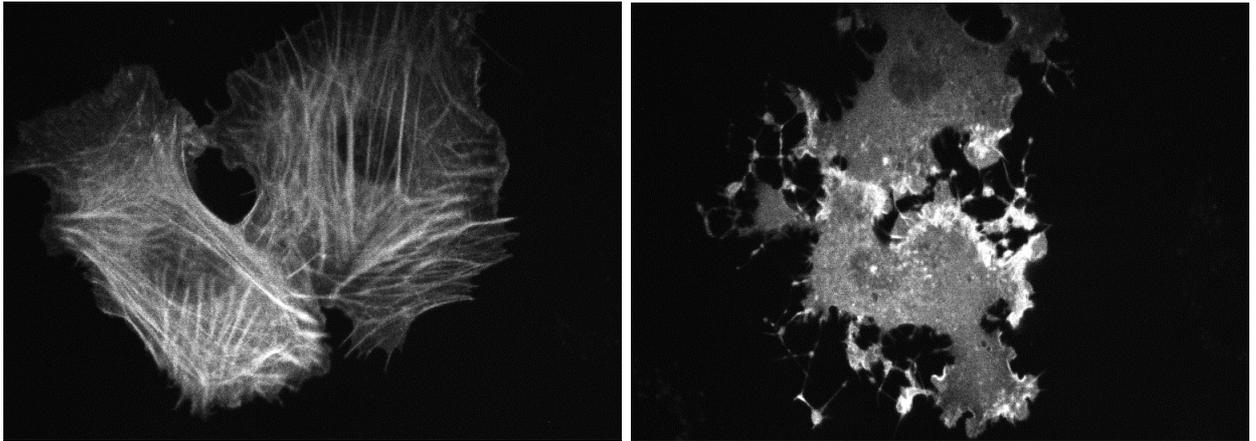


EGFP-RhoV14

Abbildung 3.2.C: Rho-V14 exprimierende Zellen zeigen nach TPA-Stimulation keine Desintegration der Stressfasern. Um zu überprüfen, ob die Rho-Aktivität alleine für das beobachtete Phänomen verantwortlich ist, wurde A7r5 Zellen mit einem EGFP-RhoV14 Konstrukt transfiziert. 48h nach der Transfektion wurden die Zellen für 2h mit TPA behandelt, fixiert und mit Alexa 568-konjugiertem Phalloidin gefärbt. Zellen mit einer grünen Fluoreszenz wurden in Hinblick auf ihr Aktin Zytoskelett untersucht. Zellen, die die konstitutiv-aktive Variante des Rho-Proteins exprimierten, zeigten selbst nach 2h TPA-Stimulation ein dichtes Netzwerk von Aktin-Stressfasern, während in den umgebenden, nicht-transfizierten Zellen eine fast vollständige Desintegration der Aktin-Stressfasern zu beobachten war.

Die Aktivitätsverminderung von Rho sollte ebenfalls zu einer Aktivitätsverminderung der unterhalb von Rho angesteuerten Kinase, Rho-activated kinase (ROCK), führen. Daher wurde vermutet, dass eine Inhibition von ROCK zu einem ähnlichen Phänotyp führen sollte wie PKC-Stimulation.

Zur Überprüfung dieser Hypothese wurden die Zellen mit dem ROCK-spezifischen Inhibitor Y27632 (10 μ M) inkubiert. Wie schon von anderen Autoren beschrieben (Narumiya et al., 2000; Sinnott-Smith et al., 2001), führte die Administration von Y27632 nach 1h zu einem ähnlich Phänotyp wie PKC-Stimulation: eine komplette Auflösung der Aktin-Stressfasern (Abbildung 3.2.D).



0min

60min

Abbildung 3.2.D: Wirkung von Y-27632 auf das Zytoskelett von A7r5 Zellen. A7r5 Zellen wurden mit einem EGFP- β -Aktin Konstrukt transfiziert. 48h nach Transfektion wurden die Zellen mit dem ROCK-spezifischen Inhibitor Y27632 in einer Endkonzentration von $10\mu\text{M}$ für 60min inkubiert. Das Aktin-Zytoskelett der Zellen wurde unter einem konfokalen Lasermikroskop vor und nach Y-27632 Zugabe untersucht. Die Administration von Y27632 führt nach 1h zu einer kompletten Auflösung der Stressfasern.

Anhand dieser Experimente konnte eindeutig gezeigt werden, dass die PKC-vermittelte Aktivitätsverminderung von Rho und die damit verbundene Störung des Gleichgewichts zwischen der Aktivität der kleinen G-Proteine alleine für die Ausbildung eines Rac-ähnlichen Phänotyps verantwortlich war.

3.3 Die PKC-induzierte Aktivierung der Tyrosin-Kinase Src ist notwendig für die Reorganisation des Zytoskeletts

Wie unter 3.2 gezeigt werden konnte ist die PKC-vermittelte Reorganisation des Zytoskeletts mit einer Aktivitätsverminderung von Rho und nicht mit einer Aktivitätszunahme von Rac verbunden. Dieser Befund ließ die Hypothese zu, dass p190RhoGap in diesen Prozess involviert sein könnte. P190RhoGap ist ein GTPase-aktivierendes Protein (GAP) mit hoher Spezifität für Rho (Arthur et al., 2001; Arthur et al., 2000; Dumenil et al., 2000; Nakahara et al., 1998; Chang et al., 1995).

Die Aktivität von p190RhoGap wird durch Tyrosin-Phosphorylierung reguliert, und in mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Src verantwortlich für die Phosphorylierung und damit Regulation von p190RhoGap ist (Fincham et al., 1999; Ellis et al., 1990; Brouns et al., 2001; Roof et al., 1998).

Zunächst wurde deshalb der Frage nachgegangen, inwieweit sich in diesem experimentellen System eine Zunahme an Tyrosin-phosphorylierten Proteinen nachweisen ließ. Wie aus Abbildung 3.3.A zu entnehmen, konnte eine deutliche Induktion an Tyrosin-Phosphorylierung in Ganzzelllysaten im Verlauf der TPA-Stimulation mittels Immuno-Blot nachgewiesen werden.

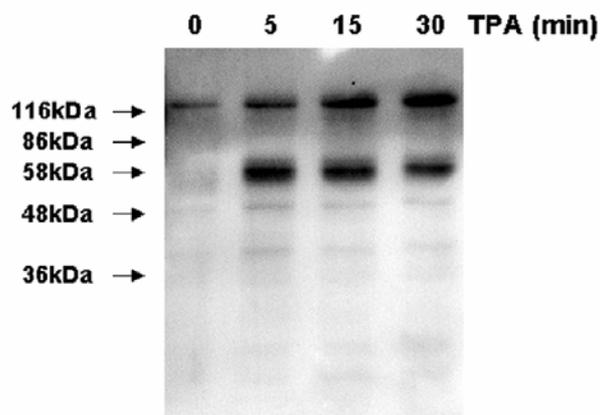


Abbildung 3.3.A: TPA induziert Tyrosin-Phosphorylierung in A7r5 Zellen. A7r5 Zellen wurden über Nacht in Serum-freien Medium gehalten, nachfolgend mit TPA für die angegebenen Zeitpunkte stimuliert und geerntet. Die Zellysate wurde gelelektrophoretisch über eine SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Tyrosin-phosphorylierte Proteine wurden mit Hilfe eines PhosphoTyrosin-spezifischen Antikörpers detektiert. Breits nach 15min TPA-Stimulation konnte eine deutliche Zunahme von Tyrosin-phosphorylierten Proteinen im Bereich von 40, 50, 60 und 120 kDa nachgewiesen werden.

In weitere Folge wurde dann spezifisch die Aktivität von Src vor und nach TPA-Stimulation analysiert. Src wurde dafür aus Zellen immunpräzipitiert, die zuvor unter Serum-freien Bedingungen gehalten wurden, und die Kinase-Aktivität wurde gegenüber Säure-denaturierter Enolase gemessen (Shenoy et al., 1992).

Mittels dieses Experiments konnte gezeigt werden, dass die Kinase-Aktivität von Src durch TPA-Stimulation eine deutliche Zunahme erfährt (Abbildung 3.3.B).

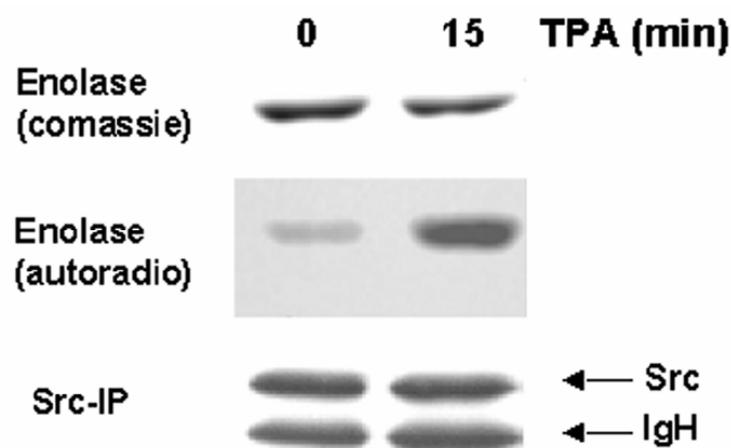


Abbildung 3.3.B: TPA induziert eine gesteigerte Aktivität von Src. Src wurde aus serumverarmten Zellen vor und nach TPA-Stimulation immunpräzipitiert und die Kinase-Aktivität nachfolgend in einem *in vitro* Kinase-assay gegenüber gegenüber Enolase (1 μ g) in Gegenwart von radioaktiv markiertem Phosphat analysiert. Die Kinase-Reaktion wurde über eine SDS-PAGE gelelektrophoretisch getrennt. Enolase wurde mit einer Comassie-Färbung sichtbar gemacht (oben) und autoradiographiert (mitte). Zur Überprüfung, dass gleiche Mengen an Src in diesem Assay analysiert wurden, wurde ein Immunoblot mit dem Src-spezifischen Antikörper durchgeführt (unten). Es konnte gezeigt werden, dass die Kinase-Aktivität von Src nach TPA-Stimulation eine deutliche Induktion erfährt.

Für eine weitere Überprüfung der Hypothese, dass die Aktivierung von Src im Zuge der PKC-induzierten Reorganisation des Zytoskeletts essentiell ist, wurde der Src-spezifische Inhibitor PP2 verwendet.

A7r5 Zellen wurden für 10min mit 50 μ M PP2 vorinkubiert und nachfolgend mit TPA behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die nur mit TPA stimuliert wurden. Während sich in den Kontrollzellen eine deutliche Auflösung der Aktin-Stressfasern einhergehend mit der Ausbildung von "ruffles" beobachten ließ, konnte nur ein schmaler Effekt in solchen Zellen beobachtet werden, die mit PP2 vorbehandelt wurden (Abbildung 3.3.C).

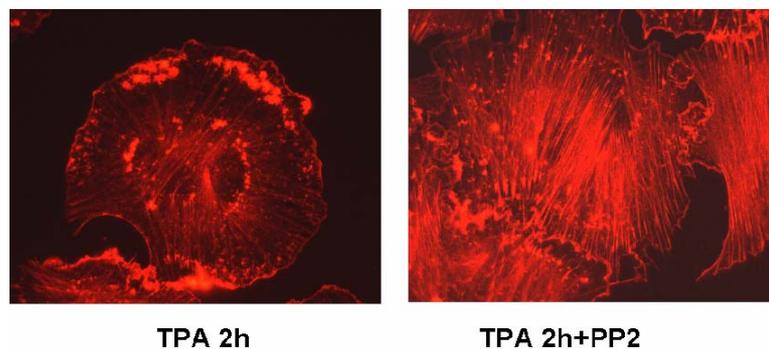


Abbildung 3.3.C: Die TPA-induzierte Src Aktivierung ist notwendig für die PKC-vermittelte Reorganisation des Zytoskeletts. A7r5 Zellen wurden in der Gegenwart oder Abwesenheit des Src-spezifischen Inhibitors PP2 für 2h mit TPA stimuliert, fixiert und das Zytoskelett mittels Phalloidin-Färbung dargestellt. In der Gegenwart von PP2 blieben auch nach 2h TPA-Stimulation die Stressfasern erhalten. Lediglich eine kleine Anzahl von dorsalen "microruffels" konnte beobachtet werden. Die Zellen, die nur mit TPA stimuliert wurden, zeigten eine fast vollständige Desintegration der Stressfasern.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Src-Kinase Aktivität ebenfalls für die PKC-abhängige Aktivitätsverminderung von Rho verantwortlich ist. A7r5 Zellen wurden für 10min mit 50 μ M PP2 behandelt, mit TPA stimuliert und der Aktivitätsstatus von Rho wurde analysiert. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die nur mit TPA behandelt wurden. Wie anhand von Abbildung 3.3.D zu sehen, konnte die Aktivitätsverminderung von Rho, die nach 1h in Kontroll-Zellen zu beobachten war, durch die Verwendung von PP2 inhibiert werden. Nach 2h TPA-Stimulation konnte auch in der Gegenwart von PP2 eine schwache aber reproduzierbare

Aktivitätsverminderung von Rho nachgewiesen werden, was sich auch mit den morphologischen Daten in Übereinstimmung bringen ließ, wo eine kleine Anzahl dorsaler Mikro-“ruffles” zu beobachten war.

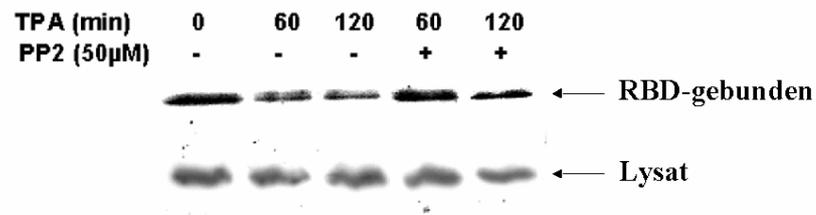


Abbildung 3.3.D: Die PKC vermittelte Aktivitätsverminderung von Rho wird über Src gesteuert. Um zu testen, ob auch die Kinase-Aktivität von Src für die PKC-induzierte Reduktion der Rho-Aktivität verantwortlich ist, wurde die Aktivität von Rho in Gegenwart von PP2 nach TPA-Stimulation analysiert. Als Kontrolle wurden Zellen verwendet, die nur mit TPA stimuliert wurden. In den Kontroll-Zellen konnte erneut eine deutliche TPA-abhängige Verminderung der Rho-Aktivität verzeichnet werden. In Gegenwart von PP2 blieb die Rho-Aktivität nach einer Stunde TPA-Stimulation unbeeinflusst, nach 2h hingegen konnte eine leichte Reduktion beobachtet werden.

Um die Resultate, die mit der Verwendung des Src-spezifischen Inhibitors, gewonnen wurden, weiter zu überprüfen, wurde eine Kinase-inaktive Variante von Src (Src K/M) überexprimiert. Die Zellen, die Src K/M überexprimierten, wurden mittels des Src-spezifischen Antikörper 2-17 immunhistochemisch nachgewiesen.

Die Überexpression von Src K/M hat keinen Effekt auf die normale Ausbildung des Zytoskellets in diesen Zellen (nicht gezeigt). Nach TPA-Stimulation über 2h konnte in den transfizierten Zellen noch Stressfasern beobachtet werden (Abbildung 3.3.F). In den umliegenden nicht transfizierten Zellen hingegen konnte eine komplette Reorganisation des Zytoskellets beobachtet werden. Die partielle Reorganisation, die in Src K/M Zellen zu beobachten war, dürfte auf die Aktivität von endogenem Src zurück zu führen sein.

Als Kontrolle wurden Expressionplasmide für Src wildtyp (wt) und konstitutiv-aktives Src (Src c/a) verwendet.

Die Überexpression von Src wt war wie erwartet ohne Befund in Hinblick auf die PKC-vermittelte Reorganisation. Die Expression von Src c/a führte zu einer TPA-unabhängigen Auflösung der Aktin-Stressfasern und Reorganisation des Zytoskeletts. Dieser Effekt wurde bereits in der Vergangenheit von anderen Wissenschaftlern beschrieben (Beug et al., 1978; Fincham et al., 1999).

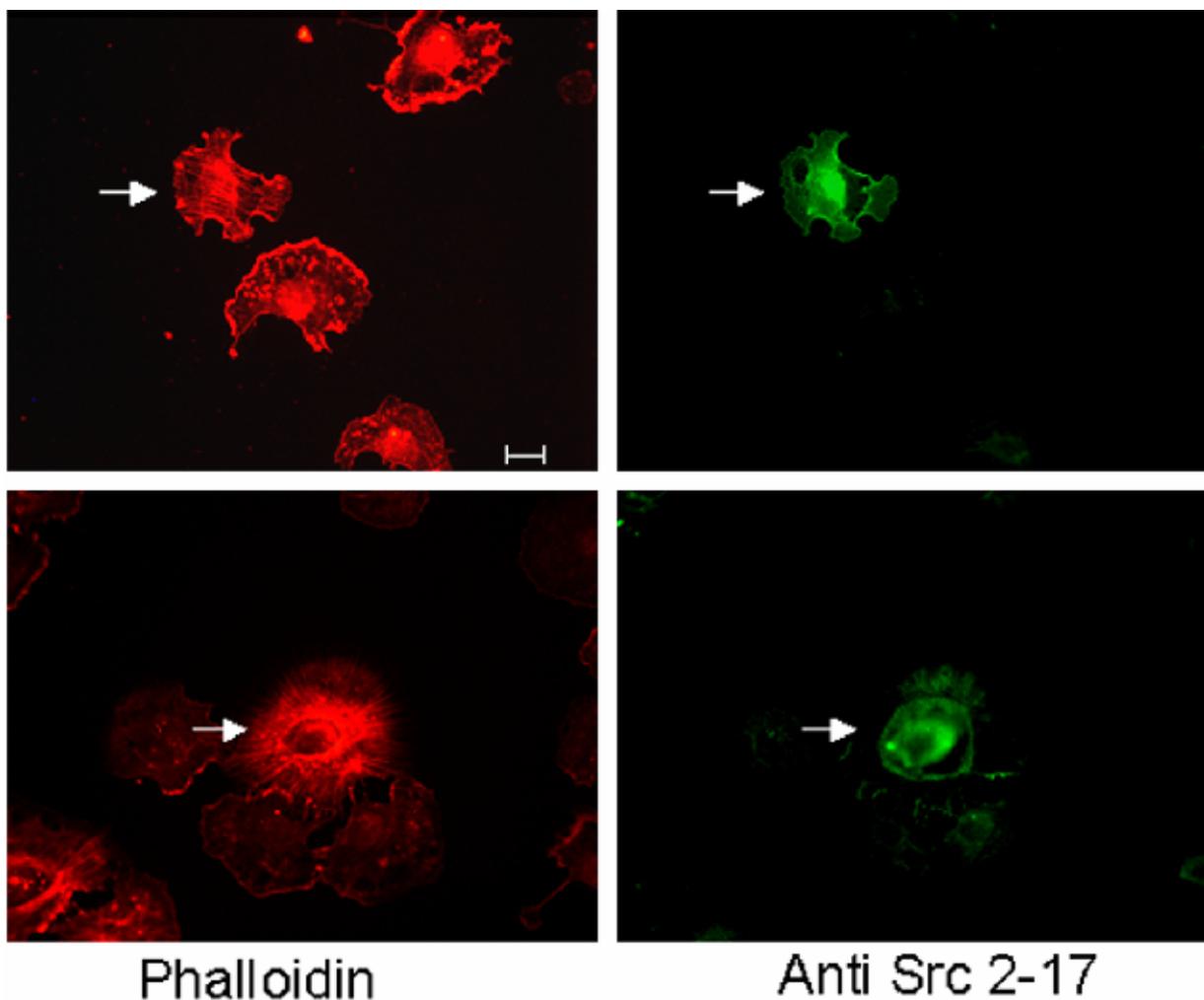


Abbildung 3.3.E: Die Überexpression von Src K/M inhibiert die PKC-induzierte Reorganisation des Zytoskeletts. A7r5 Zellen wurden mit einem Konstrukt, das für kinase-inaktives Src kodiert transfiziert und 48h nach Transfektion für 2h mit TPA stimuliert und fixiert. Für die Detektion der Src überexprimierenden Zellen wurde der Src-spezifische Antikörper 2-17 verwendet. Das Zytoskelett wurde über eine Phalloidin-Färbung dargestellt.

Zellen, die Src K/M überexprimieren zeigten noch nach 2h TPA-Stimulation deutlich Stressfasern, während in den umliegenden nicht transfizierten Zellen eine fast vollständige Desintegration der Stressfasern zu beobachten war.

Damit konnte anhand von vier unabhängigen Experimenten nachgewiesen werden, dass die PKC-vermittelte Reorganisation des Zytoskeletts in A7r5-Zellen über eine Aktivierung von Src gesteuert wird.

3.4 TPA induziert die Tyrosin-Phosphorylierung von p190RhoGap über die Aktivierung von PKC und Src

Wie bereits unter 3.3. ausgeführt, könnte die Verbindung zwischen Src und der verminderten Rho-Aktivität über eine Phosphorylierung und Aktivierung von p190RhoGap erfolgen. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde p190RhoGap aus A7r5-Zellen vor und nach TPA-Stimulation immunpräzipitiert und das Ausmaß an Tyrosin-Phosphorylierung mit Hilfe des Tyrosin-spezifischen Antikörpers pTyr-100 bestimmt.

Wie anhand von Abbildung 3.4.A ersichtlich wird, läßt sich nach TPA-Stimulation ein deutlicher Anstieg der Tyrosin-Phosphorylierung in p190RhoGap verzeichnen.

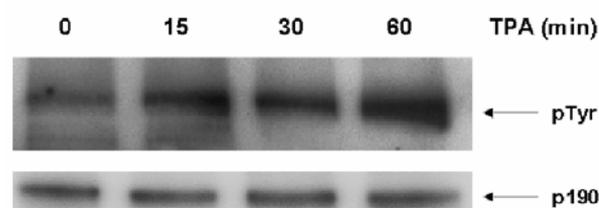


Abbildung 3.4.A: TPA induziert die Tyrosin-Phosphorylierung von p190RhoGap. A7r5 Zellen wurden über Nacht in Serum-freien Medium gehalten, für die angegebenen Zeitpunkte mit TPA stimuliert und geerntet. Der Phosphorylierungsstatus von p190RhoGap wurde nach Immunpräzipitation mit Hilfe des PhosphorTyrosin-spezifischen

Antikörpers im Immuno-Blot analysiert. Als Kontrolle, das gleiche Mengen an p190RhoGap analysiert wurden, wurde ein Kontroll-Blot mit einem Antikörper gegen p190RhoGap durchgeführt. Es konnte eine deutliche Zunahme an Tyrosin-phosphoryliertem p190RhoGap nach TPA-Stimulation nachgewiesen werden.

Ferner konnte, unter Verwendung spezifischer Inhibitoren, gezeigt werden, dass der TPA-induzierte Anstieg an Tyrosin-Phosphorylierung von p190RhoGap auf einer PKC induzierten Src-Aktivierung beruht (Abbildung 3.4.B).

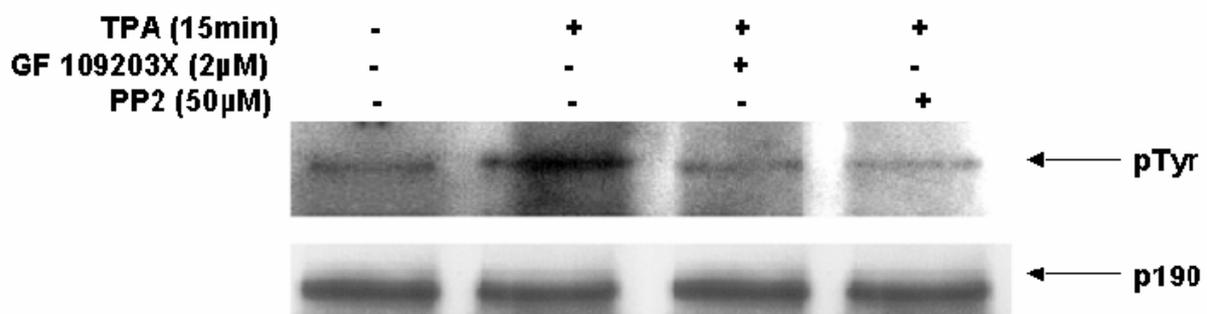


Abbildung 3.4.B: Die Induktion der Tyrosin-Phosphorylierung von p190RhoGap nach TPA-Stimulation basiert auf einer PKC-vermittelten Src Aktivierung. A7r5 Zellen wurden über Nacht in Serum-freien Medium gehalten, in der Abwesenheit oder Gegenwart spezifischer Inhibitoren für 15min mit TPA stimuliert und geerntet. Der Phosphorylierungsstatus von p190RhoGap wurde nach Immunpräzipitation mit Hilfe des PhosphorTyrosin-spezifischen Antikörpers im Immuno-Blot analysiert. Als Kontrolle, das gleiche Mengen an p190RhoGap analysiert wurden, wurde ein Kontroll-Blot mit einem Antikörper gegen p190RhoGap durchgeführt. Die Induktion der Tyrosin-Phosphorylierung von p190RhoGap nach TPA-Stimulation konnte sowohl durch die Gegenwart von GF109203X als auch durch PP2 inhibiert werden.

Anhand der oben aufgeführten Experimente konnte ein Großteil der Signaltransduktion, die im Zuge der PKC-vermittelten Reorganisation eine Rolle spielt, aufgeklärt werden. Die Daten wurden im Journal of Biological Chemistry (Vol. 277, No. 23) im Juni 2002 publiziert.

Eine der noch offene Frage, die im Folgenden beantwortet werden soll, war die nach dem Mechanismus der PKC-vermittelten Src-Aktivierung. Eine TPA-vermittelte Src-Aktivierung wurde bereits von zahlreichen anderen Forschergruppen beschrieben (Bruce-Staskal and Bouton, 2001; Schlaepfer et al., 1998; Xian et al., 1997; Shanmugam et al., 1998). Der Mechanismus jedoch, wie PKC Src aktivieren kann, blieb bisher unbekannt.

Die bisher gängigen Modelle gehen davon aus, dass Src im inaktivem Zustand an Tyrosin 527 phosphoryliert ist. Die Phosphorylierung von Tyrosin 527 wird über die C-terminale Src Kinase (Csk) reguliert (Young et al., 2001; Courtneidge et al., 1993). Nach Dephosphorylierung dieses Tyrosin-Restes findet eine Konformationsänderung im Protein statt, die eine Auto-Phosphorylierung an Tyrosin 416 zur Folge hat. Damit liegt die Kinase in einer aktiven Konformation vor.

Besonderes Augenmerk im Hinblick auf die Regulation der Src Kinase-Aktivität wurde auf PTP1 α gelegt. Diese Phosphatase wird TPA-abhängig phosphoryliert (Tracy et al., 1995), was mit einer Aktivitäts-Steigerung der Phosphatase einhergeht (den Hertog et al., 1995a). Zusätzlich wurde PTP1 α als physiologischer Regulator von Src beschrieben (Harder et al., 1998; Zheng et al., 2000).

3.5 TPA-Stimulation führt zu einem Anstieg der Phosphatase-Aktivität von PTP α gegenüber para-Nitro Phenyl Phosphat (pNPP) und Src

Wie bereits von den Hertog 1995 beschrieben, führt die TPA-Stimulation von P19- und 293-Zellen zu einem Anstieg der Phosphatase-Aktivität von PTP α gegenüber Tyrosin-Phosphoryliertem MBP (den Hertog et al., 1995a). Es sollte deshalb überprüft werden, ob sich dieser Befund in A7r5-Zellen reproduzieren lässt. Für dieses Experiment wurden A7r5-Zellen mit einem HA-getagtem PTP α -Konstrukt transfiziert, PTP α über den HA-Tag vor und nach TPA-Stimulation immunpräzipitiert und die Phosphatase-Aktivität gegenüber pNPP bestimmt. Wie anhand von

Abbildung 3.5.A zu erkennen, konnte ein 2-3 facher Anstieg der Phosphatase-Aktivität gegenüber pNPP nach TPA-Stimulation nachgewiesen werden.

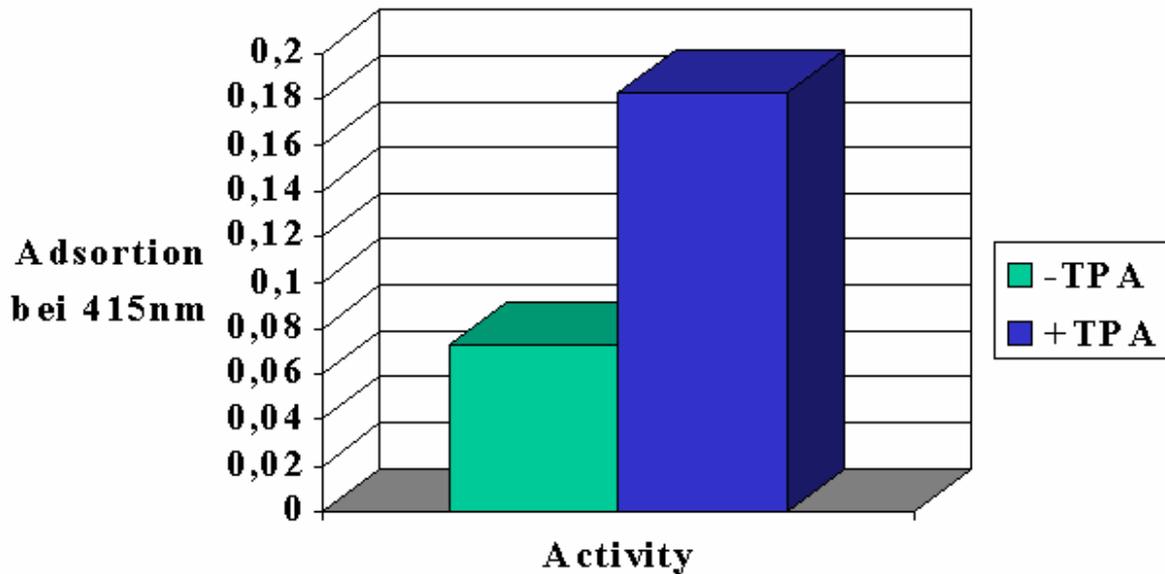


Abbildung 3.5.A: PTP α -Aktivität nach TPA-Stimulation gegenüber pNPP. A7r5-Zellen wurden mit einem HA-getaggten PTP α -Konstrukt transfiziert. PTP α wurde über den HA-Tag vor und nach TPA-Stimulation immunpräzipitiert und die Phosphatase-Aktivität gegenüber pNPP bestimmt.

Da pNPP ein sehr unspezifisches Substrat für Phosphatasen darstellt, sollte im folgenden überprüft werden ob PTP α nach TPA-Stimulation ebenfalls zur Aktivierung von Src befähigt ist. Dafür wurde PTP α vor und nach TPA-Stimulation über den HA-Tag aus Zellen immunpräzipitiert und mit rekombinanten Src aus SF9 inkubiert. Rekombinantes Src wurde nach erfolgter Dephosphorylierung aus dem Reaktionsgemisch immunpräzipitiert und einer Auto-Kinase Reaktion unterzogen. Der Aktivitätsstatus von Src wurde mittels des Src Tyr416-spezifischen Antikörpers bestimmt. Wie anhand von Abbildung 3.5.B zu erkennen ist, erfährt Src nach Inkubation mit PTP α aus TPA-Stimulierten Zellen eine deutliche Aktivierung.

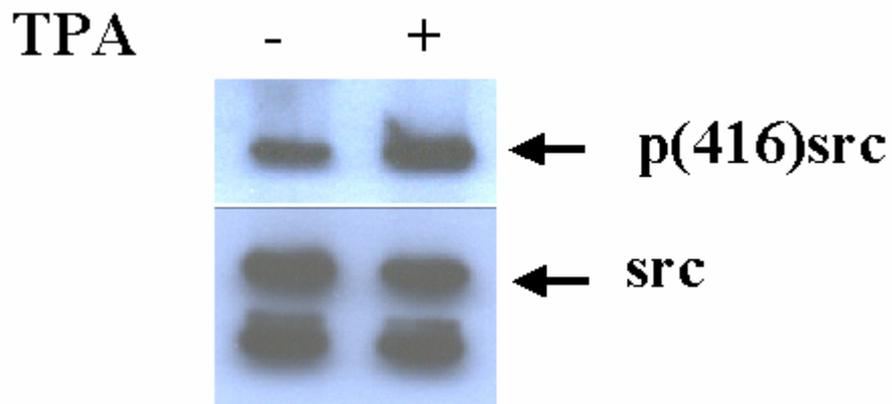


Abbildung 3.5.B: PTP α -Aktivität nach TPA-Stimulation gegenüber Src. A7r5-Zellen wurden mit einem HA-getaggtten PTP α -Konstrukt transfiziert. PTP α wurde über den HA-Tag vor und nach TPA-Stimulation immunpräzipitiert und mit rekombinatem Src aus Sf-9 Zellen inkubiert. Src wurde nach der Inkubation mit PTP α immunpräzipitiert und einer Auto-Kinase Reaktion unterzogen. Die Immunkomplexe wurden Gelelektrophoretisch über eine SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferriert. Der Nachweis der Aktivität von Src erfolgte mit dem pTyr416-spezifischen Antikörper. Als Kontrolle, dass in diesem Experiment vergleichbare Mengen Src analysiert wurden, wurde ein Kontrollblot mit dem Src-spezifischen Antikörper durchgeführt.

3.6 PKC δ phosphoryliert PTP α *in vitro*

Bereits 1995 konnte von Tracy et al. gezeigt werden, dass PTP α nach TPA-Stimulation *in vivo* an Serin 184 und 204 phosphoryliert wird (Tracy et al., 1995).

Die Schwierigkeit bei der Interpretation solcher Befunde liegt darin, dass es 1. noch weitere TPA-responsive Signaltransduktions Moleküle in der Zelle gibt, und 2. dass die Phosphorylierung dieser beiden Serin-Seitenketten nicht direkt auf die Aktivität von PKC zurückzuführen sein muß, sondern auch auf die Aktivität einer Kinase, die PKC-abhängig aktiviert wird.

Es sollte deshalb im Folgenden überprüft werden, ob PKC PTP α direkt phosphorylieren kann.

Dazu wurde ein bakterielles GST-Fusionsprotein mit der cytoplasmatischen Domäne von PTP α (GST-PTP α cyt) mit rekombinanten PKC-Isoenzyme aus Sf-9 Zellen (Kazanietz et al., 1993) in einem *in vitro* Kinase-Assay eingesetzt. Es wurden nur die fünf TPA-responsiven PKC-Isoenzyme, die in A7r5-Zellen exprimiert werden, verwendet (Fukumoto et al., 1997). Als Kontrolle für die Kinase-Aktivität der PKC-Isoenzyme wurde MBP verwendet.

Wie aus Abbildung 3.6.A zu ersehen, wird das bakterielle PTP α -Protein nur von PKC δ phosphoryliert, nicht aber von PKC α , β , ϵ , η . Anhand der Kontrollreaktion gegenüber MBP konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Isoenzyme eine vergleichbare Kinase-Aktivität hatten.

Daraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass PKC δ die Kinase darstellen könnte, die PTP α spezifisch phosphoryliert und aktiviert.

Im nächsten Schritt wurde untersucht, ob die PKC δ -abhängige Phosphorylierung von PTP α auch mit einer gesteigerten Aktivität der Phosphatase gegenüber pNPP und Src einhergeht.

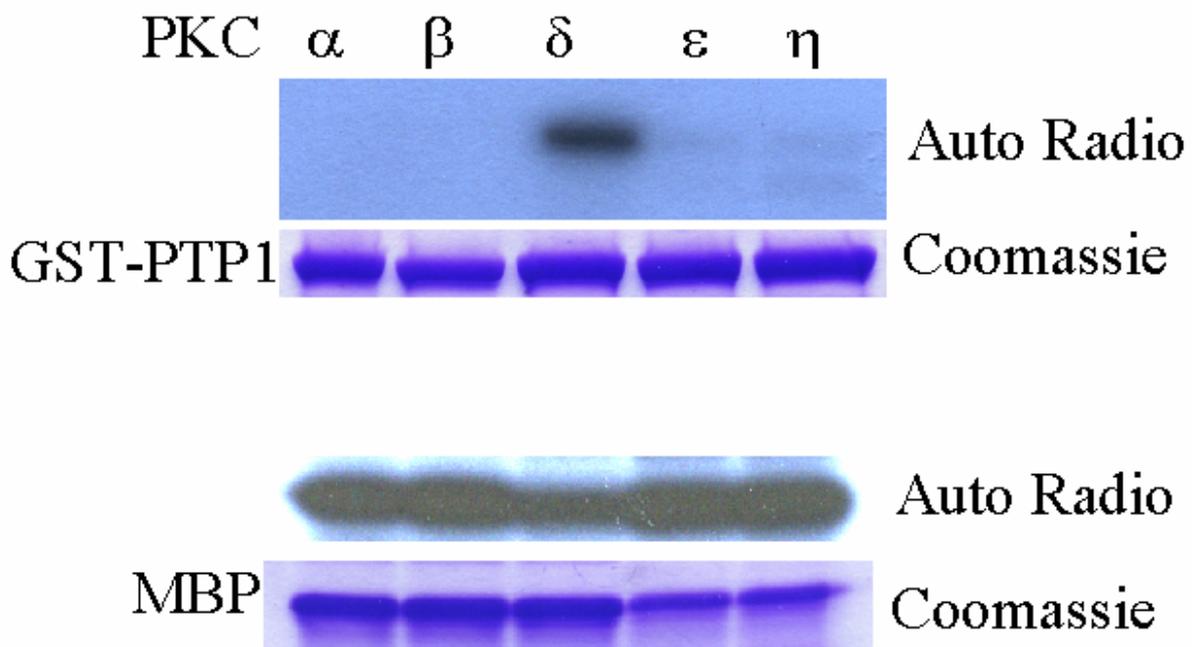


Abbildung 3.6.A: PKC δ phosphoryliert PTP α . Bakteriell exprimiertes GST-PTP α cyt wurde in einem *in vitro* Kinase assay mit unterschiedlichen PKC-Isoenzymen aus Sf-9 Zellen in Gegenwart von radioaktiv markiertem Phosphat inkubiert. Die Kinase-Reaktion wurde gelelektrophoretisch über eine SDS-PAGE getrennt und die Proteine über eine Coomassie-Färbung dargestellt. Als Kontrolle für die Reaktivität der PKC-Isoenzyme wurde MBP als Substrat verwendet.

3.7 PKC δ aktiviert PTP α *in vitro*

Zur Überprüfung der Hypothese, dass PKC δ PTP α phosphoryliert und aktiviert, wurde PTP α über den HA-Tag aus serumverarmten Zellen immunpräzipitiert und nachfolgend *in vitro* mit den fünf unterschiedlichen PKC-Isoenzymen phosphoryliert. Die Phosphatase-Aktivität wurde nachfolgend gegenüber pNPP bestimmt.

Wie anhand von Abbildung 3.7.A zu erkennen ist, führt die Phosphorylierung von PTP α mit PKC δ nicht aber mit PKC α , β , ϵ , η zu einer gesteigerten Phosphatase-Aktivität gegenüber pNPP.

Extinktion
bei 415nm

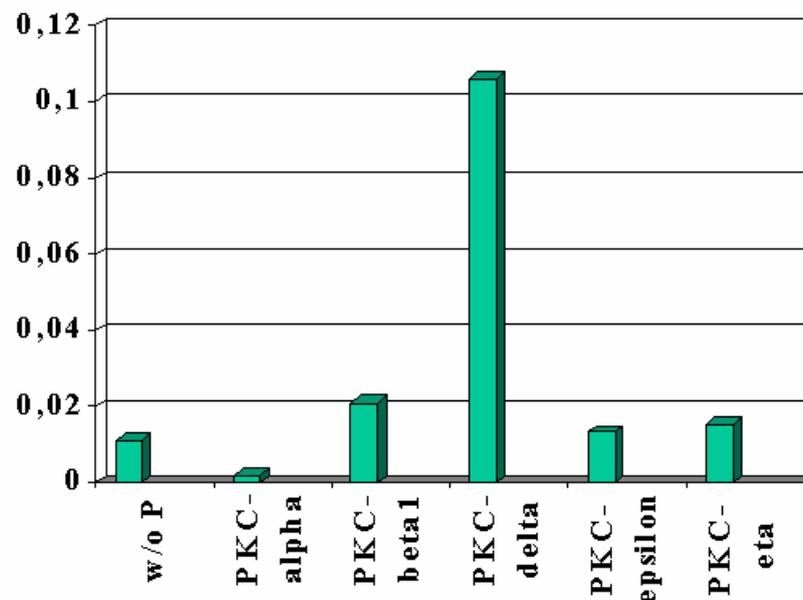


Abbildung 3.7.A: PKC δ aktiviert die Phosphatase-Aktivität von PTP α gegenüber pNPP. A7r5 Zellen wurden mit einem HA-getaggtten PTP α -Konstrukt transfiziert. PTP α wurde über den HA-Tag immunpräzipitiert mit unterschiedlichen PKC-Isoenzymen aus Sf-9 Zellen in einem *in vitro* Kinase-assay umgesetzt. Nach erfolgter Inkubation wurde die Phosphatase-Aktivität gegenüber pNPP bestimmt.

Zur Überprüfung, ob die PKC δ -abhängige Phosphorylierung von PTP α ebenfalls mit einer gesteigerten Aktivität der Phosphatase gegenüber Src einhergeht, wurde verfahren wie oben: PTP α wurde über den HA-Tag aus serumverarmten Zellen immunpräzipitiert und *in vitro* mit den fünf PKC-Isoenzymen phosphoryliert. Nach Abschluss der Kinase-Reaktion wurde PTP α mit Src aus Sf-9 Zellen inkubiert. Src wurde nachfolgend aus dem Reaktionsgemisch immunpräzipitiert und einer Auto-Kinase-Reaktion unterzogen. Der Aktivitätsstatus von Src wurde mittels des Src Tyr416-spezifischen Antikörpers bestimmt.

Wie anhand von Abbildung 3.7.B zu sehen, führt die Inkubation von PKC δ phosphoryliertem PTP α zu einer deutlichen Src-Aktivierung.

Die Phosphorylierung von PTP α mit PKC- α , β , ϵ oder η blieb wie aus den vorhergehenden Experimenten zu erwarten ohne Befund.

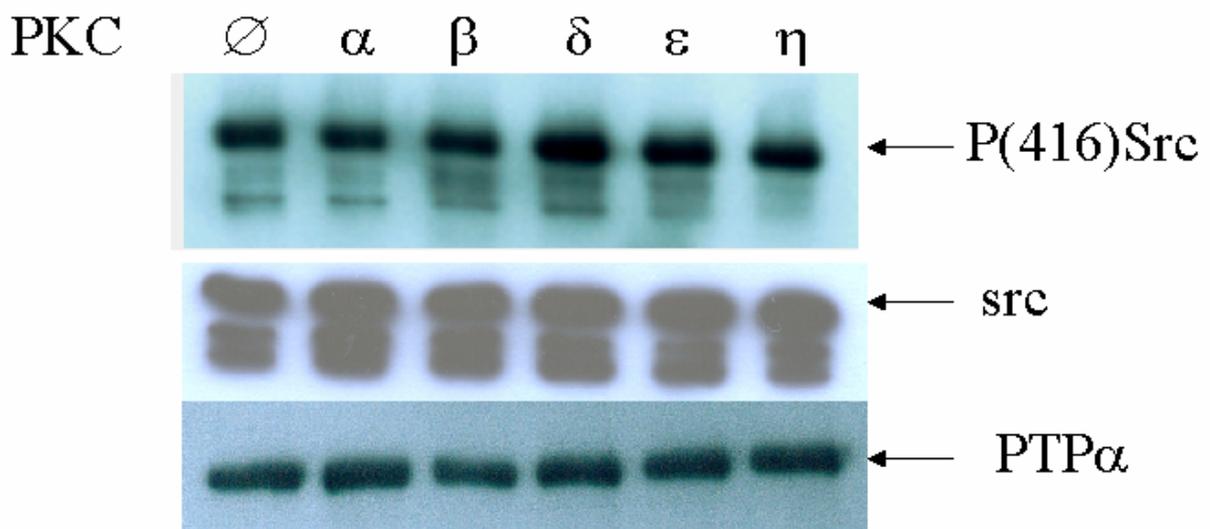


Abbildung 3.7.B: PKC δ aktiviert die Phosphatase-Aktivität von PTP α gegenüber Src. A7r5 Zellen wurden mit einem HA-getaggen PTP α -Konstrukt transfiziert. PTP α wurde über den HA-Tag immunpräzipitiert mit unterschiedlichen PKC-Isoenzymen aus Sf-9 Zellen in einem *in vitro* Kinase-assay umgesetzt. PTP α wurde nachfolgend mit rekombinantem Src aus Sf-9 Zellen inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wurde Src aus dem Reaktionsgemisch immunpräzipitiert und einer Auto-Kinase Reaktion unterzogen. Die Immunkomplexe wurden gelelektrophoretisch über eine SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Der Nachweis der Aktivität von Src erfolgte mit dem pTyr416-spezifischen Antikörper. Als Kontrolle, dass in diesem Experiment vergleichbare Mengen Src und PTP α analysiert wurden, wurden Kontrollblots mit dem Src- und PTP α -spezifischen Antikörper angefertigt.

3.8 Dermale Fibroblasten aus PKC δ knock out Mäusen zeigen eine verminderte Fähigkeit, Src nach TPA-Stimulation zu aktivieren

Anhand der vorangegangenen Experimente konnte gezeigt werden, dass *in vitro* PKC δ die Aktivität von PTP α und damit Src reguliert.

Um die physiologische Relevanz dieses Befundes zu überprüfen wurden dermale Fibroblasten aus PKC δ knock out Mäusen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, Src nach TPA-Stimulation zu aktivieren.

Dermale Fibroblasten aus PKC δ knock out Mäusen wurden mit TPA stimuliert und Src immunpräzipitiert. Als Kontrolle wurden Zellen der gleichen Linie aus wildtyp Mäusen verwendet.

Der Aktivitätsstatus von Src wurde mit Hilfe des src-pTyr(416) bestimmt.

Anhand von Abbildung 3.8.A ist zu erkennen, dass in den PKC δ knock out Zellen im Vergleich zum Wildtyp sowohl basale als auch die TPA-induzierte Src-Aktivität vermindert ist.

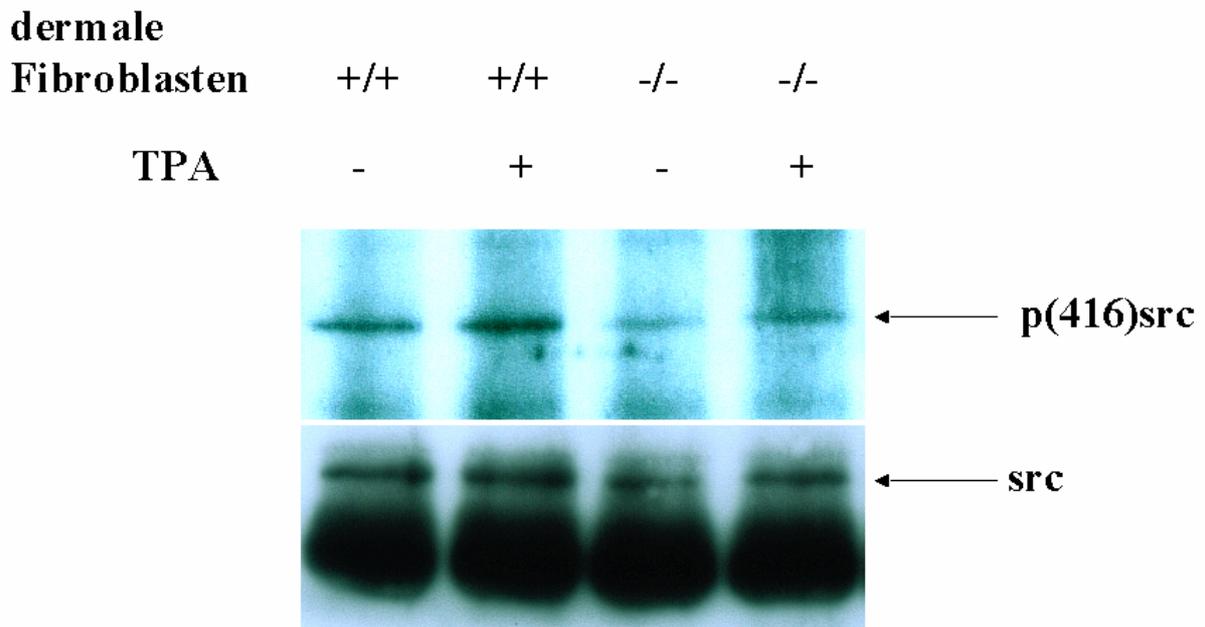


Abbildung 3.8.A: Dermale Fibroblasten aus PKC δ knock-out Mäusen zeigen eine verminderte Src-Aktivierung nach TPA-Stimulation. Src wurde aus dermalen Fibroblasten von PKC δ knock out- oder wildtyp-Mäusen vor und nach TPA-Stimulation immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden gelelektrophoretisch über eine SDS-PAGE getrennt und auf eine Nitrozellulose-Membran transferriert. Der Aktivitätsstatus von Src wurde mit Hilfe des Src pTyr(416)-spezifischen Antikörpers bestimmt. Als Kontrolle wurde die Gesamtmenge von Src in den Immunkomplexen mit dem Src-spezifischen Antikörper bestimmt.

4 Diskussion

In der hier vorliegenden Arbeit wurden große Teile der Signaltransduktionskaskade, die zur PKC-vermittelten Reorganisation des Zytoskeletts führen, aufgeklärt.

TPA-Stimulation führt in A7r5 Zellen zu einer kompletten Desintegration der Aktin-Stressfasern und zur Ausbildung von „ruffles“ in der Peripherie der Zelle.

Mittels des PKC-spezifischen Inhibitors GF109203X konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess von der Kinase-Funktion von PKC gesteuert wird.

Ferner konnte unter Verwendung des Translationsinhibitors Cycloheximide gezeigt werden, dass dieser Prozess ohne die Beteiligung des translationellen Apparates abläuft.

Der erste Schritt in der Signaltransduktionskaskade, die zur PKC-vermittelten Reorganisation des Zytoskeletts führt, besteht in der Aktivierung der Tyrosin-Kinase Src. Es konnte gezeigt werden, dass Src nach TPA-Stimulation eine robuste Aktivitätssteigerung erfährt, und dass diese Aktivierung notwendig für die PKC-induzierte Reorganisation des Zytoskeletts ist. Anhand von *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass PKC Src wahrscheinlich nicht direkt, sondern über die Protein Tyrosin Phosphatase PTP α aktiviert wird.

Src phosphoryliert und aktiviert in weiterer Folge das GTPase-aktivierende Protein p190RhoGap. Nach TPA-Stimulation ließ sich eine verstärkte Tyrosin-Phosphorylierung in p190RhoGap nachweisen. Mittels spezifischer Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Tyrosin-Phosphorylierung in p190 RhoGap über eine PKC-vermittelte Src-Aktivierung gesteuert wird.

Die Aktivität von p190RhoGap führt zu einer Aktivitätsverminderung von Rho.

Mit Hilfe von GST-Fusionproteinen, die spezifisch die aktive Konformation der „kleinen“ G-Proteine erkennen, wurde der Aktivitätsstatus von Rac, Rho und Cdc42 analysiert. Die Aktivität von Rac und Cdc42 verblieb im Verlauf der TPA-Stimulation konstant, während für Rho nach TPA-Stimulation eine signifikante Aktivitätsverminderung verzeichnet werden konnte.

Die verminderte Rho-Aktivität nach TPA-Stimulation führte zur Ausbildung eines Rac-ähnlichen Phänotyps: die Auflösung der Aktin-Stressfasern und die Ausbildung von protrusiven Strukturen („ruffles“) in der Peripherie der Zelle (siehe Abbildung 4).

Die einzelnen Schritte dieser Kaskade sollen im folgenden diskutiert werden.

PKC

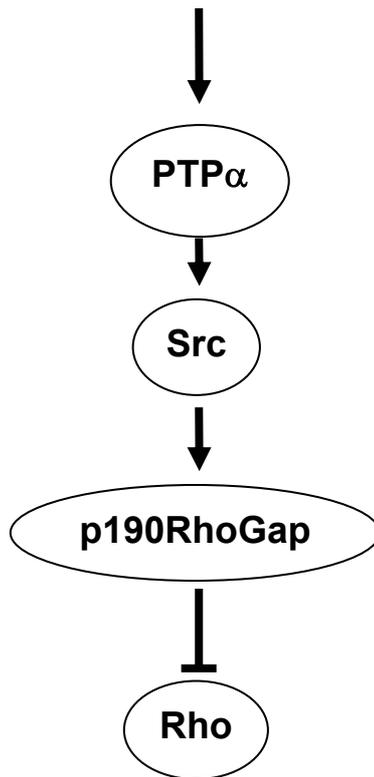


Abbildung 4: Schematische Repräsentation des Signaltransduktionweges der zur PKC-vermittelten Reorganisation des Zytoskeletts führt. Aktivierung von PKC führt zu einer Induktion der Kinase-Aktivität von Src (wahrscheinlich indirekt über $PTP\alpha$). Src phosphoryliert und aktiviert die GTPase-Aktivität von p190RhoGap, was mit einer Aktivitätsverminderung von Rho einhergeht. Die Aktivitätsverminderung von Rho wiederum führt zu einem Rac-ähnlichen Phänotyp: eine Desintegration der Aktin-Stressfasern und die Bildung von „ruffles“ in der Peripherie der Zelle.

4.1 Zum Mechanismus der PKC-vermittelten Src-Aktivierung

Anhand der Daten dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der erste Schritt der Signaltransduktionskaskade die zur TPA-induzierten Reorganisation der Zytoskeletts führt, in einer PKC-vermittelten Src-Aktivierung und Induktion von Tyrosin-Phosphorylierung liegt. Es konnte ein deutlicher TPA-abhängiger Anstieg der Tyrosin-Phosphorylierung im Allgemeinen und Src-Aktivität im Speziellen gezeigt werden. Durch Verwendung des Src-spezifischen Inhibitors und durch Verwendung eines Kinase inaktiven Src-Konstrukts wurde gezeigt, dass die Kinase-Aktivität von

Src notwendig für die PKC-vermittelte Aktin-Reorganisation ist. Obwohl die Induktion von Tyrosin-Phosphorylierung im Allgemeinen und Src im Speziellen nach TPA-Stimulation in zahlreichen anderen zellulären Systemen beschrieben wurde (Bruce-Staskal and Bouton, 2001; Borowski et al., 1999; Emkey and Kahn, 1997a; Emkey and Kahn, 1997b; Fagerstrom et al., 1998; Gilmore and Martin, 1983) blieb die zentrale Funktion im Bezug auf die Reorganisation des Zytoskeletts bislang unentdeckt. Der molekulare Mechanismus der Src-Aktivierung blieb aber bislang unbekannt.

Es lassen sich in der Literatur widersprüchliche Befunde in Hinblick darauf, ob PKC Src direkt oder indirekt aktivieren kann, finden. Bereits 1985 wurde von Gould et al. (1985) eine Phosphorylierungsstelle in Src charakterisiert (Ser-12), die PKC-abhängig phosphoryliert wird. Die Phosphorylierung an dieser Serin-Seitenketten *in vitro* blieb aber in Hinblick auf die Src-Aktivität ohne Konsequenz. Später wurde von Moyers et al. (1993) publiziert, dass es zwei PKC-abhängige Phosphorylierungsstellen in Src gibt (Ser-12 und Ser-48). Anhand von Mutanten, bei denen diese beiden Phosphorylierungsstellen ausgetauscht wurden, konnte gezeigt werden, dass diese Phosphorylierungsstellen notwendig für eine verstärkte Responsivität nach Stimulation mit β -adrenergen Agonisten in Src-überexprimierenden Zellen waren. Nachdem jedoch zuvor gezeigt wurde, dass die PKC-abhängige Phosphorylierung ohne Konsequenz für die Src-Aktivität war, scheint diese Phosphorylierung eher eine Art „fine-tuning“ Mechanismus als eine direkte Aktivierung darzustellen. Erst kürzlich wurde von Cabodi et al. (2000) berichtet, dass PKC η und Fyn, ein Mitglied der Src-Familie, *in vivo* in einem Komplex vorliegen, und dass eine PKC η -abhängige Fyn-Aktivierung für den Wachstumarrest und die Differenzierung von Keratinozyten verantwortlich sei. Hier konnte zwar gezeigt werden, dass rekombinantes PKC η Fyn *in vitro* aktivieren kann, es wurde aber kein Modell für die Situation *in vivo* vorgeschlagen.

Das im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelte Modell für die PKC-vermittelte Src-Aktivierung geht von einem indirekten Mechanismus, über die Aktivierung der Protein Tyrosin Phosphatase PTP α , aus. PTP α wurde in mehreren Studien als physiologischer Regulator von Src beschrieben (Zheng et al., 2000; Harder et al., 1998). Diese Phosphatase dephosphoryliert Src an Tyrosin 527 und erlaubt dem Protein so eine aktivierende Autophosphorylierung an Tyr 416 zu vollziehen. Zudem wurde in PTP α zwei Phosphorylierungsstellen charakterisiert (Ser-184/204), die *in*

vivo und *in vitro* PKC-abhängig phosphoryliert werden (Tracy et al., 1995). In einer anderen Studie konnte von den Hertog et al. (1995b) darüber hinaus gezeigt werden, dass die Phosphatase-Aktivität von PTP α nach TPA-Stimulation einen deutlichen Anstieg erfährt. Die Bedeutung der PKC-abhängigen Modulation von PTP α konnte kürzlich von Zheng et al. (2002) *in vivo* aufgezeigt werden: Expression einer Mutante, bei der die beiden PKC-abhängigen Serin-Phosphorylierungsstellen in PTP α gegen Alanin ausgetauscht wurden (S184A, S204A), verhindert eine Src-Aktivierung im Zuge der Mitose.

Nach dem die Enzympräparation, die von Tracy et al. (1995) für die *in vitro* Phosphorylierungs-Experimente verwendet wurde, nur partiell aufgereinigt war, war die Frage nach einer direkten oder indirekten Beteiligung von PKC bei der Regulation von PTP α noch offen. Anhand der in dieser Arbeit aufgeführten Daten, konnte jedoch diese Frage eindeutig beantwortet werden. Anhand von *in vitro* Experimenten mit rekombinanten PKC-Isoenzymen aus Insekten Zellen wurde gezeigt, dass PTP α spezifisch von PKC δ phosphoryliert und aktiviert wird. Die Aktivitätssteigerung konnte sowohl gegenüber pNPP als unspezifisches Substrat als auch gegenüber Src, einem physiologischen Substrat der Phosphatase, dargestellt werden. Anhand dieser Experimente wurde klar gezeigt, dass die Aktivierung von PTP α durch PKC δ direkt und ohne die Beteiligung von anderen Proteinen abläuft. Damit konnte auch zum ersten Mal gezeigt werden, dass PTP α sowohl aus TPA-stimulierten Zellen, als auch durch PKC-Isoenzyme phosphoryliert, dazu befähigt ist, Src zu aktivieren. Zudem konnte sowohl eine verminderte basale als auch induzierte Src-Aktivität in dermalen Fibroblasten aus PKC δ -defizienten Mäusen nachgewiesen werden, was nochmals die wichtige Rolle von PKC δ bei der Src-Aktivierung unterstreicht.

Gestützt werden sie Daten zusätzlich von der Beobachtung von Stetak et al. (2001), wo gezeigt werden konnte, dass PKC δ und PTP α *in vivo* in einem Komplex vorliegen. Nachdem auch zwischen Src und PKC δ Komplexbildung beschrieben wurde (Shanmugam et al., 1998; Chang et al., 2001; Zang et al., 1997) liegt die Vermutung nahe, dass diese Proteine *in vivo* einen Signalkomplex bilden könnten, wie er bereits für einige MAP-Kinasen postuliert wurde (Raabe and Rapp, 2002; Nguyen et al., 2002)

Somit lassen sich die Ergebnisse dieser Doktorarbeit in das von Zengh et al. (2002) postulierte Modell einfügen: Nach diesem Modell liegt PTP α im inaktiven Zustand konstitutiv phosphoryliert an Tyrosin 798 in einem Komplex mit Grb2 vor. Nach PKC-Aktivierung wird PTP α an Serin 184 und 204 phosphoryliert, was mit einer konformationellen Änderung in PTP α einhergeht. Die Bindung zu Grb2 wird dadurch gelöst und statt dessen die SH2-Domäne von Src gebunden. Diese Interaktion hält die Konformation von Src offen und ermöglicht die Dephosphorylierung von Tyrosin 527 am äußeren C-terminus von Src. Die Dephosphorylierung dieses Tyrosin-Restes ermöglicht die Auto-Phosphorylierung an Tyrosin 416, die in dieser Arbeit als Indikator für die Aktivität von Src verwendet wurde.

Damit konnte im Rahmen dieser Promotionarbeit ein wesentlicher Aspekt der Signaltransduktion von PKC aufgeklärt werden.

4.2 Über p190RhoGap

Die Daten implizieren, dass die Reduktion der Rho-Aktivität über eine Src-vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung und damit Aktivierung von p190RhoGap, gesteuert wird, wie es bereits von anderen Wissenschaftlern zuvor beschrieben wurde (Fincham et al., 1999; Ellis et al., 1990; Brouns et al., 2001; Roof et al., 1998). Erste Hinweise für eine Beteiligung von p190RhoGap wurden aus zwei unterschiedlichen Publikationen entnommen. In beiden Publikationen wurde eine TPA-induzierte Phosphorylierung von p190RhoGap beschrieben. Cheng et al. (1995) beschrieb eine TPA-induzierte Zunahme an Tyrosin-Phosphorylierung in p190RhoGap, was sich konsistent mit den Daten der hier vorgelegten Arbeit verhält. Zudem konnte von Brouns et al. (2000) anhand von *in vivo* Markierungsexperimenten gezeigt werden, dass p190RhoGap nach TPA-Stimulation phosphoryliert wird. Hierbei wurde nicht zwischen Tyrosin-, Serin- oder Threonin-Phosphorylierung differenziert.

Ferner konnte von Vincent und Settleman (1999) gezeigt werden, dass die Inhibition der Aktivität von p190RhoGap ausreichend für die Bildung Rho-abhängiger Strukturen ist. Anhand dieser Arbeit konnte die Wichtigkeit von p190RhoGap für die Regulation Rho-abhängiger Signaltransduktions Prozesse aufgezeigt werden.

Zusätzlich zur Zunahme an phosphorylierten Tyrosin in p190RhoGap konnte eine Zunahme der Ras-Aktivität, mittels Aktivitäts-spezifisch bindender Proteine, nach TPA-Stimulation verzeichnet werden (nicht gezeigte Daten), was die Beteiligung von

p190RhoGap nochmals unterstreicht. P190RhoGap bindet nach Tyrosin-Phosphorylierung p120RasGap (Roof et al., 1998). Die Assoziation zwischen den beiden Proteinen resultiert in einer Reduzierten RasGap-Aktivität, was mit einer Zunahme an aktiven GTP gebundenen Ras einhergeht (Chang et al., 1993; Moran et al., 1991).

Es konnte zwar eine deutliche Inhibition der TPA-induzierten Aktin-Reorganisation durch die Anwesenheit von PP2 gezeigt werden. Diese jedoch war speziell in der späteren Phase der TPA-Stimulation nicht vollständig. Da es keinen Hinweis auf eine unvollständige Inhibition von Src gab, lag die Vermutung nahe, dass es noch andere Mechanismen in der Zelle geben muß, die die Aktivität von p190RhoGap regulieren. Dies war in guter Übereinstimmung mit einer kürzlich publizierten Arbeit über die Regulation von p190RhoGap. Haskell et al. (2001) konnte zeigen, dass die Phosphorylierung an Tyrosin 1105 in p190RhoGap durch Src notwendig aber nicht ausreichend für eine EGF-induzierte Desintegration der Stressfasern ist. Die Autoren dieser Arbeit schlugen ein Modell vor, nach dem ein zweites, EGF-induziertes, Signal, neben der Src-abhängigen Phosphorylierung, für die Aktivierung von p190RhoGap notwendig ist. In früheren Studien konnte bereits gezeigt werden, dass p190RhoGap ebenfalls an Serin-Seitenketten phosphoryliert wird (Roof et al., 1998; Ellis et al., 1990). Die physiologische Relevanz dieser Phosphorylierung konnte aber bisher nicht aufgeklärt werden. Roof et al. (1998) konnte zwar zeigen, dass diese Serin-Phosphorylierung ohne Effekt für die Assoziation mit p120RasGap *in vitro* war, *in vivo* Daten in Hinblick auf diese Phosphorylierung liegen zur Zeit aber nicht vor. Diese Phosphorylierung könnte aber das fehlende Glied in der Regulation von p190RhoGap sein, und erklären, warum der Src-spezifische Inhibitor die TPA-vermittelten Effekte speziell im späteren Verlauf der Stimulation nur unvollständig inhibiert. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde daher ein Modell vorgeschlagen, nach dem PKC direkt oder indirekt für die Serin-Phosphorylierung von p190RhoGap verantwortlich ist. Diese Phosphorylierung könnte eine Art „fine-tuning“ Mechanismus in der Regulation von p190RhoGap darstellen.

Eine basale Tyrosin-Phosphorylierung von p190RhoGap könnte erklären, warum eine leichte Reduktion der Rho-Aktivität in den „pull-down“ Experimenten und die Bildung „dorsaler microruffles“ in den morphologische Studien nach 2h TPA-Stimulation trotz der Präsenz von PP2 zu beobachten war. Die Experimente wurden

mit Zellen durchgeführt, die im Komplett-Medium gehalten wurden. Daher könnte ein kleiner Anteil an p190RhoGap-Molekülen durch die Anwesenheit von Wachstumsfaktoren bereits an Tyrosin 1105 phosphoryliert vorgelegen haben und durch das PKC-Signal in einen aktiven Zustand versetzt worden sein.

Ein detaillierteres Modell für die Regulation von p190RhoGap muß das Ziel zukünftiger Studien sein.

4.3 PKC und Rho

Der finale Schritt der PKC/Src-vermittelten Reorganisation besteht in der Desintegration der Aktin Stressfasern und der Bildung motiler Strukturen, s.g. ruffles, in der Peripherie der Zelle. Die Bildung von ruffles wird im allgemeinen der Aktivität von Rac zugesprochen und sollte daher mit einer Aktivierung von Rac einhergehen. Anhand der Analyse des Aktivitätsstatus der kleinen G-Proteine konnte aber gezeigt werden, dass die Aktivität von Rac und Cdc42 im Verlauf der TPA-Stimulation konstant bleibt, die Aktivität von Rho hingegen eine dramatische Reduktion erfährt. Bereits nach 30min ließ sich diese Aktivitätsverminderung von Rho nachweisen. Dies ging einher mit der beginnenden Auflösung der Stressfasern und der Bildung von ruffles in einigen Zellen. An späteren Zeitpunkten konnte eine Reduktion der Rho-Aktivität um ca 80% dargestellt werden. Reflektiert wurde diese massive Reduktion durch die nahezu vollständige Desintegration der Aktin Stressfasern nach 2h TPA-Stimulation. Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass auch ohne direkte Aktivierung von Rac, Rac-abhängige Strukturen gebildet werden können. Daher wurde ein Modell aufgestellt, nach dem die Dynamik des Aktin Zytoskeletts eher über die Balance der Aktivität der kleinen G-Proteine als über die absolute Aktivität derselben gesteuert wird.

Die zentrale Rolle von Rho in der PKC-vermittelten Aktinreorganisation wurde ferner durch die Verwendung eines konstitutiv-aktiven Rho-Konstrukts (RhoV14) unterstützt. Die Expression dieses Proteins, das sich nicht mehr durch die Aktivität von p190RhoGap regulieren läßt, inhibiert vollständig die TPA-induzierte Desintegration der Stressfasern und somit auch die Bildung von „ruffles“.

4.4 Über die PKC-vermittelte Reorganisation des Zytoskeletts

Eine TPA-induzierte Reorganisation wurde bereits von anderen Wissenschaftlern in unterschiedlichen Zell-Linien beschrieben (Lin et al., 1996; Roger et al., 1989; Vouret-Craviari et al., 1998; Arber et al., 1998; Kam and Exton, 2001; Imamura et al., 1998). In all diesen Publikationen wurde eine TPA-abhängige Desintegration der Aktin-Stressfasern und die Bildung von „ruffles“ beschrieben, der Mechanismus, nach dem dieser Prozess abläuft, wurde jedoch nicht aufgeklärt. Tatsächlich konnte im Zuge der Anfertigung dieser Arbeit anhand der humanen Endothel-Zell-Linie ECV304 aufgezeigt werden, dass hier die TPA-induzierte Reorganisation des Zytoskeletts nach genau dem gleichen Mechanismus abläuft wie in A7r5 Zellen (nicht gezeigte Daten). Ebenfalls konnte an MDCK Zellen anhand von morphologischen Befunden durch die Verwendung spezifischer Inhibitoren gezeigt werden, dass die PKC-abhängige Reorganisation des Zytoskeletts ebenfalls über Src gesteuert wird (nicht gezeigte Daten). Eine TPA-vermittelte Auflösung von Aktin-Stressfasern wurde auch von Arber et al. (1998) in 3T3 Fibroblasten beobachtet. Hier wurde gezeigt, dass die Administration von TPA zu einer Inhibition von LIMK-1 und damit zur verminderten Phosphorylierung von Cofilin führt. Cofilin ist ein Aktin-Filament depolymerisierendes Protein (Aizawa et al., 1996), dessen Aktivität negativ durch die Phosphorylierung von LIMK-1/2 reguliert wird (Sumi et al., 1999). Die Aktivität von LIMK-1/2 wiederum wird über eine ROCK-abhängige Phosphorylierung positiv reguliert (Sumi et al., 2001) (siehe Einleitung).

Die verminderte Phosphorylierung von Cofilin kann also mit einer Aktivitätsverminderung von Rho in Zusammenhang gebracht werden, was sich ebenfalls konsistent mit den Daten dieser Arbeit verhält. Dies lässt die Vermutung zu, dass die PKC-vermittelte Aktin Reorganisation ein generelles Phänomen und nicht alleine auf A7r5 Zellen beschränkt ist.

4.5 Über die Rolle von PKC bei der Migration

In dieser Arbeit wurde die Signaltransduktionskaskade, die zur PKC-vermittelten Reorganisation des Zytoskeletts führt, aufgeklärt. Im folgenden soll die Relevanz dieser Signaltransduktionskaskade im Zusammenhang mit einem komplexeren Phänomen, der Migration von Zellen, diskutiert werden.

Physiologisch spielt die Migration eine wichtige Rolle in der Ontogenese, in der Immunologie und Wundheilung aber auch in der Tumorgenese, weshalb die Aufklärung der Signaltransduktionsprozesse eine wichtige Voraussetzung für die Entwicklung therapeutischer Strategien darstellen könnte.

Im Zuge der Migration von Zellen findet eine komplexe Abfolge von Signaltransduktionprozessen ab, die in letzter Konsequenz dazu führen, dass die Zelle etablierte Kontakte zur extrazellulären Matrix löst, ihre Lokalisation verändert und an einer anderen Stelle neue Kontakte zur extrazellulären Matrix aufbaut.

Neben der gerichteten Sekretion (für die Bereitstellung neuer Membran-Komponenten), dem Auf-und Abbau von Zellmatrix-Kontakten (um die Adhesion zu kontrollieren) und der Änderung der Gene-Transkription (für die Bereitstellung von autocrinen und paracrinen Signalen) (Lauffenburger and Horwitz, 1996; Mitchison and Cramer, 1996), kommt vor allem der dynamischen Regulation des Aktin-Zytoskeletts, dem koordinierten Auf-und Abbau von Aktinfilamenten, eine wichtige Komponente bei dem Migrationprozess zu.

Anhand von vorläufigen Experimenten konnte gezeigt werden, dass die LPA-induzierte Migration von Endothel-Zellen im „wounding-assay“ durch die Anwesenheit von GF-109203X deutlich inhibiert werden kann. Ähnliche Befunde ließen sich mit dem Src-spezifischen Inhibitor PP2 erzielen. Es wurde daher postuliert, dass bei der LPA-induzierten Migration von Endothel Zellen ebenfalls eine PKC-vermittelte Src-Aktivierung und damit Modulation der Rho-Aktivität eine Rolle spielen könnte.

Gestützt wird das Postulat durch die folgende Befunde:

1. Nach LPA-Stimulation findet eine Reorganisation des Zytoskeletts statt: Auflösung der zentralen Stressfasern und Bildung von „ruffles“ in der Peripherie der Zelle. Diese Reorganisation kann durch Vorinkubation mit GF-109203X inhibiert werden.

Nach LPA-Stimulation läßt sich in diesen Zellen eine deutliche Induktion der Src Kinase-Aktivität nachweisen. Dieser Effekt kann durch Vorinkubation der Zellen in GF-109203X deutlich inhibiert werden.

2. Ferner wurde die Aktivität von Rho über eine 8-stündigen Stimulation analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Rho-Aktivität einen oszillierenden Aktivitätsverlauf nach LPA-Stimulation einnimmt. Die Aktivität ist nach 15min stark erhöht, fällt nach 30min auf ein niedrigeres Niveau und steigt dann wieder an. Administration von GF-109203X vor LPA-Stimulation verhinderte den oszillierenden

Aktivitätsverlauf: Die Rho-Aktivität zeigte dauerhaft ein sehr hohes Niveau. Die Aktivität von Rac und Cdc42 wiederum verblieb konstant im Verlauf der Stimulation.

3. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die stabile Überexpression eines konstitutiv-aktiven Src-Konstrukts (Src Y527F) diese Zellen selbst in Gegenwart des PKC-spezifischen Inhibitors GF-109203X nach LPA-Stimulation migrieren läßt.

4. Nachdem gezeigt werden konnte, dass spezifisch PKC δ über PTP α für die Modulation der Src-Aktivität verantwortlich ist, wurden dermale Fibroblasten aus PKC δ knock-out Mäusen im „wounding-assay“ nach LPA-Stimulation analysiert. Während die wildtyp-Zellen aus den Kontroll-Mäusen die Wunde im Zellverband schließen konnten, waren die knock-out Zellen dazu nicht befähigt, was wiederum die wichtige Rolle der PKC-vermittelten Src-Aktivierung im Migrationsgeschehen unterstreicht.

Bisher wurde die Rolle von PKC im Rahmen des Migrationsgeschehens ausschließlich im Zusammenhang mit der Modulation der Integrin-abhängigen Signaltransduktion diskutiert (Ivaska et al., 2002; Parsons et al., 2002; Ng et al., 1999; Podar et al., 2002). Ferner konnte den atypischen PKC-Isoenzymen über die Bindung von Cdc42 über Proteine der PAR-Familie eine wichtige Funktion im Zusammenhang mit einer gerichteten Migration zugesprochen werden (Etienne-Manneville and Hall, 2001; Lin et al., 2000).

Eine PKC-abhängige Reorganisation wurde im Zusammenhang mit Migration bisher nicht diskutiert. Die oben diskutierten Ergebnisse lassen aber den Schluss zu, dass eine PKC-vermittelte (wahrscheinlich PKC δ) Src-Aktivierung, und darüber die Modulation der Rho-Aktivität, ein wichtiger Aspekt im Zuge der Migration von Endothel Zellen ist. Eine genauere Analyse des Phänomens steht noch aus.

Abschließend kann gesagt werden, dass in der hier vorgelegten Arbeit die Signaltransduktionskaskade der PKC-induzierten Aktin-Reorganisation aufgeklärt wurde. In weiterer Folge konnte die physiologische Relevanz dieser Entdeckung im Rahmen der Migration aufgezeigt werden.

Zusammenfassung

TPA-Stimulation führt in einer Vielzahl von unterschiedlichen Zelltypen zu einer kompletten Desintegration der Aktin-Stressfasern und zur Ausbildung von „ruffles“ in der Peripherie der Zelle. Dieses Phänomen aber vor allem die Aufklärung der Signaltransduktionskaskade, über die dieser Vorgang gesteuert wird, war die Grundlage dieser Arbeit.

Unter Zuhilfenahme spezifischer Inhibitoren konnte gezeigt werden, daß die TPA-induzierte Reorganisation des Zytoskeletts von der Kinase-Aktivität von PKC und ohne die Beteiligung des Translationellen Apparates abläuft.

Es konnte ferner gezeigt werden, dass der erste Schritt in der Signaltransduktionskaskade, die zur PKC-vermittelten Reorganisation des Zytoskeletts führt, in der Aktivierung der Tyrosin-Kinase Src besteht. Unter Verwendung spezifischer Inhibitoren und eines Kinase-inaktiven Src-Konstrukts konnte gezeigt werden, dass die Src-Aktivität notwendig für die PKC-induzierte Reorganisation des Zytoskeletts ist. Anhand von *in vitro* Experimenten konnte gezeigt werden, dass PKC Src wahrscheinlich nicht direkt, sondern über die Protein Tyrosin Phosphatase PTP α aktiviert wird.

Src phosphoryliert und aktiviert in weiterer Folge das GTPase-aktivierende Protein p190RhoGap. Nach TPA-Stimulation ließ sich eine verstärkte Tyrosin-Phosphorylierung in p190RhoGap nachweisen. Mittels spezifischer Inhibitoren konnte gezeigt werden, dass die vermehrte Tyrosin-Phosphorylierung in p190 RhoGap über eine PKC-vermittelte Src-Aktivierung gesteuert wird.

Die Aktivität von p190RhoGap führt zu einer Aktivitätsverminderung von Rho.

Mit Hilfe von GST-Fusionproteinen, die spezifisch die aktive Konformation der „kleinen“ G-Proteine erkennt wurde der Aktivitätsstatus von Rac, Rho und Cdc42 analysiert. Die Aktivität von Rac und Cdc42 verblieb im Verlauf der TPA-Stimulation konstant, während für Rho nach TPA-Stimulation eine signifikante Aktivitätsverminderung verzeichnet werden konnte.

Die verminderte Rho-Aktivität nach TPA-Stimulation führte zur Ausbildung eines Rac-ähnlichen Phänotyps: die Auflösung der Aktin-Stressfasern und die Ausbildung von protrusiven Strukturen („ruffles“) in der Peripherie der Zelle.

Literaturverzeichnis

Adams,J.C., Clelland,J.D., Collett,G.D., Matsumura,F., Yamashiro,S., and Zhang,L. (1999). Cell-matrix adhesions differentially regulate fascin phosphorylation. *Mol. Biol. Cell.* 10, 4177-90.Boquet I, et al.

Ahmed,S., Lee,J., Kozma,R., Best,A., Monfries,C., and Lim,L. (1993). A novel functional target for tumor-promoting phorbol esters and lysophosphatidic acid. The p21rac-GTPase activating protein n-chimaerin. *J. Biol. Chem.* 268, 10709-10712.

Aihara,H., Asaoka,Y., Yoshida,K., and Nishizuka,Y. (1991). Sustained activation of protein kinase C is essential to HL-60 cell differentiation to macrophage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 88, 11062-11066.

Aizawa,H., Sutoh,K., and Yahara,I. (1996). Overexpression of cofilin stimulates bundling of actin filaments, membrane ruffling, and cell movement in Dictyostelium. *J. Cell Biol.* 132, 335-344.

Akimoto,K., Mizuno,K., Osada,S., Hirai,S., Tanuma,S., Suzuki,K., and Ohno,S. (1994). A new member of the third class in the protein kinase C family, PKC lambda, expressed dominantly in an undifferentiated mouse embryonal carcinoma cell line and also in many tissues and cells. *J. Biol. Chem.* 269, 12677-12683.

Allen,L.A. and Aderem,A. (1995). Protein kinase C regulates MARCKS cycling between the plasma membrane and lysosomes in fibroblasts. *EMBO J.* 14, 1109-1120.

Amano,M., Ito,M., Kimura,K., Fukata,Y., Chihara,K., Nakano,T., Matsuura,Y., and Kaibuchi,K. (1996). Phosphorylation and activation of myosin by Rho-associated kinase (Rho- kinase). *J. Biol. Chem.* 271, 20246-20249.

Arber,S., Barbayannis,F.A., Hanser,H., Schneider,C., Stanyon,C.A., Bernard,O., and Caroni,P. (1998). Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM- kinase. *Nature* 393, 805-809.

Arcaro,A. (1998). The small GTP-binding protein Rac promotes the dissociation of gelsolin from actin filaments in neutrophils. *J. Biol. Chem.* 273, 805-813.

Arnold,T.P., Standaert,M.L., Hernandez,H., Watson,J., Mischak,H., Kazanietz,M.G., Zhao,L., Cooper,D.R., and Farese,R.V. (1993). Effects of insulin and phorbol esters on MARCKS (myristoylated alanine- rich C-kinase substrate) phosphorylation (and other parameters of protein kinase C activation) in rat adipocytes, rat soleus muscle and BC3H-1 myocytes. *Biochem. J.* 295 (Pt 1), 155-164.

Arthur,W.T., Petch,L.A., and Burridge,K. (2000). Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src-dependent mechanism. *Curr. Biol.* 10, 719-722.

Arthur,W.T., Petch,L.A., and Burridge,K. (2001). Integrin engagement suppresses RhoA activity via a c-Src- dependent mechanism. *Curr. Biol.* 2000. Jun. 15;10(12):719-22. 10, 719-22.

Aspenstrom,P. (1999). Effectors for the Rho GTPases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11, 95-102.

Azuma,T., Witke,W., Stossel,T.P., Hartwig,J.H., and Kwiatkowski,D.J. (1998). Gelsolin is a downstream effector of rac for fibroblast motility. *EMBO. J.* 17, 1362-70.

Azzi,A., Boscoboinik,D., and Hensey,C. (1992). The protein kinase C family. *Eur. J. Biochem.* 208, 547-557.

Bagrodia,S., Taylor,S.J., Creasy,C.L., Chernoff,J., and Cerione,R.A. (1995). Identification of a mouse p21Cdc42/Rac activated kinase. *J. Biol. Chem.* 270, 22731-22737.

Bar-Sagi,D. and Hall,A. (2000). Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell* 103, 227-238.

Bassini,A., Zauli,G., Migliaccio,G., Migliaccio,A.R., Pascuccio,M., Pierpaoli,S., Guidotti,L., Capitani,S., and Vitale,M. (1999). Lineage-restricted expression of protein kinase C isoforms in hematopoiesis. *Blood* 93, 1178-1188.

Belham,C., Wu,S., and Avruch,J. (1999). Intracellular signalling: PDK1--a kinase at the hub of things. *Curr. Biol.* 9, R93-R96.

Berra,E., Diaz-Meco,M.T., Dominguez,I., Municio,M.M., Sanz,L., Lozano,J., Chapkin,R.S., and Moscat,J. (1993). Protein kinase C zeta isoform is critical for mitogenic signal transduction. *Cell* 74, 555-563.

Beug,H., Claviez,M., Jockusch,B.M., and Graf,T. (1978). Differential expression of Rous Sarcoma virus-specific transformation parameters in enucleated cells. *Cell* 14, 843-856.

Blackshear,P.J. (1993). The MARCKS family of cellular protein kinase C substrates. *J. Biol. Chem.* 268, 1501-1504.

Blackshear,P.J., Haupt,D.M., and Stumpo,D.J. (1991). Insulin activation of protein kinase C: a reassessment. *J. Biol. Chem.* 266 , 10946-10952.

Borowski,P., Roloff,S., Medem,S., Kuhl,R., and Laufs,R. (1999). Protein kinase C- α produces reciprocal effects on the phorbol ester stimulated tyrosine phosphorylation of a 50 kDa kinase in Jurkat cells. *Biol. Chem.* 380, 403-412.

Brouns,M.R., Matheson,S.F., Hu,K.Q., Delalle,I., Caviness,V.S., Silver,J., Bronson,R.T., and Settleman,J. (2000). The adhesion signaling molecule p190 RhoGAP is required for morphogenetic processes in neural development. *Development* 127, 4891-4903.

Brouns,M.R., Matheson,S.F., and Settleman,J. (2001). p190 RhoGAP is the principal Src substrate in brain and regulates axon outgrowth, guidance and fasciculation. *Nat. Cell Biol.* 3, 361-367.

Brown,J.L., Stowers,L., Baer,M., Trejo,J., Coughlin,S., and Chant,J. (1996). Human Ste20 homologue hPAK1 links GTPases to the JNK MAP kinase pathway. *Curr. Biol.* 6, 598-605.

Bruce-Stackal,P.J. and Bouton,A.H. (2001). PKC-dependent activation of FAK and src induces tyrosine phosphorylation of Cas and formation of Cas-Crk complexes. *Exp. Cell. Res.* 2001. Apr. 1;264(2):296-306. 264 , 296-306.

Cabodi,S., Calautti,E., Talora,C., Kuroki,T., Stein,P.L., and Dotto,G.P. (2000). A PKC- η /Fyn-dependent pathway leading to keratinocyte growth arrest and differentiation. *Mol. Cell* 6, 1121-1129.

Caloca,M.J., Wang,H., Delemos,A., Wang,S., and Kazanietz,M.G. (2001). Phorbol esters and related analogs regulate the subcellular localization of beta 2-chimaerin, a non-protein kinase C phorbol ester receptor. *J. Biol. Chem.* 276, 18303-18312.

Castagna,M., Takai,Y., Kaibuchi,K., Sano,K., Kikkawa,U., and Nishizuka,Y. (1982). Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 257, 7847-7851.

Chang,B.Y., Chiang,M., and Cartwright,C.A. (2001). The interaction of Src and RACK1 is enhanced by activation of protein kinase C and tyrosine phosphorylation of RACK1. *J. Biol. Chem.* 276, 20346-20356.

Chang,J.H., Gill,S., Settleman,J., and Parsons,S.J. (1995). c-Src regulates the simultaneous rearrangement of actin cytoskeleton, p190RhoGAP, and p120RasGAP following epidermal growth factor stimulation. *J. Cell Biol.* 130, 355-368.

Chang,J.H., Wilson,L.K., Moyers,J.S., Zhang,K., and Parsons,S.J. (1993). Increased levels of p21ras-GTP and enhanced DNA synthesis accompany elevated tyrosyl phosphorylation of GAP-associated proteins, p190 and p62, in c-src overexpressors. *Oncogene* 8, 959-967.

Cheng,J.C., Frackelton,A.R., Jr., Bearer,E.L., Kumar,P.S., Kannan,B., Santos-Moore,A., Rifai,A., Settleman,J., and Clark,J.W. (1995). Changes in tyrosine-phosphorylated p190 and its association with p120 type I and p100 type II rasGAPs during myelomonocytic differentiation of human leukemic cells. *Cell Growth Differ.* 6, 139-148.

Chou,M.M., Hou,W., Johnson,J., Graham,L.K., Lee,M.H., Chen,C.S., Newton,A.C., Schaffhausen,B.S., and Toker,A. (1998). Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr. Biol.* 8, 1069-1077.

Coghlan,M.P., Chou,M.M., and Carpenter,C.L. (2000). Atypical protein kinases Clambda and -zeta associate with the GTP- binding protein Cdc42 and mediate stress fiber loss. *Mol. Cell Biol.* 20, 2880-2889.

Coso,O.A., Chiariello,M., Yu,J.C., Teramoto,H., Crespo,P., Xu,N., Miki,T., and Gutkind,J.S. (1995). The small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 regulate the activity of the JNK/SAPK signaling pathway. *Cell* 81, 1137-1146.

Coso,O.A., Teramoto,H., Simonds,W.F., and Gutkind,J.S. (1996). Signaling from G protein-coupled receptors to c-Jun kinase involves beta gamma subunits of

heterotrimeric G proteins acting on a Ras and Rac1-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* 271, 3963-3966.

Courtneidge, S.A., Fumagalli, S., Koegl, M., Superti-Furga, G., and Twamley-Stein, G.M. (1993). The Src family of protein tyrosine kinases: regulation and functions. *Dev. Suppl* 57-64.

D'Souza-Schorey, C., Boshans, R.L., McDonough, M., Stahl, P.D., and Van Aelst, L. (1997). A role for POR1, a Rac1-interacting protein, in ARF6-mediated cytoskeletal rearrangements. *EMBO J.* 16, 5445-5454.

Dan, C., Kelly, A., Bernard, O., and Minden, A. (2001). Cytoskeletal changes regulated by the PAK4 serine/threonine kinase are mediated by LIM kinase 1 and cofilin. *J. Biol. Chem.* 276, 32115-32121.

den Hertog, J., Sap, J., Pals, C.E., Schlessinger, J., and Kruijer, W. (1995b). Stimulation of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha activity and phosphorylation by phorbol ester. *Cell Growth Differ.* 6, 303-307.

den Hertog, J., Sap, J., Pals, C.E., Schlessinger, J., and Kruijer, W. (1995a). Stimulation of receptor protein-tyrosine phosphatase alpha activity and phosphorylation by phorbol ester. *Cell Growth Differ.* 6, 303-307.

Denning, M.F., Kazanietz, M.G., Blumberg, P.M., and Yuspa, S.H. (1995). Cholesterol sulfate activates multiple protein kinase C isoenzymes and induces granular cell differentiation in cultured murine keratinocytes. *Cell Growth Differ.* 6, 1619-1626.

Derman, M.P., Toker, A., Hartwig, J.H., Spokes, K., Falck, J.R., Chen, C.S., Cantley, L.C., and Cantley, L.G. (1997). The lipid products of phosphoinositide 3-kinase increase cell motility through protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 272, 6465-6470.

Deshpande, R.V., Peterson, R.H., and Moore, M.A. (1997). Granulocyte colony-stimulating factor-induced activation of protein kinase-C in myeloid cells. *J. Cell Biochem.* 66, 286-296.

Dlugosz, A.A., Mischak, H., Mushinski, J.F., and Yuspa, S.H. (1992). Transcripts encoding protein kinase C-alpha, -delta, -epsilon, -zeta, and -eta are expressed in

basal and differentiating mouse keratinocytes in vitro and exhibit quantitative changes in neoplastic cells. *Mol. Carcinog.* 5, 286-292.

Downing, J.E. and Role, L.W. (1987). Activators of protein kinase C enhance acetylcholine receptor desensitization in sympathetic ganglion neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 84, 7739-7743.

Dumenil, G., Sansonetti, P., and Tran, V.N. (2000). Src tyrosine kinase activity down-regulates Rho-dependent responses during *Shigella* entry into epithelial cells and stress fibre formation. *J. Cell Sci.* 113 (Pt 1), 71-80.

Dutil, E.M., Toker, A., and Newton, A.C. (1998). Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr. Biol.* 8, 1366-1375.

Ebinu, J.O., Bottorff, D.A., Chan, E.Y., Stang, S.L., Dunn, R.J., and Stone, J.C. (1998). RasGRP, a Ras guanyl nucleo. *Science* 280, 1082-1086.

Ellis, C., Moran, M., McCormick, F., and Pawson, T. (1990). Phosphorylation of GAP and GAP-associated proteins by transforming and mitogenic tyrosine kinases. *Nature* 343, 377-381.

Emkey, R. and Kahn, C.R. (1997b). Cross-talk between phorbol ester-mediated signaling and tyrosine kinase proto-oncogenes. I. Activation of protein kinase C stimulates tyrosine phosphorylation and activation of ErbB2 and ErbB3. *J. Biol. Chem.* 272, 31172-31181.

Emkey, R. and Kahn, C.R. (1997a). Cross-talk between phorbol ester-mediated signaling and tyrosine kinase proto-oncogenes. II. Comparison of phorbol ester and sphingomyelinase- induced phosphorylation of ErbB2 and ErbB3. *J. Biol. Chem.* 272, 31182-31189.

Etienne-Manneville, S. and Hall, A. (2001). Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* 106, 489-498.

Fagerstrom, S., Pahlman, S., and Nanberg, E. (1998). Protein kinase C-dependent tyrosine phosphorylation of p130cas in differentiating neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 273, 2336-2343.

Farese,R.V., Standaert,M.L., Ishizuka,T., Yu,B., Hernandez,H., Waldron,C., Watson,J., Farese,J.P., Cooper,D.R., and Wickstrom,E. (1991). Antisense DNA downregulates protein kinase C isozymes (beta and alpha) and insulin-stimulated 2-deoxyglucose uptake in rat adipocytes. *Antisense Res. Dev.* 1, 35-42.

Feng,X., Zhang,J., Barak,L.S., Meyer,T., Caron,M.G., and Hannun,Y.A. (1998). Visualization of dynamic trafficking of a protein kinase C beta1/green fluorescent protein conjugate reveals differences in G protein-coupled receptor activation and desensitization. *J. Biol. Chem.* 273, 10755-10762.

Fincham,V.J., Chudleigh,A., and Frame,M.C. (1999). Regulation of p190 Rho-GAP by v-Src is linked to cytoskeletal disruption during transformation. *J. Cell Sci.* 112 (Pt 6), 947-956.

Fukumoto,S., Nishizawa,Y., Hosoi,M., Koyama,H., Yamakawa,K., Ohno,S., and Morii,H. (1997). Protein kinase C delta inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells by suppressing G1 cyclin expression. *J. Biol. Chem.* 272, 13816-13822.

Gilmore,T. and Martin,G.S. (1983). Phorbol ester and diacylglycerol induce protein phosphorylation at tyrosine. *Nature* 306, 487-490.

Goode,N., Hughes,K., Woodgett,J.R., and Parker,P.J. (1992). Differential regulation of glycogen synthase kinase-3 beta by protein kinase C isotypes. *J. Biol. Chem.* 267, 16878-16882.

Goodnight,J., Kazanietz,M.G., Blumberg,P.M., Mushinski,J.F., and Mischak,H. (1992). The cDNA sequence, expression pattern and protein characteristics of mouse protein kinase C-zeta. *Gene* 122, 305-311.

Goodnight,J., Mischak,H., and Mushinski,J.F. (1994). Selective involvement of protein kinase C isozymes in differentiation and neoplastic transformation. *Adv. Cancer Res.* 64, 159-209.

Goodnight,J.A., Mischak,H., Kolch,W., and Mushinski,J.F. (1995). Immunocytochemical localization of eight protein kinase C isozymes overexpressed in NIH 3T3 fibroblasts. Isoform-specific association with microfilaments, Golgi, endoplasmic reticulum, and nuclear and cell membranes. *J. Biol. Chem.* 270, 9991-10001.

Gould,K.L., Woodgett,J.R., Cooper,J.A., Buss,J.E., Shalloway,D., and Hunter,T. (1985). Protein kinase C phosphorylates pp60src at a novel site. *Cell* 42, 849-857.

Haller,H., Lindschau,C., Maasch,C., Olthoff,H., Kurscheid,D., and Luft,F.C. (1998). Integrin-induced protein kinase Calpha and Cepsilon translocation to focal adhesions mediates vascular smooth muscle cell spreading. *Circ. Res.* 82, 157-165.

Harder,K.W., Moller,N.P., Peacock,J.W., and Jirik,F.R. (1998). Protein-tyrosine phosphatase alpha regulates Src family kinases and alters cell-substratum adhesion. *J. Biol. Chem.* 273, 31890-31900.

Hardie,R.C., Peretz,A., Suss-Toby,E., Rom-Glas,A., Bishop,S.A., Selinger,Z., and Minke,B. (1993). Protein kinase C is required for light adaptation in Drosophila photoreceptors. *Nature* 363, 634-637.

Harrington,E.O., Loffler,J., Nelson,P.R., Kent,K.C., Simons,M., and Ware,J.A. (1997). Enhancement of migration by protein kinase Calpha and inhibition of proliferation and cell cycle progression by protein kinase Cdelta in capillary endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 272, 7390-7397.

Hartwig,J.H., Thelen,M., Rosen,A., Janmey,P.A., Nairn,A.C., and Aderem,A. (1992). MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 356, 618-622.

Haskell,M.D., Nickles,A.L., Agati,J.M., Su,L., Dukes,B.D., and Parsons,S.J. (2001). Phosphorylation of p190 on Tyr1105 by c-Src is necessary but not sufficient for EGF-induced actin disassembly in C3H10T1/2 fibroblasts. *J. Cell Sci.* 114, 1699-1708.

Hata,A., Akita,Y., Suzuki,K., and Ohno,S. (1993). Functional divergence of protein kinase C (PKC) family members. PKC gamma differs from PKC alpha and -beta II and nPKC epsilon in its competence to mediate-12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA)- responsive transcriptional activation through a TPA-response element. *J. Biol. Chem.* 268, 9122-9129.

Hidaka,H., Inagaki,M., Kawamoto,S., and Sasaki,Y. (1984). Isoquinolinesulfonamides, novel and potent inhibitors of cyclic nucleotide dependent protein kinase and protein kinase C. *Biochemistry* 23, 5036-5041.

House, C. and Kemp, B.E. (1987). Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science* 238, 1726-1728.

Hunter, T., Ling, N., and Cooper, J.A. (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.

Ikeo, S., Yamauchi, K., Shigematsu, S., Nakajima, K., Aizawa, T., and Hashizume, K. (2001). Differential effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on human endothelial cell migration. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 280, C1255-C1261.

Imamura, H., Takaishi, K., Nakano, K., Kodama, A., Oishi, H., Shiozaki, H., Monden, M., Sasaki, T., and Takai, Y. (1998). Rho and Rab small G proteins coordinately reorganize stress fibers and focal adhesions in MDCK cells. *Mol. Biol. Cell* 9, 2561-2575.

Inoue, M., Kishimoto, A., Takai, Y., and Nishizuka, Y. (1977). Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J. Biol. Chem.* 252, 7610-7616.

Isseroff, R.R., Stephens, L.E., and Gross, J.L. (1989). Subcellular distribution of protein kinase C/phorbol ester receptors in differentiating mouse keratinocytes. *J. Cell Physiol* 141, 235-242.

Ivaska, J., Whelan, R.D., Watson, R., and Parker, P.J. (2002). PKC epsilon controls the traffic of beta1 integrins in motile cells. *EMBO J.* 21, 3608-3619.

Jaken, S. (1996). Protein kinase C isozymes and substrates. *Curr. Opin. Cell Biol.* 8, 168-173.

Jaken, S., Leach, K., and Klauck, T. (1989). Association of type 3 protein kinase C with focal contacts in rat embryo fibroblasts. *J. Cell Biol.* 109, 697-704.

Kaibuchi, K., Fukumoto, Y., Oku, N., Takai, Y., Arai, K., and Muramatsu, M. (1989). Molecular genetic analysis of the regulatory and catalytic domains of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 264, 13489-13496.

Kam,Y. and Exton,J.H. (2001). Phospholipase D activity is required for actin stress fiber formation in fibroblasts. *Mol. Cell. Biol.* 2001. Jun;21(12):4055-66. 21, 4055-66.

Kaneki,M., Kharbanda,S., Pandey,P., Yoshida,K., Takekawa,M., Liou,J.R., Stone,R., and Kufe,D. (1999). Functional role for protein kinase C β as a regulator of stress-activated protein kinase activation and monocytic differentiation of myeloid leukemia cells. *Mol. Cell Biol.* 19, 461-470.

Kazanietz,M.G., Areces,L.B., Bahador,A., Mischak,H., Goodnight,J., Mushinski,J.F., and Blumberg,P.M. (1993). Characterization of ligand and substrate specificity for the calcium- dependent and calcium-independent protein kinase C isozymes. *Mol. Pharmacol.* 44, 298-307.

Keenan,C. and Kelleher,D. (1998). Protein kinase C and the cytoskeleton. *Cell Signal.* 10, 225-232.

Keranen,L.M., Dutil,E.M., and Newton,A.C. (1995). Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr. Biol.* 5, 1394-1403.

Kielbassa,K., Muller,H.J., Meyer,H.E., Marks,F., and Gschwendt,M. (1995). Protein kinase C delta-specific phosphorylation of the elongation factor eEF- α and an eEF-1 α peptide at threonine 431. *J. Biol. Chem.* 270, 6156-6162.

Kiley,S.C. and Parker,P.J. (1995). Differential localization of protein kinase C isozymes in U937 cells: evidence for distinct isozyme functions during monocyte differentiation. *J. Cell Sci.* 108 (Pt 3), 1003-1016.

Kimura,K., Ito,M., Amano,M., Chihara,K., Fukata,Y., Nakafuku,M., Yamamori,B., Feng,J., Nakano,T., Okawa,K., Iwamatsu,A., and Kaibuchi,K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho- kinase). *Science* 273, 245-248.

Kiyono,M., Kaziro,Y., and Satoh,T. (2000). Induction of rac-guanine nucleotide exchange activity of Ras- GRF1/CDC25(Mm) following phosphorylation by the nonreceptor tyrosine kinase Src. *J. Biol. Chem.* 275, 5441-5446.

- Knaus,U.G., Morris,S., Dong,H.J., Chernoff,J., and Bokoch,G.M. (1995). Regulation of human leukocyte p21-activated kinases through G protein-- coupled receptors. *Science* 269, 221-223.
- Knopf,J.L., Lee,M.H., Sultzman,L.A., Kriz,R.W., Loomis,C.R., Hewick,R.M., and Bell,R.M. (1986). Cloning and expression of multiple protein kinase C cDNAs. *Cell* 46, 491-502.
- Kolch,W., Heidecker,G., Kochs,G., Hummel,R., Vahidi,H., Mischak,H., Finkenzeller,G., Marme,D., and Rapp,U.R. (1993). Protein kinase C alpha activates RAF-1 by direct phosphorylation. *Nature* 364, 249-252.
- Kozma,R., Ahmed,S., Best,A., and Lim,L. (1995). The Ras-related protein Cdc42Hs and bradykinin promote formation of peripheral actin microspikes and filopodia in Swiss 3T3 fibroblasts. *Mol. Cell Biol.* 15, 1942-1952.
- Kozma,R., Ahmed,S., Best,A., and Lim,L. (1996). The GTPase-activating protein n-chimaerin cooperates with Rac1 and Cdc42Hs to induce the formation of lamellipodia and filopodia. *Mol. Cell Biol.* 16, 5069-5080.
- Kruger,K.E., Sossin,W.S., Sacktor,T.C., Bergold,P.J., Beushausen,S., and Schwartz,J.H. (1991). Cloning and characterization of Ca(2+)-dependent and Ca(2+)-independent PKCs expressed in *Aplysia* sensory cells. *J. Neurosci.* 11, 2303-2313.
- Kwiatkowski,D.J. (1999). Functions of gelsolin: motility, signaling, apoptosis, cancer. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11, 103-8.
- Laudanna,C., Mochly-Rosen,D., Liron,T., Constantin,G., and Butcher,E.C. (1998). Evidence of zeta protein kinase C involvement in polymorphonuclear neutrophil integrin-dependent adhesion and chemotaxis. *J. Biol. Chem.* 273, 30306-30315.
- Lauffenburger,D.A. and Horwitz,A.F. (1996). Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell.* 84, 359-69.
- Le Good,J.A., Ziegler,W.H., Parekh,D.B., Alessi,D.R., Cohen,P., and Parker,P.J. (1998). Protein kinase C isotypes controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 281, 2042-2045.

- Lee,H.W., Smith,L., Pettit,G.R., and Smith,J.B. (1997). Bryostatin 1 and phorbol ester down-modulate protein kinase C-alpha and -epsilon via the ubiquitin/proteasome pathway in human fibroblasts. *Mol. Pharmacol.* *51*, 439-447.
- Legg,J.W., Lewis,C.A., Parsons,M., Ng,T., and Isacke,C.M. (2002). A novel PKC-regulated mechanism controls CD44 ezrin association and directional cell motility. *Nat. Cell Biol.* *4*, 399-407.
- Li,W., Chen,X.H., Kelley,C.A., Alimandi,M., Zhang,J., Chen,Q., Bottaro,D.P., and Pierce,J.H. (1996a). Identification of tyrosine 187 as a protein kinase C-delta phosphorylation site. *J. Biol. Chem.* *271*, 26404-26409.
- Li,W., Michieli,P., Alimandi,M., Lorenzi,M.V., Wu,Y., Wang,L.H., Heidarani,M.A., and Pierce,J.H. (1996b). Expression of an ATP binding mutant of PKC-delta inhibits Sis-induced transformation of NIH3T3 cells. *Oncogene* *13*, 731-737.
- Li,W., Mischak,H., Yu,J.C., Wang,L.M., Mushinski,J.F., Heidarani,M.A., and Pierce,J.H. (1994a). Tyrosine phosphorylation of protein kinase C-delta in response to its activation. *J. Biol. Chem.* *269*, 2349-2352.
- Li,W., Nadelman,C., Gratch,N.S., Li,W., Chen,M., Kasahara,N., and Woodley,D.T. (2002). An important role for protein kinase C-delta in human keratinocyte migration on dermal collagen. *Exp. Cell Res.* *273*, 219-228.
- Li,W., Yu,J.C., Michieli,P., Beeler,J.F., Ellmore,N., Heidarani,M.A., and Pierce,J.H. (1994b). Stimulation of the platelet-derived growth factor beta receptor signaling pathway activates protein kinase C-delta. *Mol. Cell Biol.* *14*, 6727-6735.
- Lin,D., Edwards,A.S., Fawcett,J.P., Mbamalu,G., Scott,J.D., and Pawson,T. (2000). A mammalian PAR-3-PAR-6 complex implicated in Cdc42/Rac1 and aPKC signalling and cell polarity. *Nat. Cell Biol.* *2*, 540-547.
- Lin,X., Tomblor,E., Nelson,P.J., Ross,M., and Gelman,I.H. (1996). A novel src- and ras-suppressed protein kinase C substrate associated with cytoskeletal architecture. *J. Biol. Chem.* *271*, 28430-28438.
- Litchfield,D.W. and Ball,E.H. (1986). Phosphorylation of the cytoskeletal protein talin by protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *134*, 1276-1283.

- Livneh,E., Shimon,T., Bechor,E., Doki,Y., Schieren,I., and Weinstein,I.B. (1996). Linking protein kinase C to the cell cycle: ectopic expression of PKC eta in NIH3T3 cells alters the expression of cyclins and Cdk inhibitors and induces adipogenesis. *Oncogene* 12, 1545-1555.
- Lu,Z., Liu,D., Hornia,A., Devonish,W., Pagano,M., and Foster,D.A. (1998). Activation of protein kinase C triggers its ubiquitination and degradation. *Mol. Cell Biol.* 18, 839-845.
- Machesky,L.M. and Gould,K.L. (1999). The Arp2/3 complex: a multifunctional actin organizer. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 11, 117-21.
- Mackay,D.J. and Hall,A. (1998). Rho GTPases. *J. Biol. Chem.* 273, 20685-8.
- Manser,E., Chong,C., Zhao,Z.S., Leung,T., Michael,G., Hall,C., and Lim,L. (1995). Molecular cloning of a new member of the p21-Cdc42/Rac-activated kinase (PAK) family. *J. Biol. Chem.* 270, 25070-25078.
- Martin,G.A., Bollag,G., McCormick,F., and Abo,A. (1995). A novel serine kinase activated by rac1/CDC42Hs-dependent autophosphorylation is related to PAK65 and STE20. *EMBO J.* 14, 1970-1978.
- Minden,A., Lin,A., Claret,F.X., Abo,A., and Karin,M. (1995). Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* 81, 1147-1157.
- Mischak,H., Bodenteich,A., Kolch,W., Goodnight,J., Hofer,F., and Mushinski,J.F. (1991a). Mouse protein kinase C-delta, the major isoform expressed in mouse hemopoietic cells: sequence of the cDNA, expression patterns, and characterization of the protein. *Biochemistry* 30, 7925-7931.
- Mischak,H., Goodnight,J.A., Kolch,W., Martiny-Baron,G., Schaechtle,C., Kazanietz,M.G., Blumberg,P.M., Pierce,J.H., and Mushinski,J.F. (1993b). Overexpression of protein kinase C-delta and -epsilon in NIH 3T3 cells induces opposite effects on growth, morphology, anchorage dependence, and tumorigenicity. *J. Biol. Chem.* 268, 6090-6096.

Mischak,H., Kolch,W., Goodnight,J., Davidson,W.F., Rapp,U., Rose-John,S., and Mushinski,J.F. (1991b). Expression of protein kinase C genes in hemopoietic cells is cell-type- and B cell-differentiation stage specific. *J. Immunol.* *147*, 3981-3987.

Mischak,H., Pierce,J.H., Goodnight,J., Kazanietz,M.G., Blumberg,P.M., and Mushinski,J.F. (1993a). Phorbol ester-induced myeloid differentiation is mediated by protein kinase C-alpha and -delta and not by protein kinase C-beta II, -epsilon, -zeta, and -eta. *J. Biol. Chem.* *268*, 20110-20115.

Mishima,K., Ohno,S., Shitara,N., Yamaoka,K., and Suzuki,K. (1994). Opposite effects of the overexpression of protein kinase C gamma and delta on the growth properties of human glioma cell line U251 MG. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *201*, 363-372.

Mitchison,T.J. and Cramer,L.P. (1996). Actin-based cell motility and cell locomotion. *Cell* *84*, 371-379.

Mochly-Rosen,D. and Gordon,A.S. (1998). Anchoring proteins for protein kinase C: a means for isozyme selectivity. *FASEB J.* *12*, 35-42.

Moran,M.F., Polakis,P., McCormick,F., Pawson,T., and Ellis,C. (1991). Protein-tyrosine kinases regulate the phosphorylation, protein interactions, subcellular distribution, and activity of p21ras GTPase-activating protein. *Mol. Cell Biol.* *11*, 1804-1812.

Moyers,J.S., Bouton,A.H., and Parsons,S.J. (1993). The sites of phosphorylation by protein kinase C and an intact SH2 domain are required for the enhanced response to beta-adrenergic agonists in cells overexpressing c-src. *Mol. Cell Biol.* *13*, 2391-2400.

Municio,M.M., Lozano,J., Sanchez,P., Moscat,J., and Diaz-Meco,M.T. (1995). Identification of heterogeneous ribonucleoprotein A1 as a novel substrate for protein kinase C zeta. *J. Biol. Chem.* *270*, 15884-15891.

Murray,N.R., Burns,D.J., and Fields,A.P. (1994). Presence of a beta II protein kinase C-selective nuclear membrane activation factor in human leukemia cells. *J. Biol. Chem.* *269*, 21385-21390.

- Musch,A., Cohen,D., Kreitzer,G., and Rodriguez-Boulan,E. (2001). cdc42 regulates the exit of apical and basolateral proteins from the trans-Golgi network. *EMBO J.* 20, 2171-2179.
- Nakahara,H., Mueller,S.C., Nomizu,M., Yamada,Y., Yeh,Y., and Chen,W.T. (1998). Activation of beta1 integrin signaling stimulates tyrosine phosphorylation of p190RhoGAP and membrane-protrusive activities at invadopodia. *J. Biol. Chem.* 273, 9-12.
- Nakano,K., Takaishi,K., Kodama,A., Mammoto,A., Shiozaki,H., Monden,M., and Takai,Y. (1999). Distinct actions and cooperative roles of ROCK and mDia in Rho small G protein-induced reorganization of the actin cytoskeleton in Madin-Darby canine kidney cells. *Mol. Biol. Cell* 10, 2481-2491.
- Narumiya,S., Ishizaki,T., and Uehata,M. (2000). Use and properties of ROCK-specific inhibitor Y-27632. *Methods Enzymol.* 325, 273-284.
- Newton,A.C. (1995). Protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* 270, 28495-28498.
- Newton,A.C. (1997). Regulation of protein kinase C. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 161-167.
- Ng,T., Parsons,M., Hughes,W.E., Monypenny,J., Zicha,D., Gautreau,A., Arpin,M., Gschmeissner,S., Verveer,P.J., Bastiaens,P.I., and Parker,P.J. (2001). Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. *EMBO J.* 20, 2723-2741.
- Ng,T., Shima,D., Squire,A., Bastiaens,P.I., Gschmeissner,S., Humphries,M.J., and Parker,P.J. (1999). PKCalpha regulates beta1 integrin-dependent cell motility through association and control of integrin traffic. *EMBO J.* 18, 3909-3923.
- Nguyen,A., Burack,W.R., Stock,J.L., Kortum,R., Chaika,O.V., Afkarian,M., Muller,W.J., Murphy,K.M., Morrison,D.K., Lewis,R.E., McNeish,J., and Shaw,A.S. (2002). Kinase suppressor of Ras (KSR) is a scaffold which facilitates mitogen-activated protein kinase activation in vivo. *Mol. Cell Biol.* 22, 3035-3045.

Nishikawa,K., Toker,A., Johannes,F.J., Songyang,Z., and Cantley,L.C. (1997). Determination of the specific substrate sequence motifs of protein kinase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 272, 952-960.

Nishizuka,Y. (1992). Membrane phospholipid degradation and protein kinase C for cell signalling. *Neurosci. Res.* 15, 3-5.

Nishizuka,Y. (1995). Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* 9, 484-496.

Nobes,C.D. and Hall,A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.

Nobes,C.D. and Hall,A. (1999). Rho GTPases control polarity, protrusion, and adhesion during cell movement. *J. Cell Biol.* 144, 1235-1244.

Obermeier,A., Ahmed,S., Manser,E., Yen,S.C., Hall,C., and Lim,L. (1998). PAK promotes morphological changes by acting upstream of Rac. *EMBO J.* 17, 4328-4339.

Ohashi,K., Nagata,K., Maekawa,M., Ishizaki,T., Narumiya,S., and Mizuno,K. (2000). Rho-associated kinase ROCK activates LIM-kinase 1 by phosphorylation at threonine 508 within the activation loop. *J. Biol. Chem.* 275, 3577-3582.

Ohno,S., Akita,Y., Hata,A., Osada,S., Kubo,K., Konno,Y., Akimoto,K., Mizuno,K., Saido,T., Kuroki,T., and . (1991). Structural and functional diversities of a family of signal transducing protein kinases, protein kinase C family; two distinct classes of PKC, conventional cPKC and novel nPKC. *Adv. Enzyme Regul.* 31, 287-303.

Ohno,S., Akita,Y., Konno,Y., Imajoh,S., and Suzuki,K. (1988a). A novel phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC, distantly related to the protein kinase C family. *Cell* 53, 731-741.

Ohno,S., Kawasaki,H., Konno,Y., Inagaki,M., Hidaka,H., and Suzuki,K. (1988b). A fourth type of rabbit protein kinase C. *Biochemistry* 27, 2083-2087.

Ohno,S., Mizuno,K., Adachi,Y., Hata,A., Akita,Y., Akimoto,K., Osada,S., Hirai,S., and Suzuki,K. (1994). Activation of novel protein kinases C delta and C epsilon upon

mitogenic stimulation of quiescent rat 3Y1 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 269, 17495-17501.

Ono, Y., Fujii, T., Ogita, K., Kikkawa, U., Igarashi, K., and Nishizuka, Y. (1989). Protein kinase C zeta subspecies from rat brain: its structure, expression, and properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86, 3099-3103.

Osada, S., Mizuno, K., Saido, T.C., Akita, Y., Suzuki, K., Kuroki, T., and Ohno, S. (1990). A phorbol ester receptor/protein kinase, nPKC eta, a new member of the protein kinase C family predominantly expressed in lung and skin. *J. Biol. Chem.* 265, 22434-22440.

Osada, S., Mizuno, K., Saido, T.C., Suzuki, K., Kuroki, T., and Ohno, S. (1992). A new member of the protein kinase C family, nPKC theta, predominantly expressed in skeletal muscle. *Mol. Cell Biol.* 12, 3930-3938.

Parsons, M., Keppler, M.D., Kline, A., Messent, A., Humphries, M.J., Gilchrist, R., Hart, I.R., Quittau-Prevostel, C., Hughes, W.E., Parker, P.J., and Ng, T. (2002). Site-directed perturbation of protein kina. *Mol. Cell Biol.* 22, 5897-5911.

Pietromonaco, S.F., Simons, P.C., Altman, A., and Elias, L. (1998). Protein kinase C-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence. *J. Biol. Chem.* 273, 7594-7603.

Podar, K., Tai, Y.T., Lin, B.K., Narsimhan, R.P., Sattler, M., Kijima, T., Salgia, R., Gupta, D., Chauhan, D., and Anderson, K.C. (2002). Vascular endothelial growth factor-induced migration of multiple myeloma cells is associated with beta 1 inte. *J. Biol. Chem.* 277, 7875-7881.

Raabe, T. and Rapp, U.R. (2002). KSR--a regulator and scaffold protein of the MAPK pathway. *Sci. STKE.* 2002, E28.

Rabinovitz, I., Toker, A., and Mercurio, A.M. (1999). Protein kinase C-dependent mobilization of the alpha6beta4 integrin from hemidesmosomes and its association with actin-rich cell protrusions drive the chemotactic migration of carcinoma cells. *J. Cell Biol.* 146, 1147-1160.

Rhee,S.G. and Choi,K.D. (1992). Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. *J. Biol. Chem.* 267, 12393-12396.

Ridley,A.J., Paterson,H.F., Johnston,C.L., Diekmann,D., and Hall,A. (1992). The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell* 70, 401-410.

Riveline,D., Zamir,E., Balaban,N.Q., Schwarz,U.S., Ishizaki,T., Narumiya,S., Kam,Z., Geiger,B., and Bershadsky,A.D. (2001). Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK- independent mechanism. *J. Cell Biol.* 153, 1175-1186.

Roger,P.P., Rickaert,F., Lamy,F., Authelet,M., and Dumont,J.E. (1989). Actin stress fiber disruption and tropomyosin isoform switching in normal thyroid epithelial cells stimulated by thyrotropin and phorbol esters. *Exp. Cell Res.* 182, 1-13.

Rohatgi,R., Ma,L., Miki,H., Lopez,M., Kirchhausen,T., Takenawa,T., and Kirschner,M.W. (1999). The interaction between N-WASP and the Arp2/3 complex links Cdc42- dependent signals to actin assembly. *Cell* 97, 221-231.

Rojnuckarin,P. and Kaushansky,K. (2001). Actin reorganization and proplatelet formation in murine megakaryocytes: the role of protein kinase calpha. *Blood* 97, 154-161.

Romanova,L.Y., Alexandrov,I.A., Blagosklonny,M.V., Nordan,R.P., Garfield,S., Acs,P., Nguyen,P., Trepel,J., Blumberg,P.M., and Mushinski,J.F. (1999). Regulation of actin cytoskeleton in lymphocytes: PKC-delta disrupts IL- 3-induced membrane ruffles downstream of Rac1. *J. Cell Physiol* 179 , 157-169.

Roof,R.W., Haskell,M.D., Dukes,B.D., Sherman,N., Kinter,M., and Parsons,S.J. (1998). Phosphotyrosine (p-Tyr)-dependent and -independent mechanisms of p190 RhoGAP-p120 RasGAP interaction: Tyr 1105 of p190, a substrate for c- Src, is the sole p-Tyr mediator of complex formation. *Mol. Cell Biol.* 18, 7052-7063.

Rose-John,S., Dietrich,A., and Marks,F. (1988). Molecular cloning of mouse protein kinase C (PKC) cDNA from Swiss 3T3 fibroblasts. *Gene* 74, 465-471.

Rose,S.D., Lejen,T., Zhang,L., and Trifaro,J.M. (2001). Chromaffin cell F-actin disassembly and potentiation of catecholamine release in response to protein kinase C activation by phorbol esters is mediated through myristoylated alanine-rich C kinase substrate phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 276, 36757-36763.

Rotenberg,S.A. and Weinstein,I.B. (1991). Two polychlorinated hydrocarbons cause phospholipid-dependent protein kinase C activation in vitro in the absence of calcium. *Mol. Carcinog.* 4, 477-481.

Rozengurt,E., Rodriguez-Pena,M., and Smith,K.A. (1983). Phorbol esters, phospholipase C, and growth factors rapidly stimulate the phosphorylation of a Mr 80,000 protein in intact quiescent 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 80, 7244-7248.

Sakai,N., Sasaki,K., Ikegaki,N., Shirai,Y., Ono,Y., and Saito,N. (1997). Direct visualization of the translocation of the gamma-subspecies of protein kinase C in living cells using fusion proteins with green fluorescent protein. *J. Cell Biol.* 139, 1465-1476.

Schlaepfer,D.D., Jones,K.C., and Hunter,T. (1998). Multiple Grb2-mediated integrin-stimulated signaling pathways to ERK2/mitogen-activated protein kinase: summation of both c-Src- and focal adhesion kinase-initiated tyrosine phosphorylation events. *Mol. Cell Biol.* 18, 2571-2585.

Schonwasser,D.C., Marais,R.M., Marshall,C.J., and Parker,P.J. (1998). Activation of the mitogen-activated protein kinase/extracellular signal- regulated kinase pathway by conventional, novel, and atypical protein kinase C isotypes. *Mol. Cell Biol.* 18, 790-798.

Seger,R. and Krebs,E.G. (1995). The MAPK signaling cascade. *FASEB J.* 9, 726-735.

Selbie,L.A., Schmitz-Peiffer,C., Sheng,Y., and Biden,T.J. (1993). Molecular cloning and characterization of PKC iota, an atypical isoform of protein kinase C derived from insulin-secreting cells. *J. Biol. Chem.* 268, 24296-24302.

Shanmugam,M., Krett,N.L., Peters,C.A., Maizels,E.T., Murad,F.M., Kawakatsu,H., Rosen,S.T., and Hunzicker-Dunn,M. (1998). Association of PKC delta and active Src in PMA-treated MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene* 16, 1649-1654.

Sharkey,N.A. and Blumberg,P.M. (1985). Kinetic evidence that 1,2-diolein inhibits phorbol ester binding to protein kinase C via a competitive mechanism. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 133, 1051-1056.

Shenoy,S., Chackalaparampil,I., Bagrodia,S., Lin,P.H., and Shalloway,D. (1992). Role of p34cdc2-mediated phosphorylations in two-step activation of pp60c-src during mitosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89 , 7237-7241.

Singh,S.S., Chauhan,A., Brockerhoff,H., and Chauhan,V.P. (1993). Activation of protein kinase C by phosphatidylinositol 3,4,5- trisphosphate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195, 104-112.

Sinnett-Smith,J., Lunn,J.A., Leopoldt,D., and Rozengurt,E. (2001). Y-27632, an inhibitor of Rho-associated kinases, prevents tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase and paxillin induced by bombesin: dissociation from tyrosine phosphorylation of p130(CAS). *Exp. Cell Res.* 266, 292-302.

Sliva,D., English,D., Lyons,D., and Lloyd,F.P., Jr. (2002). Protein kinase C induces motility of breast cancers by upregulating secretion of urokinase-type plasminogen activator through activation of AP-1 and NF-kappaB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290, 552-557.

Small,J.V., Anderson,K., and Rottner,K. (1996). Actin and the coordination of protrusion, attachment and retraction in cell crawling. *Biosci. Rep.* 16, 351-368.

Soltoff,S.P. and Toker,A. (1995). Carbachol, substance P, and phorbol ester promote the tyrosine phosphorylation of protein kinase C delta in salivary gland epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 270, 13490-13495.

Southern,C., Wilkinson,P.C., Thorp,K.M., Henderson,L.K., Nemeč,M., and Matthews,N. (1995). Inhibition of protein kinase C results in a switch from a non-motile to a motile phenotype in diverse human lymphocyte populations. *Immunology* 84, 326-332.

Sozeri,O., Vollmer,K., Liyanage,M., Frith,D., Kour,G., Mark,G.E., III, and Stabel,S. (1992). Activation of the c-Raf protein kinase by protein kinase C phosphorylation. *Oncogene* 7, 2259-2262.

Stetak,A., Csermely,P., Ullrich,A., and Keri,G. (2001). Physical and functional interactions between protein tyrosine phosphatase alpha, PI 3-kinase, and PKCdelta. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 288, 564-572.

Sumi,T., Matsumoto,K., and Nakamura,T. (2001). Specific activation of LIM kinase 2 via phosphorylation of threonine 505 by ROCK, a Rho-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 276, 670-676.

Sumi,T., Matsumoto,K., Takai,Y., and Nakamura,T. (1999). Cofilin phosphorylation and actin cytoskeletal dynamics regulated by rho- and Cdc42-activated LIM-kinase 2. *J. Cell Biol.* 147, 1519-1532.

Symons,M., Derry,J.M., Karlak,B., Jiang,S., Lemahieu,V., McCormick,F., Francke,U., and Abo,A. (1996). Wiskott-Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* 84, 723-734.

Szallasi,Z., Smith,C.B., Pettit,G.R., and Blumberg,P.M. (1994). Differential regulation of protein kinase C isozymes by bryostatin 1 and phorbol 12-myristate 13-acetate in NIH 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 269, 2118-2124.

Tang,S., Morgan,K.G., Parker,C., and Ware,J.A. (1997). Requirement for protein kinase C theta for cell cycle progression and formation of actin stress fibers and filopodia in vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 272, 28704-28711.

Taylor,S.J., Chae,H.Z., Rhee,S.G., and Exton,J.H. (1991). Activation of the beta 1 isozyme of phospholipase C by alpha subunits of the Gq class of G proteins. *Nature* 350, 516-518.

Thorp,K.M., Verschueren,H., De Baetselier,P., Southern,C., and Matthews,N. (1996). Protein kinase C isotype expression and regulation of lymphoid cell motility. *Immunology* 87, 434-438.

Toker,A. (1998). Signaling through protein kinase C. *Front Biosci.* 3, D1134-D1147.

Toker,A., Meyer,M., Reddy,K.K., Falck,J.R., Aneja,R., Aneja,S., Parra,A., Burns,D.J., Ballas,L.M., and Cantley,L.C. (1994). Activation of protein kinase C family members by the novel polyphosphoinositides PtdIns-3,4-P2 and PtdIns-3,4,5-P3. *J. Biol. Chem.* 269, 32358-32367.

Tonetti,D.A., Henning-Chubb,C., Yamanishi,D.T., and Huberman,E. (1994). Protein kinase C-beta is required for macrophage differentiation of human HL-60 leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 269, 23230-23235.

Toullec,D., Pianetti,P., Coste,H., Bellevergue,P., Grand-Perret,T., Ajakane,M., Baudet,V., Boissin,P., Boursier,E., Loriolle,F., and . (1991). The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 266, 15771-15781.

Tracy,S., van der,G.P., and Hunter,T. (1995). The receptor-like protein-tyrosine phosphatase, RPTP alpha, is phosphorylated by protein kinase C on two serines close to the inner face of the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* 270, 10587-10594.

Tsuji,T., Ishizaki,T., Okamoto,M., Higashida,C., Kimura,K., Furuyashiki,T., Arakawa,Y., Birge,R.B., Nakamoto,T., Hirai,H., and Narumiya,S. (2002). ROCK and mDia1 antagonize in Rho-dependent Rac activation in Swiss 3T3 fibroblasts. *J. Cell Biol.* 157, 819-830.

Uberall,F., Giselbrecht,S., Hellbert,K., Fresser,F., Bauer,B., Gschwendt,M., Grunicke,H.H., and Baier,G. (1997). Conventional PKC-alpha, novel PKC-epsilon and PKC-theta, but not atypical PKC-lambda are MARCKS kinases in intact NIH 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 272, 4072-4078.

Uberall,F., Hellbert,K., Kampfer,S., Maly,K., Villunger,A., Spitaler,M., Mwanjewe,J., Baier-Bitterlich,G., Baier,G., and Grunicke,H.H. (1999). Evidence that atypical protein kinase C-lambda and atypical protein kinase C-zeta participate in Ras-mediated reorganization of the F-actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 144, 413-425.

Valius,M. and Kazlauskas,A. (1993). Phospholipase C-gamma 1 and phosphatidylinositol 3 kinase are the downstream mediators of the PDGF receptor's mitogenic signal. *Cell* 73, 321-334.

- Van Aelst,L. and D'Souza-Schorey,C. (1997). Rho GTPases and signaling networks. *Genes Dev.* 11, 2295-2322.
- Van Aelst,L., Joneson,T., and Bar-Sagi,D. (1996). Identification of a novel Rac1-interacting protein involved in membrane ruffling. *EMBO J.* 15, 3778-3786.
- Vincent,S. and Settleman,J. (1999). Inhibition of RhoGAP activity is sufficient for the induction of Rho- mediated actin reorganization. *Eur. J. Cell Biol.* 78, 539-548.
- Vouret-Craviari,V., Boquet,P., Pouyssegur,J., and Obberghen-Schilling,E. (1998). Regulation of the actin cytoskeleton by thrombin in human endothelial cells: role of Rho proteins in endothelial barrier function. *Mol. Biol. Cell* 9, 2639-2653.
- Wang,J.F., Park,I.W., and Grooman,J.E. (2000). Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. *Blood* 95, 2505-2513.
- Watanabe,N., Kato,T., Fujita,A., Ishizaki,T., and Narumiya,S. (1999). Cooperation between mDia1 and ROCK in Rho-induced actin reorganization. *Nat. Cell Biol.* 1, 136-143.
- Watanabe,N., Madaule,P., Reid,T., Ishizaki,T., Watanabe,G., Kakizuka,A., Saito,Y., Nakao,K., Jockusch,B.M., and Narumiya,S. (1997). p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* 16, 3044-3056.
- Watanabe,T., Ono,Y., Taniyama,Y., Hazama,K., Igarashi,K., Ogita,K., Kikkawa,U., and Nishizuka,Y. (1992). Cell division arrest induced by phorbol ester in CHO cells overexpressing protein kinase C-delta subspecies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89, 10159-10163.
- Werth,D.K., Niedel,J.E., and Pastan,I. (1983). Vinculin, a cytoskeletal substrate of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 258, 11423-11426.
- Whitfield,J.F. (1992). Calcium signals and cancer. *Crit Rev. Oncog.* 3, 55-90.

Wu,W.C., Walaas,S.I., Nairn,A.C., and Greengard,P. (1982). Calcium/phospholipid regulates phosphorylation of a Mr "87k" substrate protein in brain synaptosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 79, 5249-5253.

Xian,W., Rosenberg,M.P., and DiGiovanni,J. (1997). Activation of erbB2 and c-src in phorbol ester-treated mouse epidermis: possible role in mouse skin tumor promotion. *Oncogene* 14, 1435-1444.

Young,M.A., Gonfloni,S., Superti-Furga,G., Roux,B., and Kuriyan,J. (2001). Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation. *Cell* 105, 115-126.

Zang,Q., Lu,Z., Curto,M., Barile,N., Shalloway,D., and Foster,D.A. (1997). Association between v-Src and protein kinase C delta in v-Src- transformed fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 272, 13275-13280.

Zheng,X.M., Resnick,R.J., and Shalloway,D. (2000). A phosphotyrosine displacement mechanism for activation of Src by PTPalpha. *EMBO J.* 19, 964-978.

Zheng,X.M., Resnick,R.J., and Shalloway,D. (2002). Mitotic activation of protein-tyrosine phosphatase alpha and regulation of its Src-mediated transforming activity by its sites of protein kinase C phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 277, 21922-21929.

Zimmermann,A., Gehr,P., and Keller,H.U. (1988). Diacylglycerol-induced shape changes, movements and altered F-actin distribution in human neutrophils. *J. Cell Sci.* 90 (Pt 4), 657-666.

Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosin-5`-triphosphat
cDNA	komplementäre DNA
DAG	Diacylglycerin
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagles Medium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	Deoxycholate
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediamin Tetraaceticacid
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
ERK	extracellular regulated kinase
FCS	Fötales Kälberserum
GDP	Guanosin-5`-diphosphat
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5`-triphosphat
JNK	Jun-N-terminal-Kinase
MAPK	mitogen-activated-protein kinase
MBP	myelin basic protein
mRNA	messenger -RNA
PBS	phosphate buffered saline
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethyloxycarbonylfluorid
pNPP	p-Nitrophenyl Phosphat
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
RNA	Ribonukleinsäure
SAPK	stress-activated-protein kinase
SDS	Natriumdodecylphosphat
TPA	Phorbol-12-myristat-13-acetat

Danksagung

Danken möchte ich Prof. Dr. Hermann Haller, der es mir ermöglicht hat, die Doktorarbeit in der Abteilung Nephrologie anzufertigen.

Ein besonderer Dank gebührt PD Dr. Harald Mischak, der mir durch seine umfangreichen Erfahrungen im Bereich der Signaltransduktion und seiner ständigen Bereitschaft, wissenschaftliche Sachverhalte zu diskutieren, eine wichtige Stütze in den täglichen Verwirrungen der Forschung war. Durch ihn wurde mir darüber hinaus auch Zuspruch und Unterstützung bei privaten Problemen zuteil.

Ferner möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe (Meike Hillmann, Axel Görke, Marc Dangers, Marion Heuer, Iris Kilian, Jana König, Elisabeth Gutjahr) sowie den Kolleginnen vom Reinigungsdienst für ihre Unterstützung und Hilfsbereitschaft, das gute Arbeitsklima und die Verknüpfung von Kompetenz und Frohsinn danken.

Weiterhin möchte ich PD Dr. Mario Gimona danken, der mir vor allem im Bezug auf die Deutung aber auch der Anfertigung von morphologischen Daten eine wichtige Hilfe war. Ferner möchte ich ihm für seine Gastfreundschaft und sein Engagement bei meiner Arbeit danken.

Ebenfalls möchte ich allen Wissenschaftlern, die ich im Verlauf meiner Doktorarbeit wegen Plasmiden oder Reagenzien angeschrieben habe, für ihre Hilfsbereitschaft danken. Besonders möchte ich Reiner Lammers für die Bereitstellung der cDNA für GST-PTP_{cyt}, Jeoren den Hertog für den PTP_α-spezifischen Antikörper und die cDNA für Src K/M, David Shalloway für die cDNA für HA-PTP_α, Albrecht Piiper für die cDNA für Src Y527F, Susanne Simon für den Src-spezifischen Antikörper 2-17 und Mario Gimona für die cDNA für EGFP-RhoV14, GST-Crip und GST-Rhotekin danken. Ferner danke ich meiner Freundin Annely Haase für ihre Geduld, die sie in der Endphase meiner Doktorarbeit aufgebracht hat; meinem Sohn Jannes Thorben, der mir regelmäßig Urlaub aufgezwungen und viel Freude beschert hat; und ganz besonders meinen Eltern, die mich in allen Lebenslagen unterstützt haben (??was waren das für Zeiten??).

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet

Hannover, am 4.10.2002

Lebenslauf

Tabellarischer Lebenslauf: Dipl-Biologe Dominique Brandt

Dienstadresse: Medizinische Hochschule Hannover
Abt. Nephrologie
30625 Hannover

email: dombrandt@web.de

Telephon: (0511)-554744-12

Fax: (0511)-554744-31

Privatadresse: Sallstr.50
30171 Hannover

Telefon: 0511-8093319

Persönliche Daten:

Geboren am 26.06.1973 in Bonn/Bad Godesberg.

Geburt meines Sohnes Jannes Thorben Gedtke am 09.05.1998

Ausbildung und beruflicher Werdegang:

1978–1984 Besuch der Grundschule der Brüder-Grimm-Schule in Hanau

1984-1989 Besuch der Realschule der Fritz-Reuter-Schule in Bad Bevensen

Juni 1989 Realschulabschluss

1989-1990 Besuch der Fachoberschule für Sozialwesen in Celle

1990-1993 Besuch der Oberstufe der Fritz-Reuter-Schule in Bad

Bevensen

Juni 1993

Abitur

1993-1994

Zivildienst am Uni-Klinikum Göttingen

1994-2001

Studium der Biologie an der Universität in Hannover
mit dem Schwerpunkt Genetik, Neurobiologie und Biochemie.

Januar 2001

Diplom

Februar 2001

Beginn der Doktorarbeit an der Medizinischen Hochschule

Bibliographie:

Brandt, D., Gimona, M., Hillmann, M., Haller, H., Mischak, H. (2002) J.Biol.Chem., Vol. 277, pp.20903-20910 "PKC induce actin reorganisation via a Src- and Rho dependent pathway"

Dezember 2001 Posterpräsentation auf dem Kongress „Migration in Development and Disease“ in Berlin/Buch

Februar 2002 Gastvortrag über das Thema „PKC and the Cytoskeleton“ in der Kinderklinik der Medizinischen Hochschule Hannover