

2 Aufgabenstellung

Wie die Literaturübersicht zeigt, sind zu Beginn dieser Arbeit bereits Daten bekannt, die eine Beteiligung von PKC an der Regulation bzw. Stimulierung des konstitutiven Vesikeltransportes vermuten lassen. Zum einen führt PMA, ein spezifischer Aktivator von PKC-Isoformen, zur Stimulation des konstitutiven Transportes in HepG2-Zellen und zum anderen ist PKC α (neben anderen Isoformen) am GA dieser Zellen nachweisbar [165]. In der Arbeitshypothese wird davon ausgegangen, daß PKC α durch Phosphorylierung spezifischer membrangebundener Substrate in die Regulation des konstitutiven Transportes eingreift. Das Ziel dieser Arbeit ist darauf ausgerichtet, die spezifischen Substrate von PKC α zu identifizieren und ihre Beteiligung am Vesikeltransport nachzuweisen.

Dazu sind folgende Aspekte zu untersuchen:

1. Die Expression der verschiedenen PKC-Isoformen in HepG2-Zellen und ihre biochemische Verteilung in den subzellulären Fraktionen ist mit immunologischen Verfahren zu ermitteln. Des weiteren ist durch immunologische Detektion von Markerproteinen die Reinheit der etablierten Golgi-Präparationsmethode zu überprüfen.
2. PKC α ist im Baculovirus-System zu exprimieren, zu reinigen und ihre biologische Aktivität zu überprüfen.
3. Ein Verfahren zur in-vitro-Phosphorylierung Golgi-spezifischer PKC-Substrate ist zu entwickeln, das den Reaktionsbedingungen der etablierten „in-vitro-Vesikelbiogenese“ angepaßt ist.
4. PKC-Substrate sollen nach eindimensionaler und/oder zweidimensionaler elektrophoretischer Trennung nachgewiesen und mittels massenspektrometrischer Sequenzierung identifiziert werden.
5. Die biologische Relevanz der in-vitro-Phosphorylierung ist in permeabilisierten Zellen zu überprüfen.
6. Mit spezifischen Antikörpern soll, soweit diese kommerziell erhältlich sind, die Bedeutung der Proteine für die in-vitro-Vesikelbiogenese überprüft werden.