

---

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Überprüfung von DAP1, Diff6, PDI und TCTP auf ihre Phosphorylierbarkeit durch PKC

#### 5.1.1 Klonierung von DAP1, Diff6 und TCTP

##### 5.1.1.1 Reverse Transkription und PCR-Amplifikation

Das PDI-Homologe war zu Beginn dieser Arbeit bereits als GST-Fusionsprotein vorhanden. Für DAP1, Diff6 und TCTP war dagegen weder rekombinantes Protein noch das klonierte Gen verfügbar. Die cDNA für diese Proteine musste daher zunächst kloniert werden.

Dazu wurde zuerst cytosolische RNA aus 32D Zellen isoliert. Die isolierte RNA wurde gelelektrophoretisch auf ihre Qualität überprüft. Sie zeigte klare und starke Banden für die ribosomalen RNAs bei einer gleichzeitigen Verteilung der mRNA von niedrigen bis hohen Molekulargewichten. Die Integrität der ribosomalen RNAs gewährleistete dabei, dass keine detektierbare Degradation der RNA stattgefunden hatte.

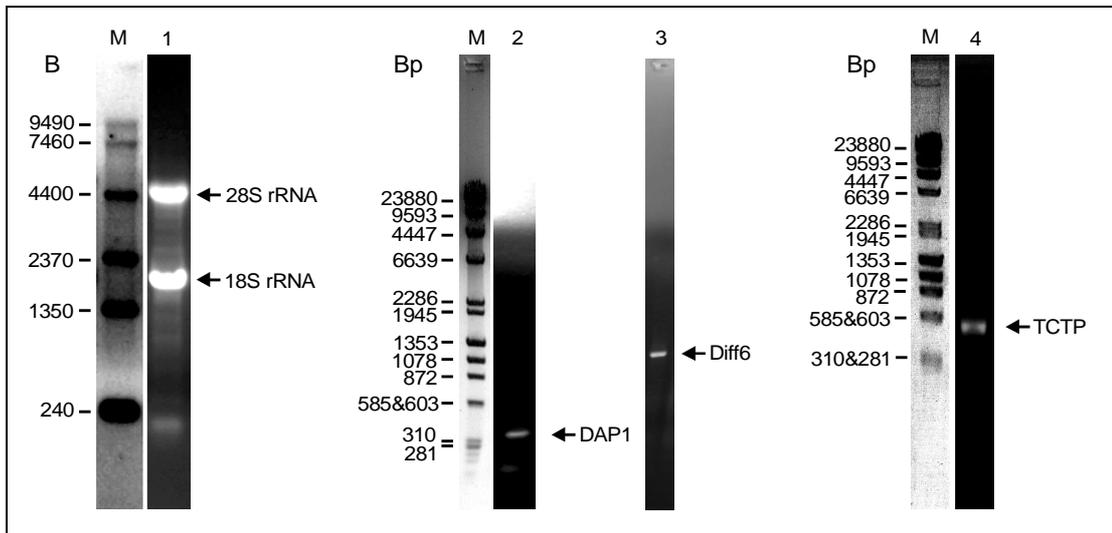
25 µg Gesamt-RNA, entsprechend 0,5 µg mRNA, wurden zur Klonierung der potentiellen PKC-Substrate eingesetzt. Die enthaltene mRNA wurde zunächst in einer reversen Transkription mit oligo-dT Primer in mRNA-cDNA Hybride umgeschrieben. Jeweils 5 % dieser Reaktionsprodukte wurden dann direkt in den einzelnen PCR-Reaktionen eingesetzt. Der Einsatz von Primerpaaren, die unterschiedliche Restriktionsschnittstellen an das 5'- und das 3'-Ende der einzelnen Gene anfügten, ermöglichte später ein unidirektionelles Klonieren in die Expressionsplasmide:

Gen	kalkulierte Größe	eingeführte Schnittstelle	Primersequenz
<b>DAP1</b>	321 Bp	fw: BamHI	<u>GGATCC</u> GCCATGTCTTCGCCTCCCGAAGGGAAA
		rev: EcoRI	GAATTC <u>ACTT</u> GCGTGGCTGCTGGATGTGCTGGC
<b>Diff6</b>	1104 Bp	fw: NcoI	ACAACCAGCAGAG <u>CCATGG</u> ACAAGGAATAT
		rev: Sall	<u>GTCGAC</u> AGGCGGTATTGGGGAATATCACAGCAC
<b>TCTP</b>	525 Bp	fw: NcoI	<u>ACCATGG</u> TCTATACCGGGACCTCATCAGC

Gen	kalkulierte Größe	eingeführte Schnittstelle	Primersequenz
		rev: EcoRI	<u>GAATTC</u> CAATTTGTTAACATTTCTCCATCT

**Abb. 5.1 Primersequenzen und erwartete Amplifikatgröße.**

Sequenzen der für die reverse Transkription und die nachfolgende PCR verwendeten Primer. Die Erkennungssequenzen für die jeweilige Restriktions-Endonuklease und die berechnete Größe des PCR-Produkts sind angegeben.



**Abb. 5.2 Auftrennung von RNA aus 32D Zellen und der PCR-amplifizierten cDNA.**

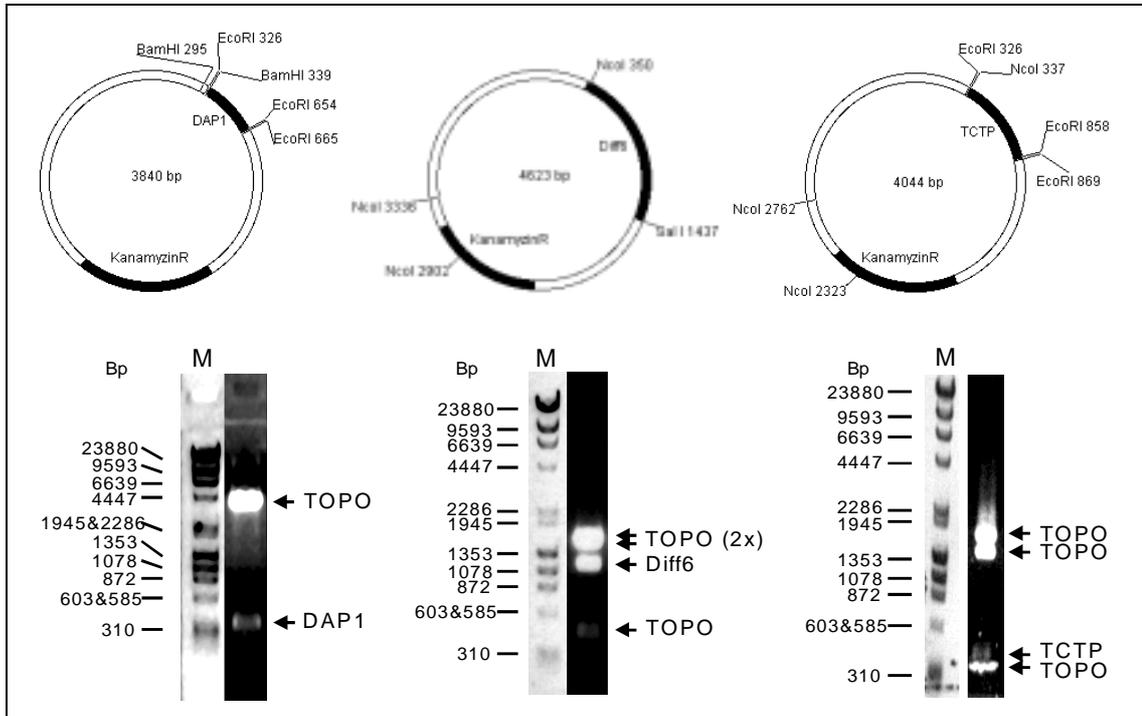
Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegele zur Auftrennung von RNA aus 32D Zellen (links) und PCR-amplifizierter cDNA (mitte und rechts). Das RNA-Gel zeigt in Spur 1 neben der über den ganzen Bereich verteilten mRNA deutlich die intakten ribosomalen RNAs. Im rechten Teil der Abbildung sind neben den einzelnen Markerspuren (M) die RT-PCR Produkte aus Reaktionen mit den Primern für DAP1 (Spur 2), Diff6 (Spur 3) und TCTP (Spur4) aufgetrennt. Die Markergrößen (M) für RNA sind in Basen angegeben, die für cDNA in Basenpaaren.

Die cDNA für DAP1 (321 Bp), Diff6 (1104 Bp) und TCTP (525 Bp) wurde gut amplifiziert und zeigte bereits nach 20 Zyklen scharfe und spezifische Banden bei den für die einzelnen Gene kalkulierten Größen. Nebenprodukte traten nicht auf. Lediglich in einzelnen Ansätzen kam es zur Amplifikation von Primerdimeren (ohne Abbildung), die aber durch Optimierung der PCR-Bedingungen vermieden werden konnten.

**5.1.1.2 Klonierung der PCR-Produkte**

Die PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch getrennt, aufgereinigt und bidirektionell in PCR®-Blunt II TOPO kloniert. Bei der anschließend durchgeführten Transfektion mittels Hitzeschock-Methode in *E. coli* wurden Transfektionseffizienzen von 10<sup>4</sup> Kolonien pro µg eingesetzter Plasmid-DNA erzielt. Einzelne Kolonien wurden sowohl als Glycerolstocks bei -80°C gelagert als auch in präparativem

Maßstab angezogen und zur Plasmidpräparation eingesetzt. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde so gespalten, dass die Fragmente für die einzelnen Gene danach unterschiedliche Überhänge an ihrem 5'- und ihrem 3'-Ende trugen. Sie konnten damit später unidirektionell kloniert werden. Die Schnittstellen für die im einzelnen verwendeten Restriktions-Endonukleasen sind in den folgenden Plasmidkarten dargestellt.



**Abb. 5.3 Klonierung der PCR-Produkte in PCR<sup>®</sup>-BluntII-TOPO.**

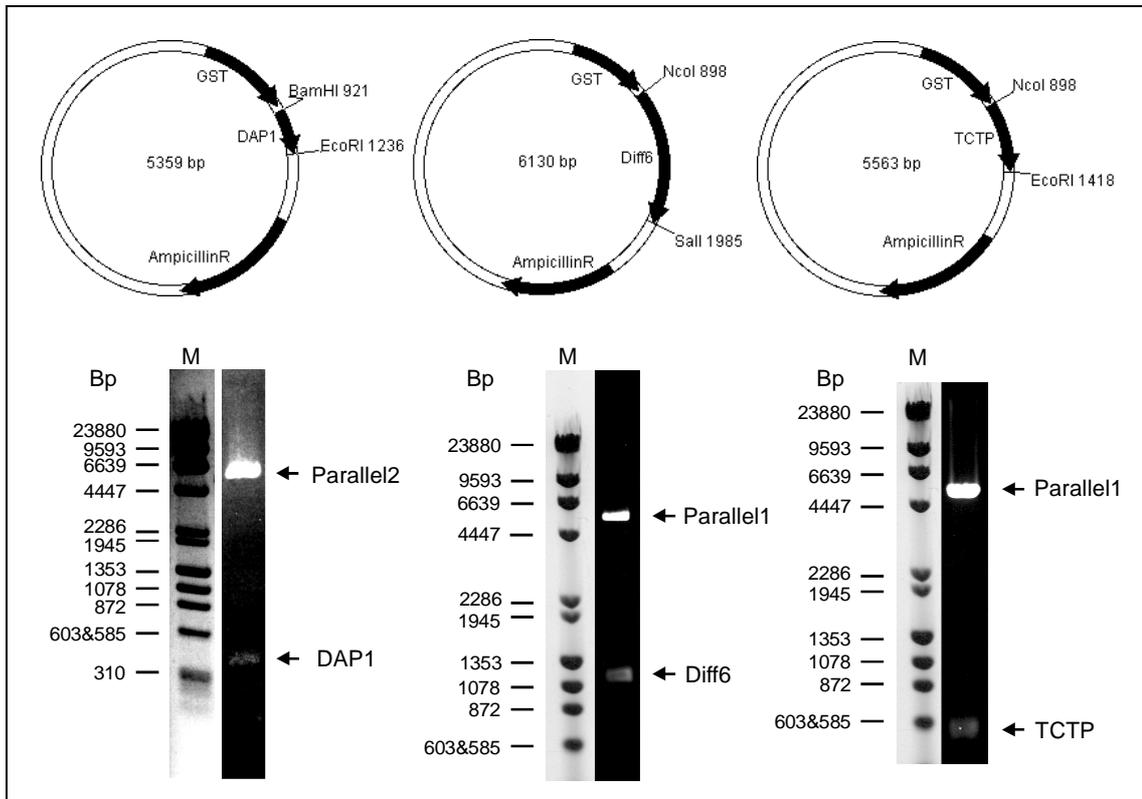
Auf den Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen sind die präparativen Restriktionsansätze der Klonierungen in PCR<sup>®</sup>-BluntII-TOPO aufgetrennt. Dabei wurde DAP1 mit *Bam*HI und *Eco*RI geschnitten (links), Diff6 mit *Nco*I und *Eco*RI (mitte) und TCTP mit *Eco*RI und *Nco*I (rechts). Dargestellt sind außerdem die jeweiligen Plasmidkarten mit den relevanten Genen und den verwendeten Schnittstellen. Die Markergrößen (M) sind in Bp angegeben.

Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung konnten die Genfragmente von den Vektorsequenzen abgetrennt, aus dem Gel ausgeschnitten und aufgereinigt werden.

### 5.1.1.3 Subklonierung der Gene in die Expressionsplasmide

Die isolierten cDNAs wurden unidirektionell in die entsprechend geschnittenen Expressionsplasmide ligiert und bei einer Transfektionseffizienz von  $10^4$  Kolonien pro  $\mu$ g eingesetzter Plasmid-DNA mittels Hitzeschock Methode in *E. coli* transfiziert. Einzelne Kolonien wurden sowohl als Glycerolstocks gelagert als auch in analytischem Maßstab angezogen und zur Plasmidpräparation eingesetzt. Die gewonnene Plasmid-DNA wurde im Rahmen einer Kontrollspaltung mit den in der

jeweiligen Plasmidkarte der folgenden Abbildung dargestellten Restriktionsenzymen behandelt und elektrophoretisch aufgetrennt.



**Abb. 5.4 Subklonierung der potentiellen PKC-Substrate in die Expressionsplasmide.**

Auf den Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen sind analytische Restriktionsansätzen der Klonierungen in die GST-Expressionsplasmide Parallel1 respektive Parallel2 aufgetrennt. Die Restriktionen erfolgten mit *Bam*HI und *Eco*RI für DAP1 (links), mit *Nco*I und *Sal*I für Diff6 (mitte) und mit *Nco*I und *Eco*RI für TCTP (rechts). Dargestellt sind außerdem die jeweiligen Plasmidkarten mit den relevanten Genen und den verwendeten Schnittstellen. Die Markergrößen (M) sind in Bp angegeben.

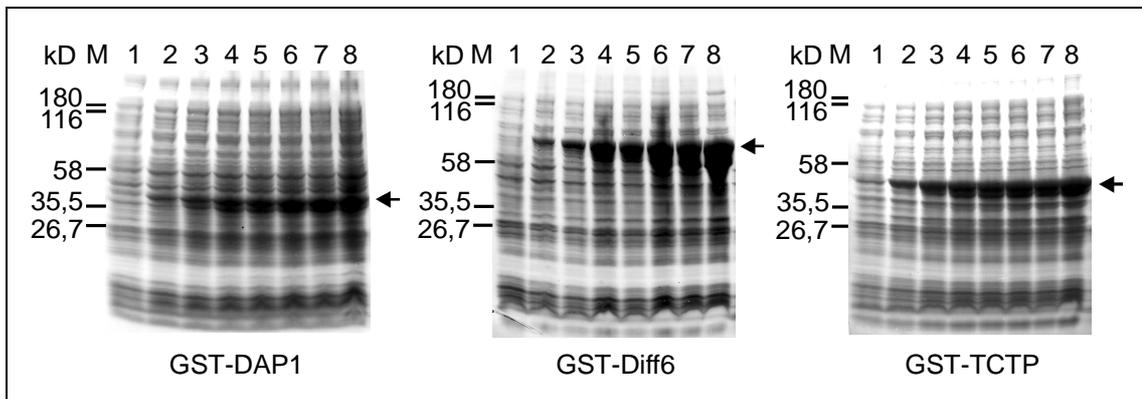
In den Kontrollspaltungen traten jeweils das Plasmidfragment sowie das Fragment für DAP1, Diff6 oder TCTP beim kalkulierten Molekulargewicht auf. Die Erzeugung von Expressionsplasmiden für alle drei Gene konnte somit gezeigt werden.

## 5.1.2 Expression von GST-DAP1, GST-Diff6 und GST-TCTP

### 5.1.2.1 Bestimmung des optimalen Erntezeitpunkts

In Expressionsanalysen nach der Induktion der Fusionsproteine wurde zunächst der optimale Erntezeitpunkt bestimmt. Dieser wurde als der Zeitpunkt angesehen, an dem das jeweilige Fusionsprotein in deutlich erhöhter Menge vorhanden war, aber noch als klare Bande im Coomassie-gefärbten Gel detektiert werden konnte. Zur Analyse wurden jeweils gleiche Volumina aus der Kultur entnommen. Die

enthaltenen *E. coli* wurden sedimentiert, direkt in Probenpuffer für die SDS-Page resuspendiert und lysiert. Nach Abtrennung der unlöslichen Bestandteile wurden gleiche Volumina über SDS-Page aufgetrennt. Die Coomassie-gefärbten Gele wurden auf das Auftreten von Signalen bei dem kalkulierten Molekulargewicht der Fusionsproteine von 43 kDa für GST-DAP1, 78 kDa für GST-Diff6 und 49 kDa für GST-TCTP untersucht.



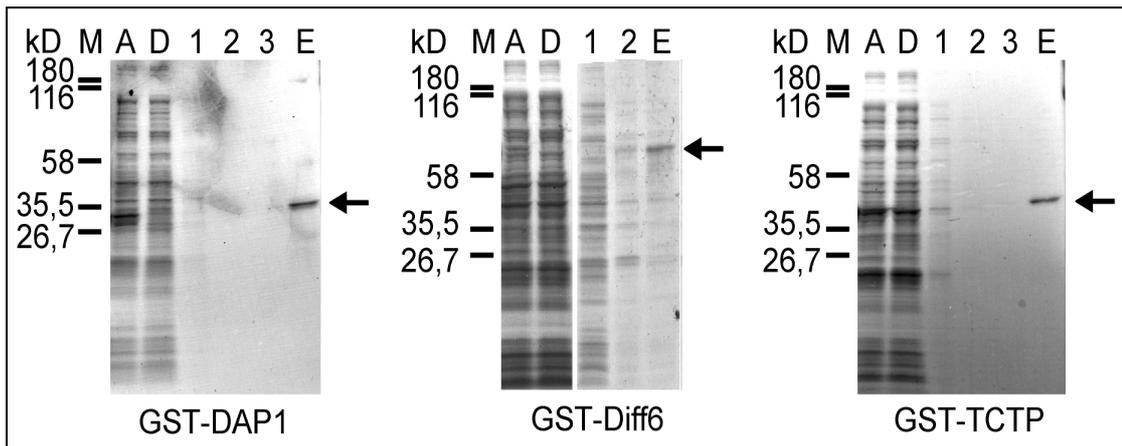
**Abb. 5.5 Expressionskinetik der Fusionsproteine.**

Dargestellt sind Coomassie-gefärbte SDS-PAGE mit den Kinetiken für die Induktion der Fusionsproteine GST-DAP1 (links), GST-Diff6 (mitte) und GST-TCTP (rechts). Gesamtllysate der *E. coli* unmittelbar vor der Induktion (Spur 1) und nach 30, 60, 90, 120, 150, 180 und 210 min Induktion mit IPTG (Spuren 2 bis 8) sind aufgetragen. Das kalkuliert Molekulargewicht für die einzelnen Proteine ist mit Pfeilen markiert. Die Markergrößen (M) sind in kDa angegeben.

Die Bandenmuster der gefärbten Gele und Messungen der optischen Dichte der *E. coli* Kultur im Verlauf der Induktion zeigten, dass es vom Beginn der Induktion an nur noch in geringem Maß zu weiterer Teilung der Bakterien oder der weiteren Bildung von *E. coli* Proteinen kam. Die durch IPTG induzierten Fusionsproteine wurden dagegen bereits nach 30 min in deutlicher Menge synthetisiert und als klare Banden bei den erwarteten Molekulargewichten sichtbar. Im Verlauf der Induktion wurde keine Degradation der Fusionsproteine beobachtet. Dennoch wurde einheitlich nach 60 min Induktion geerntet, um eine gelegentlich bei starker Expression auftretende Aggregationen der Proteine zu vermeiden.

### 5.1.2.2 Aufreinigung der rekombinanten Proteine

Jeweils 500 ml der für 60 min induzierten Kulturen wurden abzentrifugiert und in Phosphatpuffer mit Protease Inhibitormix und 1 % Triton X-100 resuspendiert. Nach der Lyse der Zellen durch Ultraschallbehandlung auf Eis wurden unlösliche Bestandteile sedimentiert und die GST-Fusionsproteine aus dem löslichen Überstand im Batchverfahren an Glutathion-Sepharose aufgereinigt.



**Abb. 5.6 Aufreinigung der Fusionsproteine.**

Dargestellt sind Coomassie-gefärbte SDS-PAGE der Aufreinigungen von GST-DAP1 (links), GST-Diff6 (mitte) und GST-Diff6 (rechts). M stellt die Markerspür dar, während in den anderen Spuren jeweils gleiche Anteile des Auftrags (Spur A), des Durchlaufs (Spur D), der einzelnen Waschschrirte (Spuren 1 bis 3) und des Eluats (Spur E) aufgetrennt sind. Die apparenten Molekulargewichte der einzelnen Fusionsproteine sind durch Pfeile markiert.

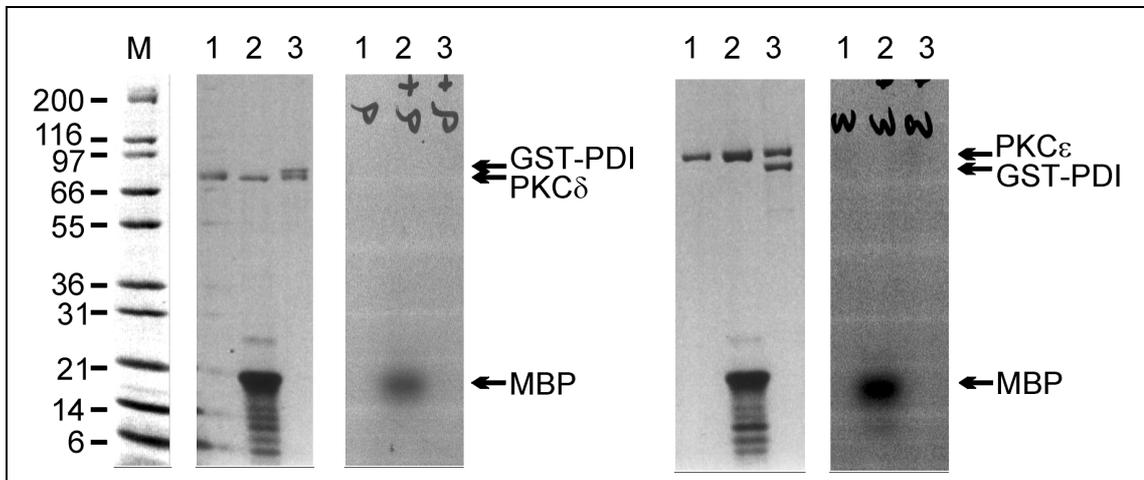
Während der überwiegende Teil der *E. coli* Proteine bereits mit dem Durchlauf abgetrennt wurde, ließen sich alle drei GST-Fusionsproteine im Batch-Verfahren mit zwei bis drei Waschschrirten in guter Reinheit und Ausbeute darstellen. Für keines der Proteine wurde eine Degradation oder partielle Degradation beobachtet. Alle drei Fusionsproteine zeigten eine klare Bande bei ihrem kalkulierten Molekulargewicht, das sich zu 43 kDa für GST-DAP1, 78 kDa für GST-Diff6 und 49 kDa für GST-TCTP errechnete.

Die mit Glutathion eluierten Fusionsproteine wurden sofort über Gelfiltrationssäulen entsalzt, mit Microfiltrationssäulen konzentriert und nach Abnahme von Aliquots für die Proteinbestimmung auf 50 % Glycerol eingestellt. Die Lagerung erfolgte in der Gegenwart von Protease Inhibitor-mix bei -20°C.

**5.1.3 *In vitro* Kinasereaktionen**

Zur Untersuchung von DAP1, Diff6, TCTP und des PDI-Homologen auf ihre Phosphorylierbarkeit durch PKC $\delta$  oder PKC $\epsilon$  wurden *in vitro* Kinasereaktionen durchgeführt. Hierzu wurden die GST-Fusionsproteine in aufgereinigter Form mit ebenfalls aufgereinigter PKC in Gegenwart von PKC-Aktivatoren und  $\gamma^{32}$ P-ATP inkubiert. Es wurden jeweils 100 ng der Fusionsproteine GST-DAP1, GST-Diff6, GST-PDI und GST-TCTP in Gegenwart von 100 ng PKC $\delta$  respektive PKC $\epsilon$  eingesetzt. Als Positivkontrolle wurde die Phosphorylierung von MBP unter den gleichen Bedingungen durchgeführt.

GST-PDI wurde nicht durch PKC $\delta$  oder PKC $\epsilon$  phosphoryliert. Zugleich wurde das Kontrollprotein MBP von beiden Isoenzymen gut phosphoryliert und bestätigte so die Wahl der korrekten Versuchsbedingungen sowie die korrekte Versuchsdurchführung.

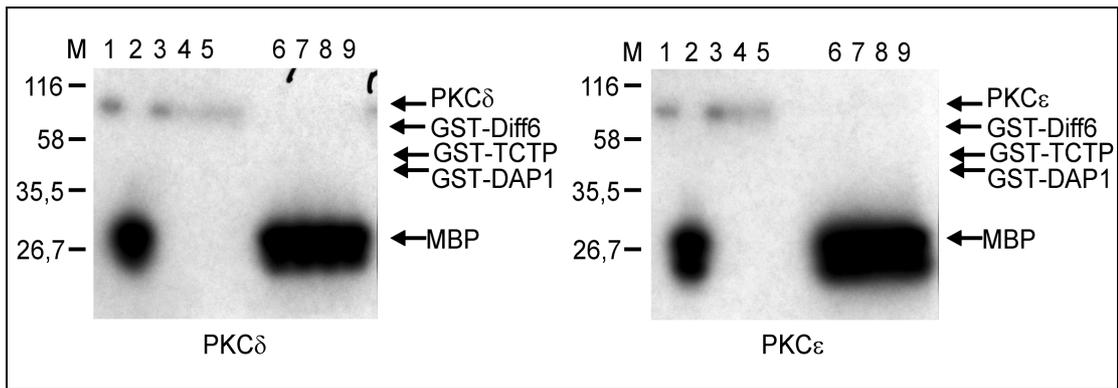


**Abb. 5.7 PKC Kinase-Reaktionen mit GST-PDI.**

SDS-PAGE und Autoradiographien mit den Reaktionsprodukten aus Kinaseassays zum Nachweis der direkten Phosphorylierbarkeit von GST-PDI durch PKC $\delta$  (links) oder PKC $\epsilon$  (rechts). M steht für Markerspur, die anderen Spuren enthalten zusätzlich zu PKC $\delta$  resp. PKC $\epsilon$  keine weiteren Proteine (Spur 1), MBP (Spur 2), GST-PDI (Spur 3). Die apparenten Molekulargewichte der einzelnen Proteine und Fusionsproteine sind durch Pfeile markiert.

Auch die Fusionsproteine GST-DAP1, GST-Diff6 und GST-TCTP wurden nicht durch PKC $\delta$  oder PKC $\epsilon$  phosphoryliert. Zugleich wurde das Kontrollprotein MBP von beiden Isoenzymen gut phosphoryliert und bestätigte so die Wahl der korrekten Versuchsbedingungen sowie die korrekte Versuchsdurchführung. In den Reaktionsansätzen ohne MBP kam es daneben zu einer leichten Autophosphorylierung der PKC, die bei langer Expositionszeit auf den Autoradiogrammen sichtbar wurde.

Um weiterhin sicher auszuschließen, dass die Präparationen der Fusionsproteine PKC-inhibitorische Komponenten enthielten, wurden Kinaseassays durchgeführt, in denen die Fusionsproteine zusammen mit MBP in einem Ansatz eingesetzt wurden. Die gereinigten Fusionsproteine zeigten auch weiterhin keine Phosphorylierung, während das im selben Ansatz vorliegende Kontrollprotein unverändert stark phosphoryliert wurde.



**Abb. 5.8 PKC Kinase-Reaktionen mit GST-DAP1, GST-Diff6 und GST-TCTP.**

Autoradiographien von SDS-PAGE mit den Reaktionsprodukten aus den Kinaseassays mit PKC $\delta$  (links) oder PKC $\epsilon$  (rechts): M steht für Markerspur, die anderen Spuren enthalten neben PKC $\delta$  (links) oder PKC $\epsilon$  (rechts) keine weiteren Proteine (Spur 1), MBP (Spur 2), GST-DAP1 (Spur 3), GST-Diff6 (Spur 4) sowie GST-TCTP (Spur 5). Daneben wurden die Reaktionsprodukte von Kinaseassays mit einer Kombination von MBP und den potentiellen Substraten aufgetrennt: In den einzelnen Spuren sind die Produkte der Kinasereaktionen mit MBP allein (Spur 6) sowie mit Kombinationen von MBP und GST-DAP1 (Spur 7), MBP und GST-Diff6 (Spur 8) sowie MBP und GST-TCTP (Spur 9) aufgetragen. Die apparenten Molekulargewichte der einzelnen Proteine und Fusionsproteine sind durch Pfeile markiert.

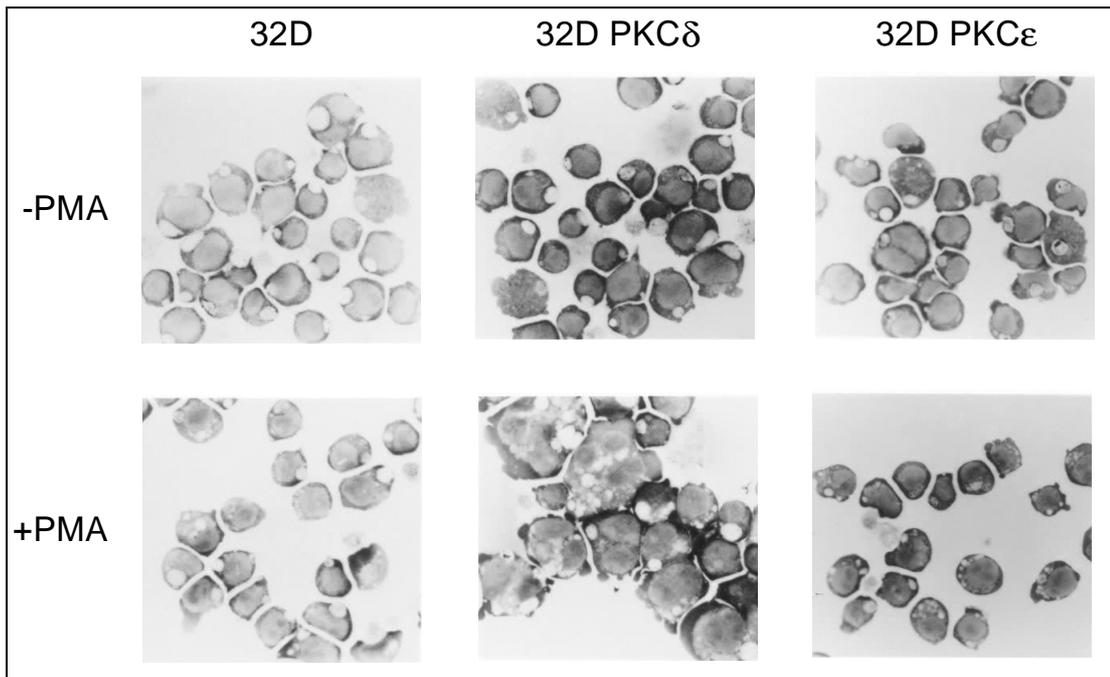
Nachdem gezeigt war, dass keines der potentiellen PKC-Substrate durch PKC $\delta$  oder PKC $\epsilon$  phosphoryliert wird, wurden in Erweiterung der initialen Fragestellung zusätzlich entsprechende Kinaseassays mit PKC $\alpha$  durchgeführt. Diese Reaktionen zeigten ebenfalls keine Phosphorylierung der o.g. Proteine (ohne Abbildung).

## 5.2 Proteinkinase C regulierte Genexpression

### 5.2.1 Charakterisierung der verwendeten 32D Zelllinien

#### 5.2.1.1 Differenzierung der Zellen durch Phorbolster

Zur Untersuchung von Phorbolster-induzierten Veränderungen in der Morphologie der Zellen wurden exponentiell wachsende 32D, 32D PKC $\delta$ - und 32D PKC $\epsilon$ -Zellen mit 10 nM PMA stimuliert und im Lichtmikroskop beobachtet.



**Abb. 5.9 Morphologie von 32D, 32D PKC $\delta$ - und 32 DPKC $\epsilon$ -Zellen.**

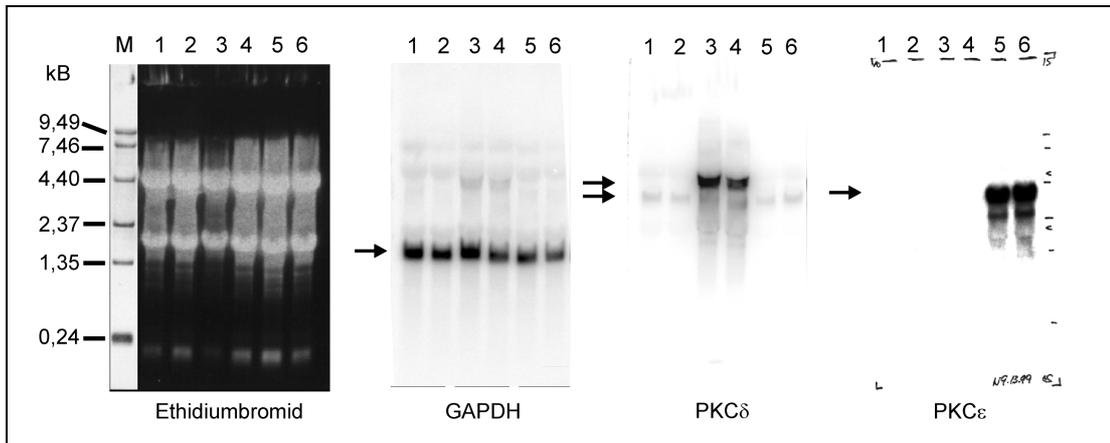
In der oberen Reihe sind lichtmikroskopische Aufnahmen unstimulierter Zellen abgebildet, in der unteren Reihe Zellen nach vierstündiger Stimulierung mit 10 nM Phorbol ester.

32D und 32D PKC $\epsilon$ -Zellen zeigten nach einer Stimulierung mit PMA keine auffälligen Änderungen in ihrer Morphologie. Darüber hinaus zeigten sie lediglich eine marginale Steigerung ihrer Adhäsionsneigung. Beides änderte sich jedoch stark bei der Stimulierung der 32D PKC $\delta$ -Zellen. Diese PKC $\delta$ -überexprimierenden Zellen zeigten bereits unstimuliert eine leichte Adhäsionstendenz und adhärten nach Stimulierung mit Phorbol ester innerhalb von 4 h zu großen Teilen fest an die Kulturschalen. Daneben kam es in einer Reihe von Zellen zu einer zwei- bis dreifachen Volumenzunahme und der verstärkten Ausbildung granulärer Strukturen.

### 5.2.1.2 Bestätigung der PKC-Überexpression auf mRNA-Ebene

Um die verwendeten Zellen auf die Expression der PKC $\delta$ - bzw PKC $\epsilon$ -mRNA zu überprüfen, wurde Gesamt-RNA aus unstimulierten und aus 30 min mit 10 nM PMA stimulierten 32D, 32D PKC $\delta$ - und 32D PKC $\epsilon$ -Zellen isoliert. Der hierzu verwendete zweistufige Ansatz mit der Kombination von Säulenchromatographie und Trizolextraktion bedingte dabei im Vergleich mit einem einstufigen Reinigungsprozess einen zusätzlichen RNA-Verlust von 15 - 20%. Dieser zusätzliche Verlust wurden aber in Kauf genommen, um eine größtmögliche Reinheit der RNA für die später folgenden cDNA-Array Untersuchungen zu gewährleisten. Die aufgereinigte RNA wurde mittels denaturierender Agarosegel-

Elektrophorese aufgetrennt, im Kapillarblot auf Nitrozellulosemembran übertragen und mit genspezifischen Sonden hybridisiert. .



**Abb. 5.10 Northern-Gel und Northern-Hybridisierung mit Gesamt-RNA.**

Auftrennung von Gesamt-RNA isoliert aus 32D Zellen (Spur 1), 32D Zellen nach 30 min PMA (Spur 2), 32D PKC $\delta$ -Zellen (Spur 3), 32D PKC $\delta$ -Zellen nach 30 min PMA (Spur 4), 32D PKC $\epsilon$ -Zellen (Spur 5), 32D PKC $\epsilon$ -Zellen nach 30 min PMA (Spur 6) und der Markerspur (M).

Das Ethidiumbromid-gefärbte Gel zeigt bereits die hohe Integrität der isolierten RNA: Große Transkripte wurden nicht degradiert, und die ribosomalen Banden sind deutlich und scharf sichtbar. Auch die Kontrollhybridisierung mit GAPDH bestätigte durch die einheitliche und definierte Hybridisierung die gute Qualität der RNA.

Alle drei Zelllinien zeigten bei Hybridisierungen mit der gegen PKC $\delta$ -mRNA gerichteten Sonde ein einheitliches Signal bei 4,0 kB, der Größe natürlicher PKC $\delta$ -mRNA. Die aus 32D PKC $\delta$ - und PMA-stimulierten 32D PKC $\delta$ -Zellen isolierte RNA zeigte darüber hinaus das erwartete starke Signal bei 4,4 kB. Dieses mRNA-Transkript ist aufgrund längerer untranslatierter 5'-Bereiche um 400 Basenpaare größer als das natürliche und wird vom stabil in das Zellgenom integrierten LTR-PKC $\delta$  abgelesen. Die codierende und translatierte Sequenz entspricht dabei weiterhin der natürlichen PKC $\delta$  Sequenz.

Ein entsprechendes Bild zeigte sich für die Hybridisierung mit einer Sonde gegen PKC $\epsilon$ -mRNA: Hier zeigte die aus 32D PKC $\epsilon$ -Zellen und PMA-stimulierten 32D PKC $\epsilon$ -Zellen isolierte RNA das erwartete starke Signal bei 4,2 kB, das der von stabil integrierten LTR-PKC $\epsilon$  abgelesenen mRNA entspricht. In den anderen Zelllinien konnte dagegen keine mRNA-Expression für PKC $\epsilon$  gezeigt werden. Eine Quantifizierung der Signale für PKC $\delta$  mittels NIH-Image ergab die folgenden Werte:

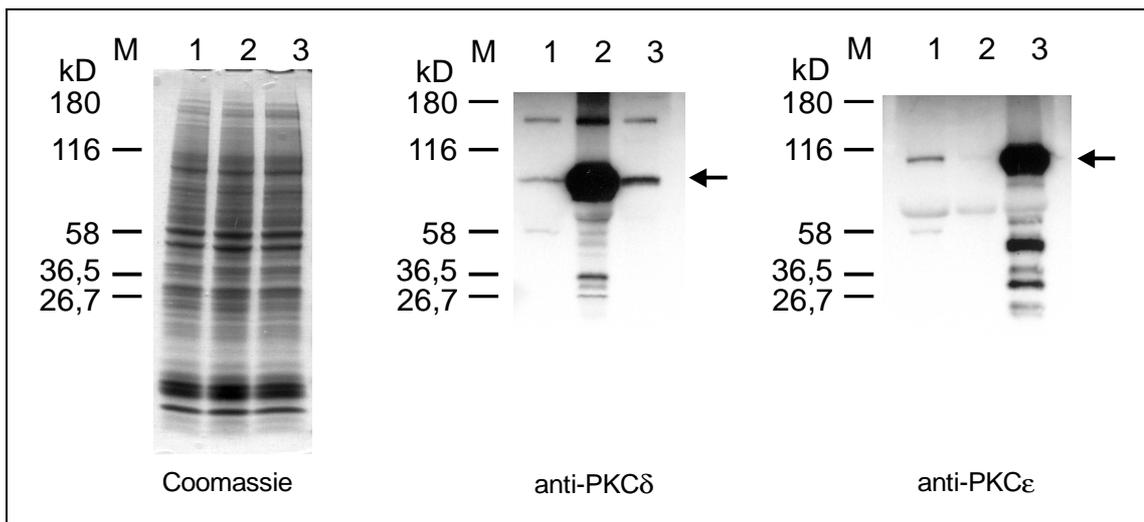
	32D	32D +PMA	32D PKC $\delta$	32D PKC $\delta$ +PMA	32D PKC $\epsilon$	32D PKC $\epsilon$ +PMA
PKC $\delta$	1,0	1,2	1,3	1,2	1,4	1,3
LTR-PKC $\delta$	-	-	8,9	8,5	-	-

**Abb 5.11 Quantifizierung der mRNA-Expression von PKC $\delta$ .**

Die Expressionen sind auf GAPDH kalibriert und auf die PKC $\delta$ -Expression in unstimulierten 32D Zellen normiert. Die Daten entsprechen einem repräsentativen Einzelversuch.

### 5.2.1.3 Bestätigung der PKC-Überexpression auf Proteinebene

Zur Untersuchung der Expression von PKC $\delta$  und PKC $\epsilon$  in den einzelnen Zelllinien wurden die Zellen geerntet, gewaschen und in der Gegenwart von Proteaseinhibitoren aufgeschlossen. Jeweils 25  $\mu$ g Protein wurden dann mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran transferiert und mit Antikörpern gegen PKC $\delta$  bzw. PKC $\epsilon$  inkubiert. Die Detektion auf Röntgenfilm erfolgte mittels Peroxidase-gekoppeltem sekundären Antikörpern unter Einsatz eines ECL-Kits.



**Abb. 5.12 SDS-Page und Western-Hybridisierung.**

Dargestellt sind SDS-Page und Western-Hybridisierung mit Gesamt-Protein isoliert aus 32D Zellen (Spur 1), 32D PKC $\delta$ -Zellen (Spur 2) und 32D PKC $\epsilon$ -Zellen (Spur 3).

Die immunchemische Färbungen wurden mit Antikörpern gegen PKC $\delta$  (mitte) und PKC $\epsilon$  (rechts) durchgeführt.

Die zuvor auf mRNA-Ebene gezeigte starke Überexpression von PKC $\delta$  in 32D PKC $\delta$ -Zellen und von PKC $\epsilon$  in 32D PKC $\epsilon$ -Zellen konnte dabei auch auf Proteinebene bestätigt werden. Insbesondere wurde hier deutlich, dass die überexprimierten Proteine ein einheitliches Produkt vom erwarteten Molekulargewicht bildeten und keine bedeutende Degradation stattfand. In den

Westernblots konnte daneben, anders als im Northernblot, auch eine basale Expression von PKC $\epsilon$  in den 32D Zellen gezeigt werden. In den 32D PKC $\delta$ -Zellen konnte dagegen auch bei erhöhter Antikörperkonzentration, längerer Inkubationszeit und langer Exposition des Films kein PKC $\epsilon$ -Signal detektiert werden.

Eine Quantifizierung der Blots für die unstimulierten Zellen ergab die folgenden Werte:

	32D	32D PKC $\delta$	32D PKC $\epsilon$
PKC $\delta$	1	12	1,5
PKC $\epsilon$	1	-	10

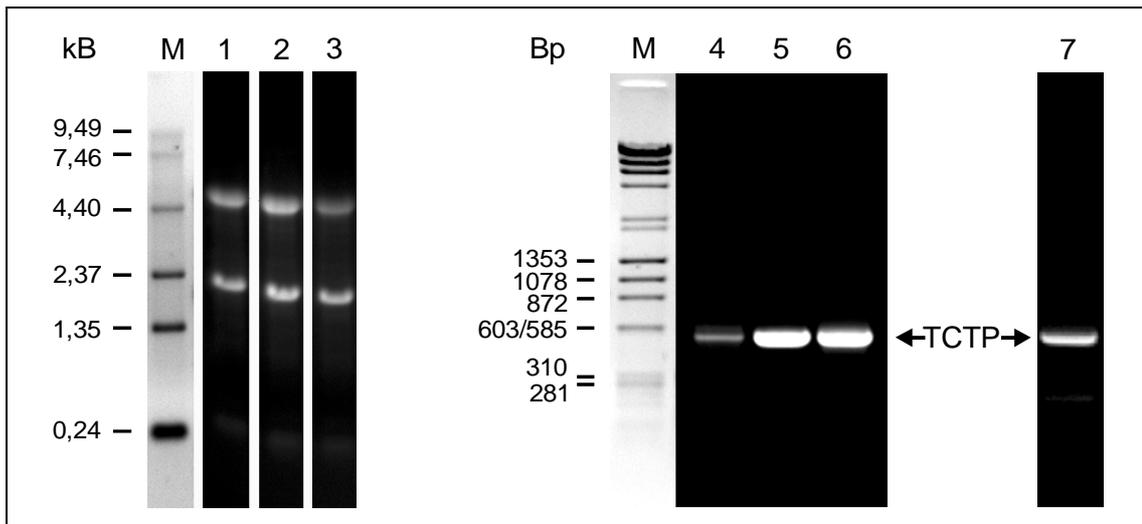
**Abb 5.13 Quantifizierung der Expression von PKC $\delta$  und PKC $\epsilon$ .**

Die Werte sind auf die Expression des jeweiligen Isoenzym in den 32D Zellen normiert. Die Daten entsprechen einem repräsentativen Einzelversuch.

Mischak et al. (1993) haben bereits zuvor gezeigt, dass die verwendeten als pLTR-Konstrukte in die 32D Zellen eingeführten und überexprimierten PKCs funktional sind.

### 5.2.2 Überprüfung ausgewählter Genexpressionen mit RT-PCR

Im Zuge der Klonierung von DAP1, Diff6 und TCTP waren spezifische Primer für die Gene dieser Proteine gefunden und spezifische PCRs etabliert worden. Damit war die Grundlage für eine Expressionsanalyse dieser Gene durch RT-PCR vorhanden. Es wurde im folgenden untersucht, ob die Überexpression von PKC $\delta$  oder PKC $\epsilon$  in 32D Zellen einen Einfluß auf die Expression der mRNA der o.g. Proteine hat. Für diese Untersuchungen wurden je 25  $\mu$ g Gesamt-RNA aus 32D, 32D PKC $\delta$ - und 32D PKC $\epsilon$ -Zellen in reversen Transkriptionen mit oligo-dT Primern in mRNA-cDNA Hybride umgeschrieben. Jeweils 5% dieser Reaktion wurden dann direkt mit den Primern für das jeweilige Gen in einzelne PCR-Reaktionen eingesetzt. Durch die Begrenzung auf 20 Zyklen wurde ein Eintritt der PCR in die Plateauphase vermieden und eine semiquantitative Analyse ermöglicht. Eine Amplifikation mit RNA aus Mäusehirn diente dabei als Positivkontrolle für die Reaktion und der Erzeugung eines zusätzlichen Molekulargewichtsstandards.



**Abb. 5.14 Semiquantitative RT-PCR für TCTP.**

Links in der Abbildung ist die Auftrennung der verwendeten RNA auf einem denaturierenden Gel dargestellt. M ist die Markerspur, daneben ist RNA aus 32D Zellen (Spur 1), 32D PKC $\delta$ -Zellen (Spur2) und 32D PKC $\epsilon$ -Zellen (Spur 3) aufgetragen. Rechts im Bild sind die Produkte der RT-PCR mit Primern für TCTP auf einem nicht-denaturierende Gel aufgetrennt. M ist die Markerspur, in den übrigen Spuren sind gleiche Volumina der Reaktionen mit RNA aus 32D Zellen (Spur 4), 32D PKC $\delta$ -Zellen (Spur5) und 32D PKC $\epsilon$ -Zellen (Spur 6) aufgetragen. In Spur 7 ist zum Größenvergleich das Reaktionsprodukt einer RT-PCR mit mRNA aus Mäusehirn aufgetragen. Die Größe des RNA-Markers ist in kilo Basen angegeben, die des DNA-Markers in Basenpaaren.

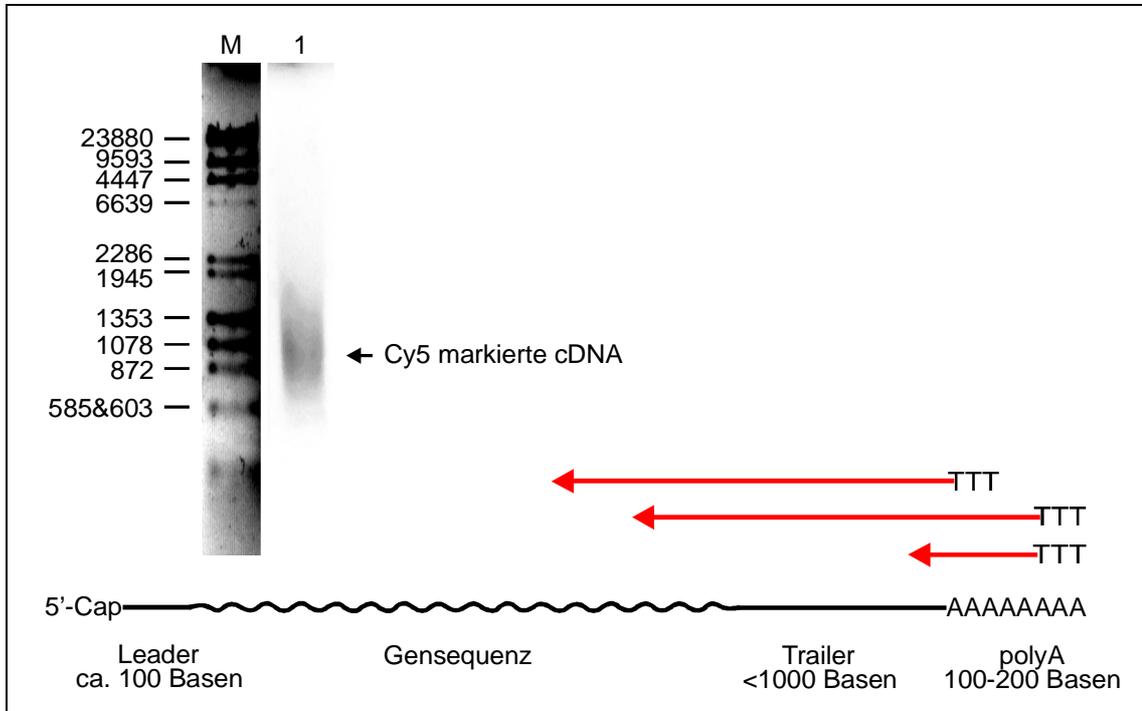
Bei diesen Untersuchungen konnte kein eindeutiger Zusammenhang zwischen der PKC-Überexpression und der DAP1 sowie der Diff6 mRNA-Expression gezeigt werden (ohne Abbildung). Für TCTP zeigten sich dagegen deutliche Intensitätsunterschiede in den Banden der einzelnen cDNAs. Das cDNA Signal und damit auch die TCTP mRNA Menge in den 32D PKC $\delta$ - und den 32D PKC $\epsilon$ -Zellen war relativ zu dem der 32D Zellen auf das etwa zehnfache erhöht.

## 5.2.3 Etablierung der cDNA-Array Untersuchungen

### 5.2.3.1 Überprüfung der RNA-Qualität auf cDNA-Array Ebene

Auch RNA, deren Qualität für andere molekularbiologische Anwendungen wie Northernblots oder reverse Transkriptionen ausreicht, liefert in cDNA-Array Untersuchungen gelegentlich schlechte Ergebnisse. Durch den Einsatz des oben beschriebenen zweistufigen Reinigungsprozesses sollten mögliche Verunreinigungen weitgehend vermieden werden. Um die Eignung der verwendeten RNAs jedoch sicher zu gewährleisten, wurden zunächst Probe-Reaktionen und Hybridisierungen durchgeführt.

Hierzu wurden 100 µg RNA aus 32D PKC $\delta$ -Zellen in Gegenwart von dUPT-Cy5 und 50 µg RNA aus 32D PKC $\epsilon$ -Zellen in Gegenwart von UTP-Cy3 revers transkribiert und dabei fluoreszenzmarkiert. Die folgende Abbildung zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung von Cy5-markiertem Produkt:

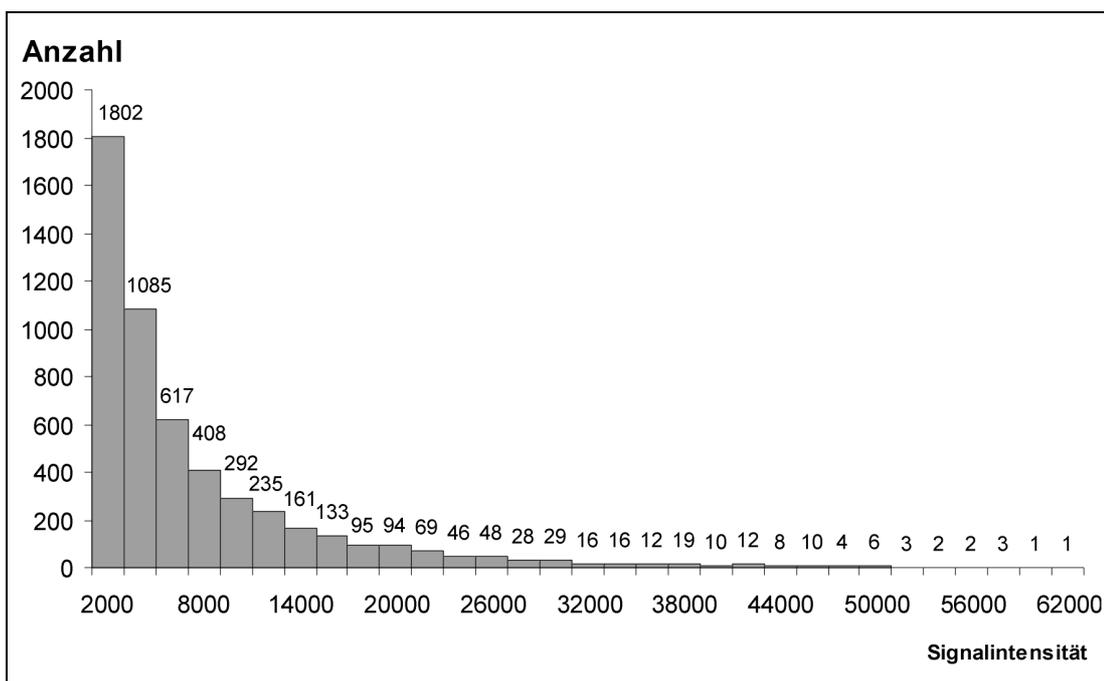


**Abb. 5.15 Reverse Transkription in der Gegenwart von Cy5-UTP.**

Links ist die Elektrophorese des Produkts einer reversen Transkription von cytosolischer RNA in Gegenwart von Cy5-UTP dargestellt. Die Markerbanden (M) sind durch Anfärbung mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht, die Cy5-markierte cDNA (1) aufgrund der Fluoreszenz des inkorporierten Cy5-UTP bei 635 nm. Darunter ist beispielhaft die Struktur eukaryotischer mRNA zusammen mit einigen möglichen cDNAs (rote Pfeile) dargestellt.

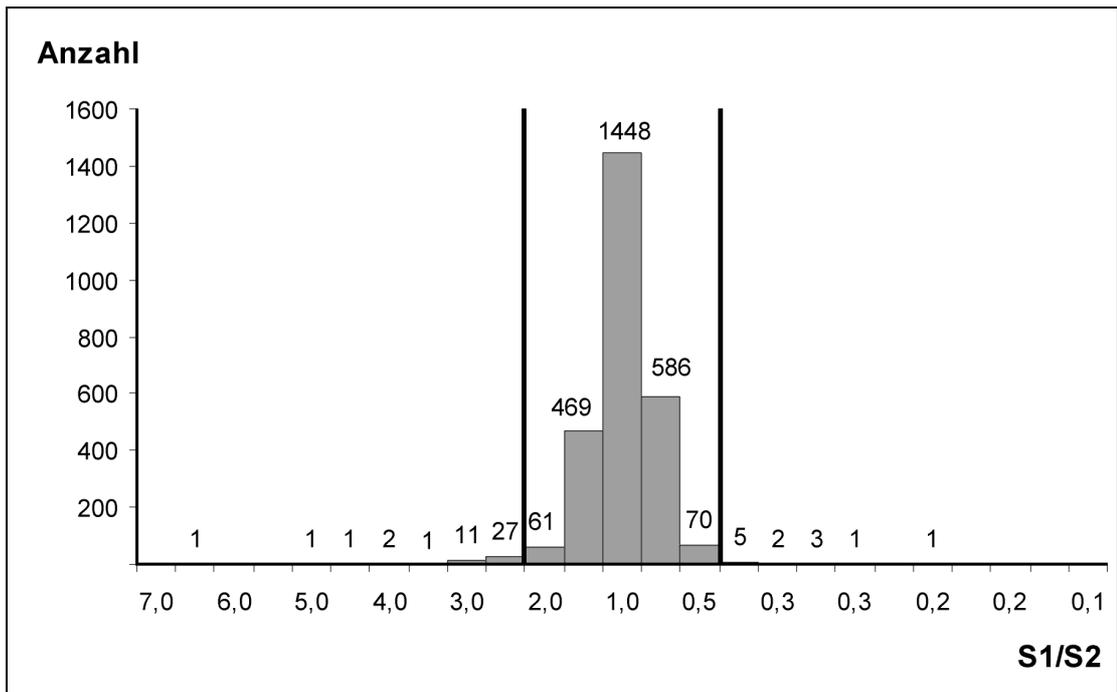
Aufgrund der geringen Menge des entstandenen Produkts war eine Detektion mittels Ethidiumbromidfärbung nicht möglich. Die Cy5-markierte cDNA konnte aber aufgrund ihrer Fluoreszenz bei 635 nm auf einem Storm-Scanner sichtbar gemacht werden und zeigte eine Länge von 600 bis 1.900 Bp. Wahrscheinlich entstanden auch größere Transkripte, die jedoch aufgrund der mangelnden Empfindlichkeit des Analysegeräts nicht sichtbar gemacht werden konnten. Cy3-markiertes Produkt mit einer Fluoreszenz bei 532 nm konnte dagegen nicht detektiert werden, da der Scanner für diese Wellenlänge nicht empfindlich ist (ohne Abbildung). Durch einen Vergleich der cDNA Länge mit der beispielhaften mRNA Struktur im unteren Teil der Abbildung wird deutlich, dass auch unter ungünstigen Bedingungen, d.h. Trailern von bis zu 1.000 Basen, spezifische cDNA-Transkripte für die codierende Gensequenz gebildet werden konnten.

Die gereinigten fluoreszenzmarkierten Transkriptionsprodukte wurden vereinigt und in einem Hybridisierungsansatz mit dem NCI-*mus musculus*-4x26x26 cDNA-Array (NCI mouse Oncochip) über Nacht bei 65°C hybridisiert. Die Arrays wurden intensiv gewaschen, getrocknet und umgehend auf einem Genepix 4000 Scanner gelesen. Die Analyse der Daten mittels GenePix 2.0 Software zeigte ein klares Hybridisierungsbild mit niedriger Hintergrundfluoreszenz und einer Verteilung der gemessenen Signalintensitäten von der unteren bis zur maximalen Detektionsgrenze. Hierbei zeigte sich auch eine kalibrierungsbedingte Häufung der Intensitäten bei der unteren Hälfte der Signalintensität.



**Abb. 5.16 Kumulierte Häufigkeiten für die gemessenen Signalintensitäten.**  
Die Werte für Cy3 und Cy5 sind gemeinsam aufgetragen.

Zur Abschätzung der Expression eines Gens relativ zu dessen Expression in der Kontrolle wird der Quotient aus den beiden Signalintensitäten gebildet. Definitionsgemäß bedeutet dabei ein Quotient  $> 1$  eine stärkere Expression in der Cy5-markierten Probe, ein Quotient  $< 1$  eine stärkere Expression in der Cy3-markierten Probe.

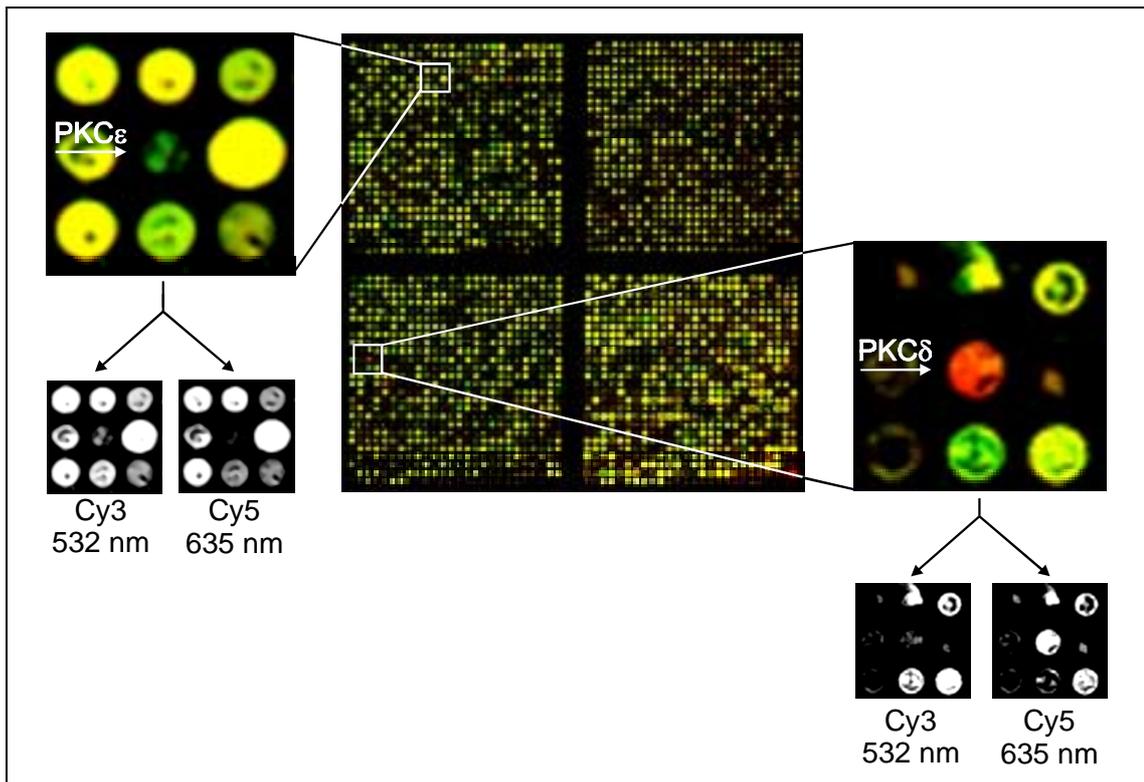


**Abb. 5.17 Kumulierte Häufigkeiten in Abhängigkeit vom Signalverhältnis.**

S1/S2 ist der Quotient aus den kalibrierten Signalintensitäten der Cy5- und der Cy3-markierten Probe für die einzelnen Gene. Das sogenannte Vertrauensintervall ( $S1/S2 < 0,5$  und  $S1/S2 > 2$ ) ist durch senkrechte Linien gekennzeichnet.

Hier zeigte sich für die einzelnen Gene eine Häufung der kalibrierten Signalintensitäts-Quotienten bei einem Wert von 1. Dies bedeutet eine gleichstarke Expression der jeweiligen RNA in beiden eingesetzten Proben für die überwiegende Mehrzahl der betrachteten Gene. In den Graphen ist auch das sog. Vertrauensintervall eingezeichnet. Hier ist angedeutet, dass i.d.R. nur solche Signale als differenziell eingestuft werden, deren Verhältnis mindestens Faktor 2 beträgt.

Durch den Einsatz Cy5-markierter RNA aus 32D PKC $\delta$ -Zellen und Cy3-markierter RNA aus 32D PKC $\epsilon$ -Zellen war es weiterhin möglich, die Hybridisierung direkt anhand der Signale für die bereits in Northern- und Westernblot nachgewiesene Überexpression von PKC $\delta$ - bzw. PKC $\epsilon$ -mRNA in diesen Zellen zu überprüfen.



**Abb. 5.18 cDNA-Hybridisierung 32D PKC $\delta$  versus 32D PKC $\epsilon$ .**

Maus Oncochip, hybridisiert mit 32D PKC $\delta$ -Cy5 cDNA (rot) und 32D PKC $\epsilon$ -Cy3 cDNA (grün). Die Bereiche mit der cDNA für PKC $\delta$  und PKC $\epsilon$  sind vergrößert und mit einer Aufspaltung der Fluoreszenz auf die beiden Kanäle dargestellt.

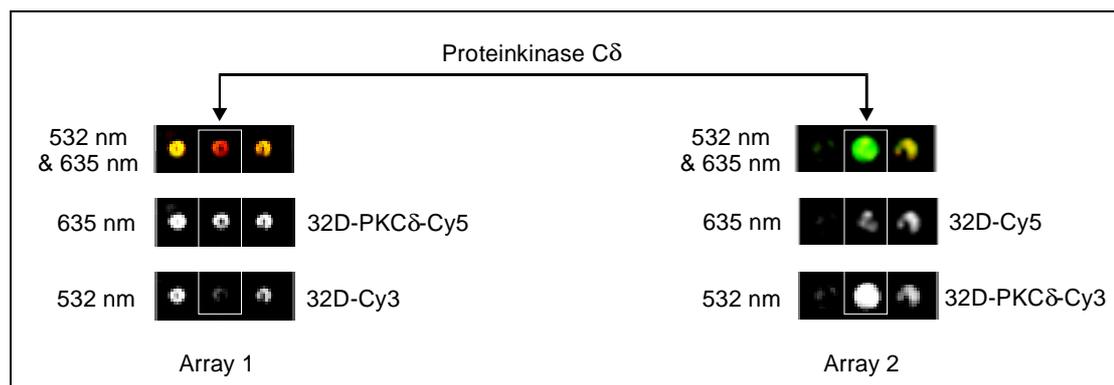
Für PKC $\delta$  zeigte sich die aus der Northernblotanalyse erwartete basale Expression in den 32D PKC $\epsilon$ -Zellen sowie die starke Expression in den überexprimierenden 32D PKC $\delta$ -Zellen. Für PKC $\epsilon$  zeigte sich, ebenfalls in Übereinstimmung mit der Northernblotanalyse, keine Expression in den 32D PKC $\delta$ -Zellen sowie eine detektierbare Expression in den 32D PKC $\epsilon$ -Zellen. Das Signal für PKC $\epsilon$  war allerdings deutlich schwächer als das für PKC $\delta$ .

Ein entsprechendes Ergebnis zeigte auch die Wiederholung des Experiments mit ausgetauschten Fluorophoren: Cy3-markierte cDNA aus 32D PKC $\delta$ -Zellen und Cy5-markierte cDNA aus 32D PKC $\epsilon$ -Zellen. Der PKC $\epsilon$ -Spot zeigte unabhängig von der verwendeten RNA auch in allen folgenden Experimenten und mit cDNA-Arrays aus drei verschiedenen Druckserien ein entsprechendes schwaches Hybridisierungssignal. Eine Sequenzierung des zur Herstellung der gespotteten DNA verwendeten Klons bestätigte, dass es sich bei der gespotteten cDNA um einen Teil der PKC $\epsilon$ -Sequenz handelte. Die Ursache für dieses schwache und reproduzierbar ungleichförmige Hybridisierungssignal liegt wahrscheinlich in einem Herstellungsfehler, z.B. während der PCR-Amplifizierung des PKC $\epsilon$ -Fragments.

### 5.2.3.1.1 Reverse-labeling Experiment zur Überprüfung der Verlässlichkeit von reverser Transkription und Hybridisierung

In der cDNA-Array Analyse sind reproduzierbare und vom verwendeten Fluorophor unabhängige Hybridisierungen notwendig. Der Vergleich des folgende Arraypaars zeigte, dass diese Voraussetzung erfüllt war. Auf beiden Arrays wurde die untersuchte RNA zusammen mit der Standard-RNA in der Hybridisierung eingesetzt. Beide Arrays unterschieden sich jedoch in der Fluoreszenzmarkierung der RNAs. Aufgrund des Austauschs der Fluorophoren musste ein Spot, der auf dem ersten Array ein Signal bei 635 nm (rot) liefert, auf dem zweiten Array ein Signal bei 532 nm (grün) liefern.

	UTP-Cy3 markiert	UTP-Cy5 markiert
Array 1	32D RNA	32D PKC $\delta$ RNA
Array 2	32D PKC $\delta$ RNA	32D RNA



**Abb. 5.19 Reverse labeling Versuche 32D versus 32D PKC $\delta$ .**

Der jeweils mittlere Spot stellt PKC $\delta$  dar. Auf Array 1 ist Cy3-markierte 32D cDNA zusammen mit Cy5-markierter 32D PKC $\delta$ -cDNA hybridisiert. Für Array 2 wurden die gleichen RNAs verwendet, jedoch wurde hier in die reverse Transkriptionen mit dem jeweils anderen Fluorophor durchgeführt.

Für beide Arrays lieferte die mit der 32D PKC $\delta$ -RNA gebildete cDNA das deutlich stärkere Fluoreszenzsignal im PKC $\delta$ -Spot. Die benachbarten Spots zeigten dagegen die gleiche Intensität für beide Kanäle. Es war somit gezeigt, dass die Hybridisierung unabhängig vom eingesetzten Fluorophor funktionierte. Insgesamt zeigten die beiden Hybridisierungen eine gute Reproduzierbarkeit.

---

### 5.2.3.2 Vergleich von Array-, Northernblot- und Westernblot-Untersuchungen

Zum Vergleich der einzelnen Methoden wurde RNA und Protein aus 32D und aus 32D PKC $\delta$ -Zellen isoliert. Northernblots mit jeweils 15  $\mu$ g RNA pro Spur, Westernblots mit jeweils 25  $\mu$ g Protein pro Spur und cDNA-Arrays mit 50  $\mu$ g RNA für die Cy3-markierten und 100  $\mu$ g für die Cy5-markierten RNAs verwendet. Northern- und Westernblots wurden mittels NIH-Image Software quantifiziert, die Arraydaten wurden direkt aus der GenePix 2.0 Auswertung entnommen.

	Western Blot	Nothern Blot	cDNA-Array
32D Zellen	1	1	1
32D PKC $\delta$ -Zellen	12	10	3

**Abb. 5. 20 Vergleich der mit verschiedener Methoden gemessenen PKC $\delta$ -Expression.** Alle Werte sind auf die PKC $\delta$ -Expression in 32D Zellen normiert und zeigen repräsentative Einzelergebnisse.

Während die Quantifizierung der Northern- und Westernblots eine gut 10-fache Steigerung der PKC $\delta$ -RNA bzw. des PKC $\delta$ -Proteins zeigte, ergab die Arrayanalyse lediglich den dreifachen Fluoreszenzwert für die 32D PKC $\delta$ -Zellen relativ zu den 32D Zellen. Da PKC $\epsilon$  im Northern Blot nicht nachgewiesen werden konnte, wurde dieser Vergleich hier nicht durchgeführt. Die Western- und cDNA-Array-Daten zeigten aber auch für PKC $\epsilon$  eine Übereinstimmung. Damit wurde für PKC $\delta$  und PKC $\epsilon$  eine qualitative Übereinstimmung der Daten aus allen drei Systemen gezeigt.

### 5.2.3.3 Identifizierung differentiell exprimierte Gene durch cDNA-Array Analyse

#### 5.2.3.4 Adhäsionsmoleküle und Lipocortin 1

Bereits in 5.2.1.1 ist die unterschiedliche Reaktion der verwendeten Zelllinien auf eine Stimulierung mit Phorbol ester dargestellt worden: Während sich die Morphologie und das Adhäsionsverhalten der 32D und 32D PKC $\epsilon$ -Zellen praktisch nicht veränderte, adhärten die stimulierten 32D PKC $\delta$ -Zellen deutlich, flachten ab und nahmen im Durchmesser zu. Mit Hilfe der cDNA-Array Methode wurden daher zunächst die zugänglichen mRNAs für diverse am Adhäsionsprozeß beteiligte Proteine untersucht.

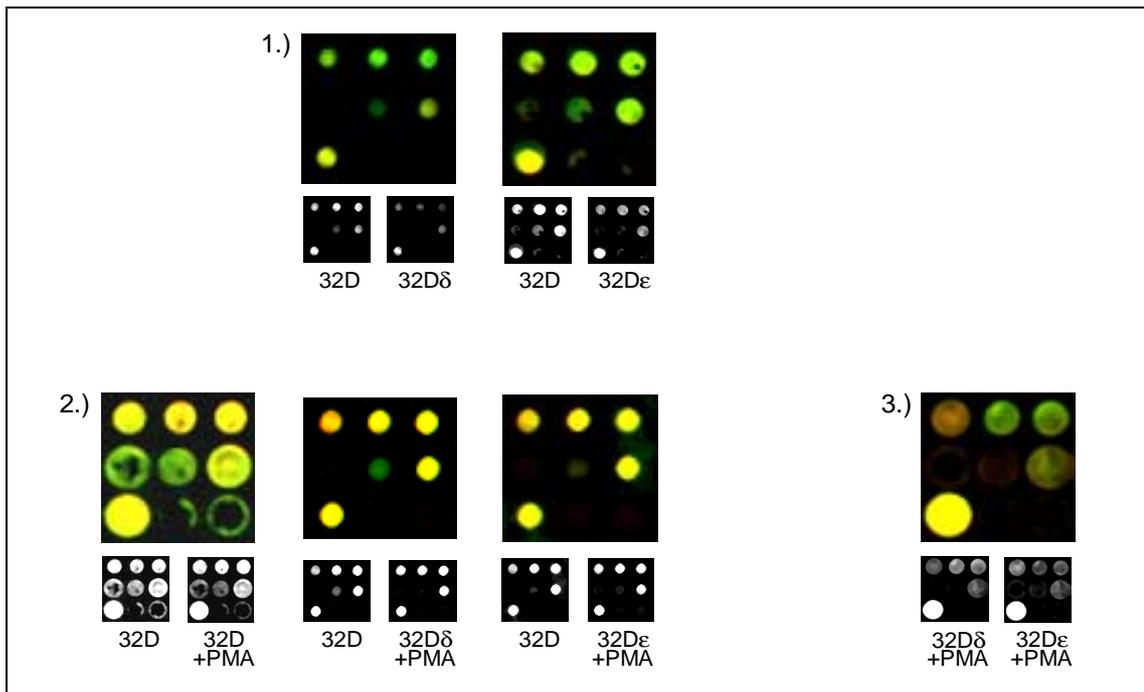
Die Expression dieser mRNAs war 30 min nach der Stimulierung unverändert bzw. schwach und nicht reproduzierbar verändert. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die untersuchten mRNAs:

	32D +PMA	32D PKC $\delta$	32D PKC $\delta$ +PMA	32D PKC $\epsilon$	32D PKC $\epsilon$ +PMA
Cadherin 11	=	=	=	=	=
Cadherin-N	=	=	=	+	=
Cadherin-P	=	=	=	=	=
Desmoplakin	=	=	=	+	=
ICAM-2	=	+?	=	+?	=
ICAM-3	=	=	=	=	=
Integrin $\alpha$ 6	=	+	=	+?	=
Integrin $\beta$ 1	=	=	=	?	?
Integrin $\beta$ 5	=	=	=	=	=
Integrin $\beta$ 7	=	-?	-?	-?	-?

**Abb. 5.21 Auflistung verschiedener am Adhäsionsprozeß beteiligter Proteine**

Angeführt ist jeweils die Veränderung der mRNA-Expression relativ zur Expression in 32D Zellen. Dabei steht „=“ für eine unveränderte Expression, „-“ für eine gegenüber 32D Zellen verminderte Expression und „+“ für eine gegenüber 32D Zellen erhöhte Expression. Die mit „?“ markierten Ergebnisse waren nicht eindeutig oder nur sehr schwach ausgeprägt.

Für ein am Adhäsionsprozess nicht direkt beteiligtes, aber im Zusammenhang mit Adhäsions- und Inflammationsprozessen in der Literatur beschriebenes Protein zeigten sich dagegen auffällige Veränderungen: Die Lipocortin 1-Expression reduzierte sich nach der Stimulierung mit PMA in allen untersuchten Zelllinien deutlich. Gleichzeitig zeigte sich aber auch eine signifikante Reduktion der Lipocortin 1-Expression in den PKC $\delta$ - und in den PKC $\epsilon$ -überexprimierenden 32D Zellen. Die zugehörigen Ergebnisse sind im folgenden dargestellt.



**Abb. 5.22 Vergleich der Lipocortin 1-Expression in den einzelnen Zelllinien**

Jedes Feld umfasst neun gespottete cDNA-Sequenzen mit der Lipocortin 1-Sequenz im Zentrum. Die kalibrierten überlagerten Scans sind farbig dargestellt, deren Aufspaltung in die beiden Kanäle in Graustufen. In den farbigen Feldern bedeutet gelbe Fluoreszenz eine gleichstarke Expression in beiden untersuchten Zelllinien, grüne Fluoreszenz eine stärkere Expression in den 32D Zellen.

Bei Betrachtung der einzelnen Felder in der obigen Abbildung wird zunächst deutlich, dass die acht randständigen Spots gleiche Fluoreszenzintensitäten für die beiden Kanäle und damit für die beiden untersuchten RNA-Präparationen aufweisen. Diese Homogenität ist eine Qualitätskontrolle für das durchgeführte Experiment und zeigt zugleich, dass es unter den jeweiligen Bedingungen nicht zu einer unterschiedlichen Expression dieser acht Gene kommt.

Die Lipocortin 1 mRNA wurde jedoch signifikant unterschiedlich exprimiert: In den unter 1.) zusammengefassten Feldern wird deutlich, dass die 32D PKC $\delta$ -Zellen und 32D PKC $\epsilon$ -Zellen bereits ohne Stimulierung eine verminderte Lipocortin 1-Expression zeigten.

Die drei unter 2.) zusammengefassten Felder zeigen die Lipocortin 1-Expression der Phorbol ester-stimulierten Zelllinien relativ zu unstimulierten 32D Zellen. Es wird deutlich, dass eine Stimulierung von 32D Zellen mit Phorbol ester zu einer verminderten Lipocortin 1-Expression führte. In den 32D PKC $\delta$ -Zellen kam es zu einer noch stärkeren Reduktion der Lipocortin 1-Expression. Hier war nach der Stimulierung der Zellen mit PMA kein Signal mehr detektierbar. Die Signale für den

Vergleich von 32D Zellen mit phorbolsterstimulierten 32D PKC $\epsilon$ -Zellen waren allerdings zu schwach für eine gesicherte Aussage über deren relative Expressionsverhältnisse. Um die Lipocortin 1-Expression dieser Zellen zu untersuchen und um die obigen Resultate zu bestätigen, wurden später die unter 5.2.6 aufgeführten quantitativen RT-PCR Untersuchungen durchgeführt.

Das mit 3.) bezeichnete Feld zeigt schließlich den direkten Vergleich von RNAs aus phorbolsterstimulierten 32D PKC $\delta$ - und 32D PKC $\epsilon$ -Zellen. Für beide war keine mRNA für Lipocortin nachweisbar.

### 5.2.3.5 MAPKAPK2

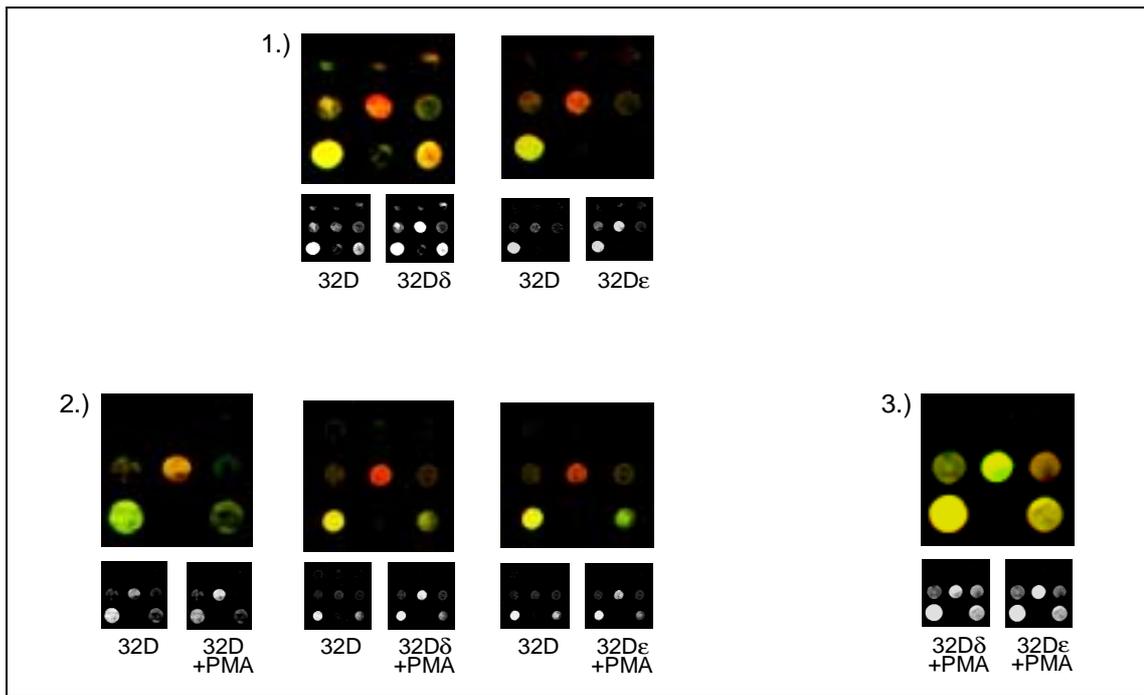
Enzyme, die der MAP Kinase Kaskade zugerechnet werden, sind an einer Vielzahl von Differenzierungsvorgängen beteiligt. Während die beteiligten Enzyme i.d.R. durch Phosphorylierung respektive Dephosphorylierung reguliert werden, zeigte die cDNA-Array Untersuchung für eines dieser Enzyme, MAPKAPK2, auch eine Regulation auf der mRNA-Ebene.

	32D + PMA	32D PKC $\delta$	32D PKC $\delta$ + PMA	32D PKC $\epsilon$	32D PKC $\epsilon$ + PMA
MAPKAPK2	+	+?	+	+?	+
MAPK/p38	=	=	=	-?	=
MAPK/ERK5	=	?	=	=	=
MAPK - Phosphatase1	=	=	=	=	=

**Abb. 5.23 Auflistung der untersuchten MAP Kinase Kaskade assoziierten Gene.**

Angegeben ist jeweils die Veränderung der mRNA-Expression relativ zur Expression in 32D Zellen. Dabei steht „=“ für eine unveränderte Expression. Die mit „?“ markierten Unterschiede waren nicht eindeutig oder nur sehr schwach ausgeprägt.

Die Hybridisierungsergebnisse für MAPKAPK2 sind in der folgenden Abbildung zusammengestellt.



**Abb. 5.24 Vergleich der MAPKAPK2-Expression in den einzelnen Zelllinien.**

Jedes Feld umfasst neun gespottete cDNA-Sequenzen mit der MAPKAPK2-Sequenz im Zentrum. Die kalibrierten überlagerten Scans sind farbig dargestellt, deren Aufspaltung in die beiden Kanäle in Graustufen. In den großen Feldern bedeutet gelbe Fluoreszenz eine gleichstarke Expression in beiden untersuchten Zelllinien, grüne Fluoreszenz eine stärkere Expression in den 32D Zellen und rote Fluoreszenz eine stärkere Fluoreszenz in den überexprimierenden bzw. stimulierten Zellen.

Auch hier wird bei der Betrachtung der randständigen Spots zunächst deutlich, dass diese jeweils gleiche Fluoreszenzintensitäten für die beiden Kanäle aufweisen.

Die MAPKAPK2 mRNA war jedoch signifikant unterschiedlich exprimiert: In den als 1.) gekennzeichneten Feldern zeigt sich in den 32D PKC $\delta$ -Zellen und den 32D PKC $\epsilon$ -Zellen bereits ohne Stimulierung eine erhöhte MAPKAPK2-Expression.

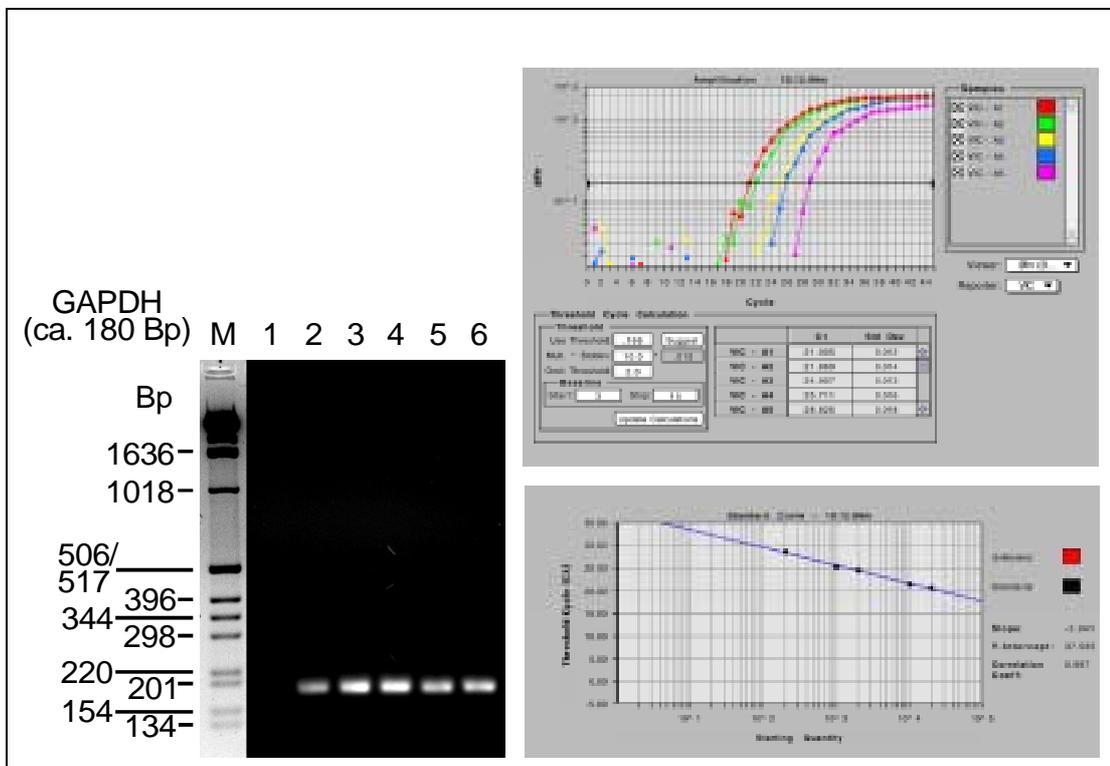
Dieser Effekt zeigte sich verstärkt auch in den unter 2.) zusammengefassten Feldern. Hier ist die relativ zu den unstimulierten 32D Zellen deutlich erhöhte MAPKAPK2-Expression der mit Phorbol ester stimulierten 32D, 32D PKC $\delta$ - und 32D PKC $\epsilon$ -Zellen gezeigt.

Das mit 3.) bezeichnete Feld zeigt schließlich den direkten Vergleich von RNAs aus Phorbol ester-stimulierten 32D PKC $\delta$ - und 32D PKC $\epsilon$ -Zellen. Die starke gelbe Fluoreszenz des zentralen Spots spiegelt die starke Expression der MAPKAPK2 mRNA in beiden Präparationen wider.

## 5.2.4 Bestätigung der differentiellen Expression durch quantitative PCR nach reverser Transkription

### 5.2.4.1 Eignung der RNA für die quantitative RT-PCR

Zur Überprüfung der RNA auf ihre Eignung für eine Analyse mittels quantitativer PCR und zur Bestimmung der Sensitivität dieser Methode wurden Versuche mit optimierten Primern und einer optimierten Sonde für GAPDH von PE Biosystems durchgeführt. Die verwendeten Primer führten zur Amplifikation eines ca. 100 Bp großen Fragments der RNA für GAPDH. Um die Linearität der Reaktion über einen breiten Konzentrationsbereich zu untersuchen, wurden hier zwischen 200 pg und 20 ng RNA eingesetzt. In diesen Versuchen wurden 45 Zyklen zur Amplifikation des revers transkribierten Fragments ausgeführt.



**Abb. 5.25 Quantitative RT-PCR für GAPDH.**

Links ist das Ethidiumbromid-gefärbte Agarosegel mit den aufgetrennten Amplifikationsprodukten gezeigt. M bezeichnet die Markerspür. In den Spuren 1 bis 6 sind die Reaktionen mit 0 ng, 0,2 ng, 1 ng, 2 ng, 10 ng und 20 ng RNA aufgetragen. Rechts in der Abbildung sind der aus den gemessenen Fluoreszenzwerten berechnete Amplifikationsplot (oberer Graph) und die zugehörige Standardkurve (unterer Graph) dargestellt. Die Markergröße ist in Bp angegeben.

Die gelelektrophoretische Analyse zeigte, dass ein einheitliches Produkt der erwarteten Größe amplifiziert wurde und keine detektierbaren Nebenprodukte entstanden. Anhand des Gels konnte aber keine Aussage über Mengenunterschiede

der Zielsequenz in den eingesetzten Proben gemacht werden. Da die PCR zum Ende in die Plateauphase eingetreten ist, waren in allen Proben vergleichbare Produktkonzentrationen entstanden. Lediglich die Kontrollreaktion ohne RNA zeigte ein abweichendes Bild: hier war wie erwartet kein Produkt entstanden.

Der in der Abbildung rechts oben angeordnete Amplifikationsplot zeigt deutlich den Vorteil der TaqMan<sup>®</sup>-Technologie: Während der gesamten Reaktion wurde hier die mit der spezifischen Hydrolyse der TaqMan<sup>®</sup>-Sonde verbundene Freisetzung des Fluorophors gemessen. Nach Ablauf der Reaktion wurde dann unter Verwendung der Messwerte aus der exponentiellen Phase der PCR auf den Punkt extrapoliert, an dem die einzelnen Kurven den Schwellenwert überschreiten.

Diese als  $C_T$  (für threshold cycle) bezeichneten Werte sind in der rechts unten aufgetragenen Standardkurve zusammengefasst. Hier wird sowohl die gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse als auch die Linearität über den gesamten Konzentrationsbereich erkennbar. Gezeigt ist eine von vier Standardkurven mit Korrelationskoeffizienten von 1,0; 0,998; 0,993 und 0,990.

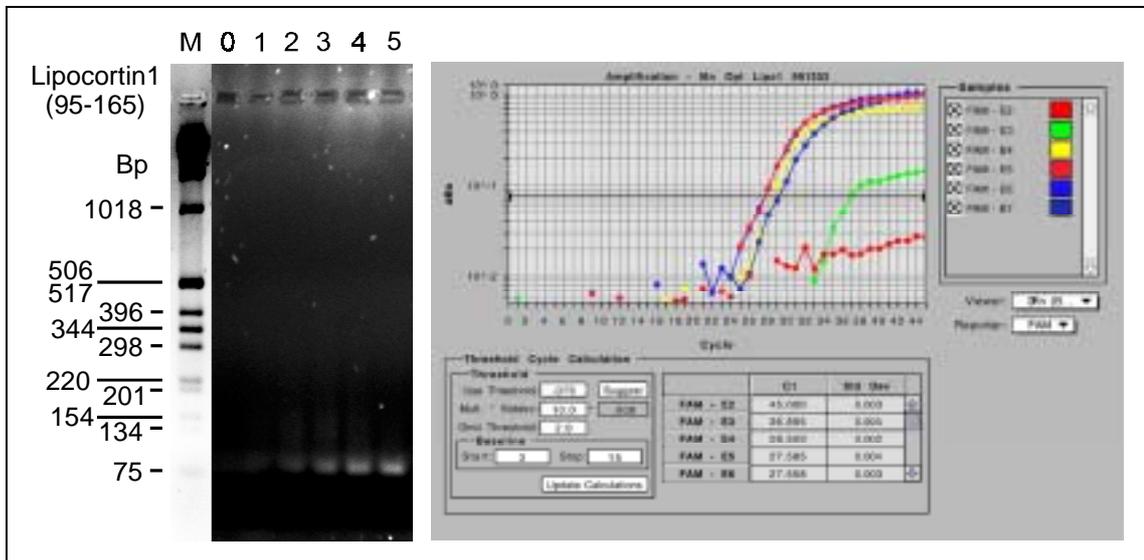
#### 5.2.4.2 Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen

Durch die sehr restriktive Auswahl der Primer und Sonden für die quantitative RT-PCR unter Einsatz der TaqMan<sup>®</sup>-Technologie sind eine Reihe von Versuchsparametern bereits eingegrenzt. Hierzu gehören vor allem das Temperaturprofil der Reaktion und die jeweiligen Reaktionszeiten. Dagegen ist die Stabilität der Anlagerung von Primern und Sonden an die Zielsequenz stark abhängig von der Mangankonzentration im Reaktionsansatz. Diese muss empirisch optimiert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die folgenden Primer-Sonden-Kombinationen eingesetzt:

<b>Lipocortin 1</b> (95-165) <b>Amplifikat: 70 Bp</b>	fw:	ACAAAGGTGGTCCTGGGTCA
	rev:	AAGGCAGCAACATCCGAGG
	Sonde:	CAGTGAGCCCCTACCCTTCCTCAATG
<b>MAPKAPK2</b> (919-985) <b>Amplifikat: 66 Bp</b>	fw:	CACCCCTGGATCATGCAATC
	rev:	CCTTCAGGACACGGCTGGT
	Sonde:	ACGAAGGTCCCTCAGACTCCACTGCA

Abb. 5.26 TaqMan<sup>®</sup>- Primer und Sonden zusammen mit den amplifizierten Bereichen.

Zur Bestimmung der optimalen Mangankonzentration wurden jeweils Amplifikationsreaktionen in der Gegenwart von 0 mM bis 5 mM Manganacetat durchgeführt. Neben einer Maximierung der Zielsequenz-Amplifikation sollte dabei auch die Bildung von Nebenprodukten minimiert werden.

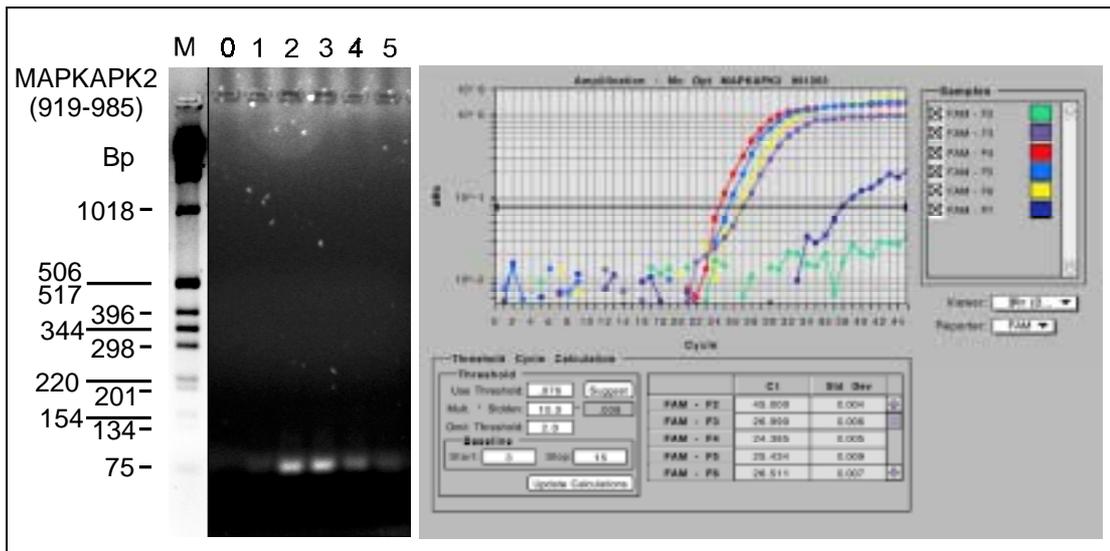


**Abb. 5.27 Mangan-abhängige Amplifikation der Zielsequenzen für Lipocortin 1.**

Links ist eine Auftrennung der Amplifikationsprodukte gezeigt. Der Marker (M) ist in Bp angegeben, in den Spuren 0 bis 5 sind die Reaktionsprodukte in Gegenwart von 0 bis 5 mM Mangan aufgetragen. Rechts in der Abbildung sind die Amplifikationsplots dargestellt, die aus den während der Reaktion gemessenen Fluoreszenzwerten berechnet sind.

Beim Vergleich der Intensitäten der einzelnen Banden wird der Einfluss der Mangankonzentration auf die Amplifikation der Zielsequenzen erkennbar. Die Sequenz aus dem Gen für Lipocortin 1 wurde von 3 bis 5 mM Manganacetat amplifiziert, das stärkste Bandensignal wurde dabei mit 4 oder 5 mM Manganacetat erzielt.

Diese Aussage spiegelt sich auch in den Amplifikationskurven wider: Eine optimale Amplifikation fand zwischen 4 und 5 mM Manganacetat statt und führte zu einer Überschreitung des Schwellenwertes bei 27,6 Zyklen. Sie lag damit um einen Zyklus vor der Amplifikation bei 3 mM Manganacetat und um bis zu 9 Zyklen vor den Amplifikationen unter den übrigen Bedingungen. Dabei entspricht der Unterschied von einem Zyklus der doppelten Menge des zu diesem Zeitpunkt gebildeten Amplifikats.



**Abb. 5.28 Mangan-abhängigen Amplifikation der Zielsequenzen für MAPKAPK2.**

Links ist eine Auftrennung der Amplifikationsprodukte gezeigt. Der Marker (M) ist in Bp angegeben, in den Spuren 0 bis 5 sind die Reaktionsprodukte in Gegenwart von 0 bis 5 mM Mangan aufgetragen. Rechts in der Abbildung sind die Amplifikationsplots dargestellt, die aus den während der Reaktion gemessenen Fluoreszenzwerten berechnet sind.

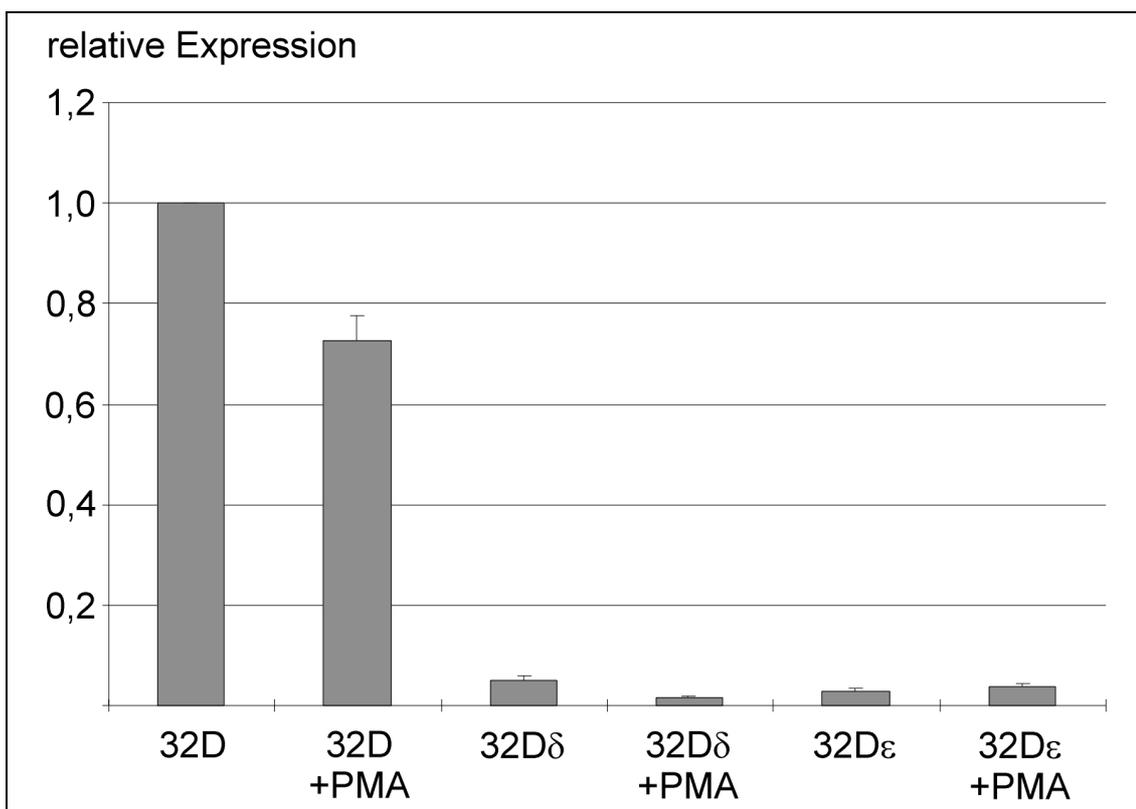
Für MAPKAPK2 zeigte sich bei der Betrachtung des Gels ebenfalls die erwarteten Amplifikate in der Größe von 66 Bp sowie die Spezifität der Reaktion: Auch mit den Primern für die MAPKAPK2-Sequenz wurden keine durch Ethidiumbromidfärbung detektierbaren Nebenprodukte gebildet. Der Effekt von Manganacetat auf die Amplifikation wurde auch hier offensichtlich: starke Banden entstanden nur zwischen 2 und 3 mM Manganacetat.

Bei der Auswertung der Graphen wurde dieses Ergebnis klar quantifiziert: Die Amplifikationskurven der Reaktion mit 2 mM Manganacetat überschritt den Schwellenwert bei 24,4 Zyklen und damit einen Zyklus vor der Reaktion mit 3 mM Manganacetat. Die Graphen der übrigen Reaktionen folgten mit 2 oder mehr Zyklen Abstand. Alle Reaktionen mit 1 bis 4 mM Manganacetat lieferten darüber hinaus glatte und homologe Amplifikationskurven. Als mögliche Reaktionsbedingungen waren damit Amplifikationen zwischen 2 und 3 mM Manganacetat bestimmt.

Die von Perkin Elmer bezogene optimierte Primer-Sonden-Kombination für GAPDH lieferte bei 3 mM Manganacetat die beste Amplifikation. Unter diesen Bedingungen wurden auch mit den Kombinationen für Lipocortin 1 und MAPKAPK2 gute Ergebnisse erzielt. Um im folgenden die gleichzeitige Bestimmung der GAPDH-mRNA und der MAPKAPK2- bzw. Lipocortin 1-mRNA im gleichen Ansatz zu ermöglichen, wurden die Quantifizierungen bei 3 mM Manganacetat durchgeführt.

### 5.2.4.3 Quantifizierung der Expression von Lipocortin 1

Unter den o.g. Bedingungen wurden jeweils 2 ng total-RNA aus unstimulierten sowie PMA-stimulierten 32D, 32D PKC $\delta$ - und 32D PKC $\epsilon$ -Zellen für die quantitative RT-PCR eingesetzt. Dabei wurden gleichzeitig die Amplifikation von GAPDH und Lipocortin 1 durchgeführt. Die gemessenen C<sub>T</sub>-Werte für Lipocortin 1 wurden mit den Werten für GAPDH kalibriert und danach auf die 32D Zellen normiert. Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei Messungen sind im folgenden graphisch dargestellt:



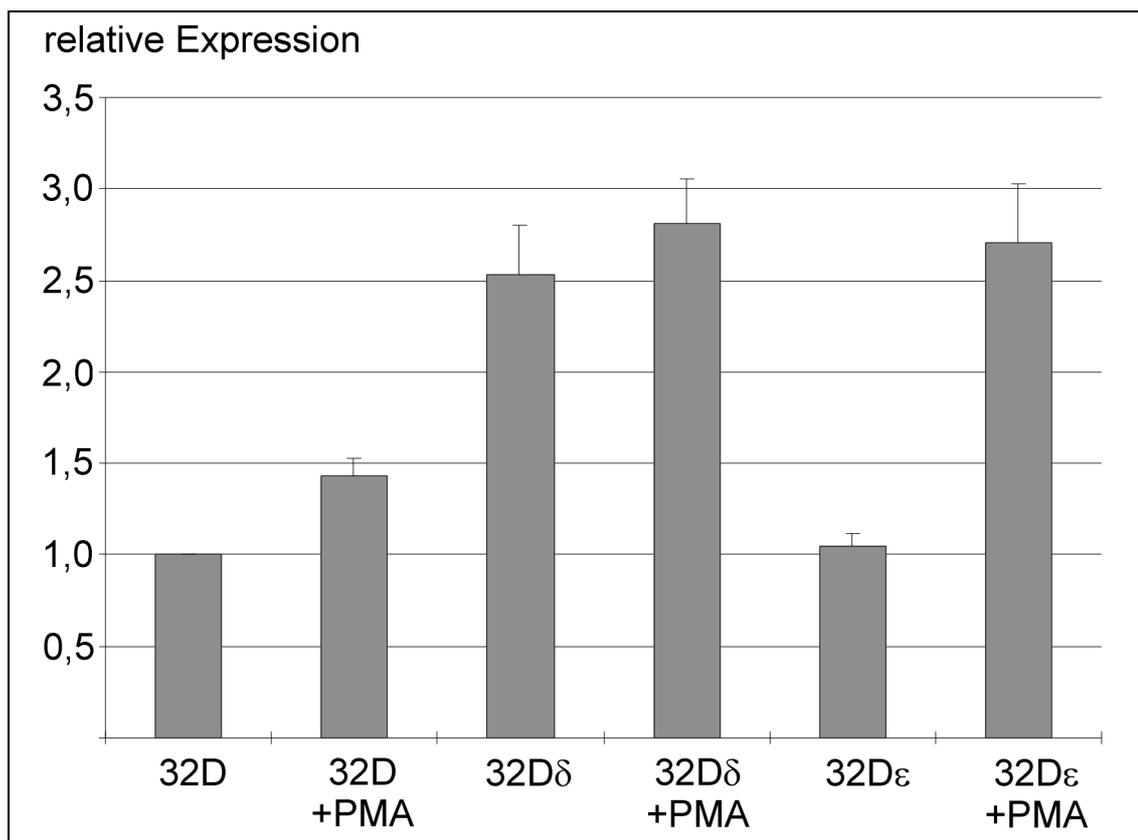
**Abb. 5.29 Quantifizierung der mRNA für Lipocortin 1.**

Alle Werte sind auf die GAPDH-Expression kalibriert und auf die Expression in den 32D Zellen normiert, die Fehler sind als SEM angegeben.

In der quantitativen RT-PCR bestätigte sich die in den Array-Experimenten beobachtete PKC-abhängige Verringerung der mRNA. Durch eine Stimulierung der 32D Zellen mit Phorbol ester wurde sie auf etwa zwei Drittel der Ausgangsmenge reduziert. Auffällig war aber die starke Reduktion der Lipocortin 1-Expression in den PKC $\delta$ - und PKC $\epsilon$ -überexprimierenden Zellen. Hier war bereits in den unstimulierten Zellen eine Verminderung auf 1/10 der Ausgangsmenge zu beobachten, die sich nach der Stimulierung nur noch unwesentlich veränderte.

#### 5.2.4.4 Quantifizierung der Expression von MAPKAPK2

Weiterhin wurden gleichzeitige Amplifikationen von GAPDH und MAPKAPK2 mit der RNA aus unstimulierten sowie PMA-stimulierten 32D, 32D PKC $\delta$ - und 32D PKC $\epsilon$ -Zellen durchgeführt. Die gemessenen C<sub>T</sub>-Werte für MAPKAPK2 wurden auf GAPDH kalibriert und danach auf die 32D Zellen normiert. Die Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen mit jeweils drei Messungen sind im folgenden graphisch dargestellt:



**Abb. 5.30 Quantifizierung der mRNA für MAPKAPK2 in 32D Zellen.**

Alle Werte sind auf die GAPDH-Expression kalibriert und auf die Expression in den 32D Zellen normiert, die Fehler sind als SEM angegeben.

Auch in der Analyse der Expression der MAPKAPK2-mRNA bestätigten sich die Array-Ergebnisse. Hier zeigte sich ebenfalls eine PMA- und PKC-abhängige Steigerung der Expression. Die MAPKAPK2-Expression der unstimulierten PKC $\epsilon$ -überexprimierenden Zellen spiegelte in der quantitativen mRNA-Analyse die Expression der unstimulierten 32D Zellen wider. Hier ließ sich die im cDNA-Array beobachtete stärkere MAPKAPK2-Expression alleine durch PKC $\epsilon$ -Überexpression nicht nachweisen.