
2 Zielsetzung der Arbeit

Proteinkinase C erfüllt wichtige Aufgaben in der zellulären Signaltransduktion. Ihre Isoenzym-spezifische Aktivierung und Expression in verschiedenen Zelltypen und Geweben sowie ihre Substratspezifität bedingen dabei unterschiedliche Funktionen für die einzelnen Mitglieder der PKC-Familie. Dabei stehen sowohl die spezifischen Kinaseaktivitäten der einzelnen Isoenzyme als auch die nachgeordneten Effekte einer PKC-Aktivierung auf das zelluläre Geschehen im Mittelpunkt der Forschung.

Der erste Teil dieser Arbeit besteht daher in der Analyse potentieller PKC-Substrate. Hier werden die durch Dammeier (Dammeier, 1999) mittels 2D-Elektrophorese und Massenspektrometrie identifizierten potentiellen PKC-Substrate untersucht.

Diese, im einzelnen DAP1, Diff6, PDI und TCTP, sollen zunächst kloniert werden. Nach erfolgreicher Überexpression und Reinigung ist ihr Einsatz in *in vitro* Kinasereaktionen geplant. Hier sollen sie entweder als PKC-Substrate bestätigt werden, oder es wird gezeigt werden, dass es sich bei ihnen nicht um direkte PKC-Substrate handelt. Durch den Vergleich von PKC δ - und PKC ϵ -vermittelten Phosphorylierungen werden daneben Isoenzym-spezifische Signaltransduktionen untersucht.

Der zweite Schwerpunkt dieser Arbeit besteht in der Analyse der PKC-vermittelten Genexpression. Hier sollen durch Untersuchungen der mRNA-Expression spezifische Reaktionen der stimulierten Zellen identifiziert werden.

Ein Vergleich von unveränderten 32D Zellen mit 32D Zellen, die die neuen Isoformen PKC δ resp. PKC ϵ stabil überexprimieren, kann dabei Isoform-spezifische Aussagen ermöglichen. Für diese Untersuchungen wird die cDNA-Array Methode etabliert. Diese ermöglicht gleichzeitig, die Genexpression auf breiter Ebene zu untersuchen und dabei auch solche Gene zu analysieren, die nur niedrig exprimiert vorkommen. Die identifizierten differentiell exprimierten Gene werden dann durch PCR nach reverser Transkription oder TaqMan[®]-PCR bestätigt.

Die vorliegende Arbeit soll einen Beitrag zum Verständnis der Stellung von Proteinkinase C innerhalb der zellulären Signaltransduktionskaskaden liefern. Dabei soll vor allem die Funktion von PKC δ in der phorbolsterinduzierten Differenzierung von 32D Zellen ermittelt werden.