

**Universität Ulm**  
**Zentrum für Innere Medizin**  
**Klinik für Innere Medizin I**  
**Gastroenterologie, Endokrinologie, Stoffwechsel,**  
**Ernährungswissenschaften, Nephrologie**  
**Ärztlicher Direktor Professor Dr. G. Adler**

**Charakterisierung der Funktion der Proteinkinase  
D2 als Regulator der Chromogranin A-Sekretion in  
humanen BON neuroendokrinen Tumorzellen**

---

**Dissertation**  
**zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin**  
**der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm**

**Teresa Edenfeld**

**Rheda-Wiedenbrück**  
**2009**

**Amtierender Dekan:** Prof. Dr. Klaus-Michael Debatin

**1.Gutachter:** PD Dr. Götz von Wichert

**2.Gutachter:** Prof. Dr. Marko Kornmann

**Tag der Promotion:** 22.01.2010

Meinen Eltern

# Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS:</b> .....	<b>III</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Neuroendokrine Tumoren</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Definition und Epidemiologie.....	1
1.1.2 Klassifikation .....	3
1.1.3 Symptomatik .....	3
1.1.4 Diagnostik und Therapie .....	5
<b>1.2 Sekretion aus dem Golgiapparat</b> .....	<b>6</b>
<b>1.3 Proteinkinase D2</b> .....	<b>8</b>
1.3.1 Die PKD2 – ein Mitglied der Proteinkinase D Familie .....	8
1.3.2 Struktureller Aufbau und dessen Einfluss auf die Aktivierung .....	9
1.3.3 Aktivierungsmechanismen und Protein-Interaktionen .....	10
1.3.4 Biologische Funktionen von PKD .....	12
1.3.5 PKD – Einfluss auf das Transgolginetzwerk .....	14
<b>1.4 Zielsetzung</b> .....	<b>15</b>
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>16</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>16</b>
2.1.1 Chemikalien, Medien, Plasmide .....	16
2.1.2 BON-Zellen .....	18
2.1.3 Analysegeräte .....	18
<b>2.2 Methoden</b> .....	<b>19</b>
2.2.1 Versuchsdurchführung .....	19
2.2.2 Zellkultur .....	21
2.2.3 Immunpräzipitation von PKD2.....	21
2.2.4 Western Blot .....	21
2.2.5 In Vitro-Kinaseassay .....	22
2.2.6 Fixierung transfizierter Zellen .....	23
2.2.7 Immunfärbungen .....	23
2.2.8 Sekretionsanalysen (Assays)/ Sekretionsuntersuchung .....	24
2.2.9 Generierung der Plasmid-DNA .....	25
2.2.10 Transfektion.....	26
2.2.11 Bildgebung .....	28
2.2.12 Auswertung mit Image J .....	29
2.2.13 Statistik.....	30
<b>3 ERGEBNISSE</b> .....	<b>31</b>

3.1.	CgA enthaltende sekretorische Granula sind in BON-Zellen im Transgolginetzwerk lokalisiert .....	31
3.2.	Stimulation der CgA Sekretion ist in BON-Zellen PKC abhängig.....	32
3.3.	PKD2 wird in BON-Zellen exprimiert und wird durch TPA via PKC in ihrer Aktivität gesteigert .....	32
3.4.	PKD2 ist in BON-Zellen in vesikulären Strukturen lokalisiert.....	33
3.5.	PKD2 Expression und ihre katalytische Aktivität wird für das Vorkommen von Chromogranin A enthaltenden Vesikeln benötigt.....	34
3.6.	Richtung und Geschwindigkeit des Vesikeltransportes sind unabhängig von PKD2 in BON-Zellen .....	39
3.7.	Die katalytische Aktivität von PKD2 wird für die Abschnürung von CgA enthaltenden Vesikeln vom TGN benötigt.....	42
3.8.	PKD2 Expression und ihre Aktivierung ist notwendig für basale und TPA-stimulierte CgA Sekretion in den Überstand von BON-Zellen.....	45
4.	DISKUSSION.....	50
5.	ZUSAMMENFASSUNG .....	58
6.	LITERATURVERZEICHNIS.....	60
7.	DANKSAGUNG .....	71
8.	LEBENS LAUF .....	72

## Abkürzungsverzeichnis:

ACTH	adrenocorticotropes Hormon
µg	Mircogramm
µl	Microliter
µM	Mircomol
5-FU	5-Fluoruracil
5-HTTP	5-Hydroxytryptophan
AGS-B-Zellen	<i>altered human gastric carcinoma cell line</i> , Magenkarzinomlinie
AK	Antikörper
AP1	endosomales Adaptorprotein
BCR-Abl	Breakpoint cluster region - Abelson Murine Leukemia Viral Oncogene Homolog
CAMK	Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase
CgA	Chromogranin A
CgA-IF	immunfluoreszierendes Chromogranin A
CgB	Chromogranin B
cpm	<i>counts per minute</i> , Zerfälle pro Minute (Radioaktivität)
DAG	Diacylglycerin
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFP/GFP	<i>(Enhanced) Green Fluorescent Protein</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
FCS	fetales Kälberserum
GEP	gastroenteropankreatisch
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GPCR	GTP-Protein gekoppelter Rezeptor
h	Stunde
HeLa-Zellen	Zervixkarzinomzelllinie
HepG2-Zellen	hepatozelluläre Karzinomzelllinie
IG	<i>immature Granules</i> , unreife Granula
In	Indium
IVK	In Vitro Kinase Assay
JNK	c-Jun N-terminale Kinasen
JÜR	Jahres-Überlebensrate
Ln	<i>Liquid Nitrogenium</i> , Flüssigstickstoff
mA	Milliampere
MEK/MAPKK	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase
MEN	Multiple endokrine Neoplasie
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar
NA	numerische Apertur
NET	neuroendokrine Tumoren
NF-κB	Nukleärer Faktor Kappa B
nm	Nanomol
NRK-Zellen	<i>normal rat kidney epithelial cell</i> , Nierenepithelzellen
NSE	Neuron-specific enolase
p.a.	pro analysi = für die Analyse

PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Salzlösung
pcDNA	<i>plasmid complementary DNA</i> , komplementäre plasmidische Desoxyribonukleinsäure
PDBu	Phorbol-12,13-Dibutyrat
PGP	Proteingenprodukt
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKD	Proteinkinase D
PKD2da	PKD2-D695A, katalytisch inaktives Proteinkinase D2-Konstrukt
PKD2se	PKD2-S706/710E, konstitutiv aktiviertes Proteinkinase D2-Konstrukt
PKD2wt	Wildtypform der Proteinkinase D 2
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-Myristat-Acetat
pmol	Picomol
PPome	Pankreatisches Polypeptidom
PVDF	Polyvinylidenfluorid, Trägermembran für den Western Blot
RIN1	Ras and Rab interactor 1
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
SDS-PAGE	<i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> , Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sek	Sekunde
siRNA	small interference Ribonukleinsäure
TGN	Transgolginetzwerk
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat
U/min	Umdrehungen/Minute
v/v	Volumen pro Volumen
VIPom	vasoaktives intestinales Peptidom
w/v	Masse ( <i>Weight</i> ) pro Volumen
WHO	<i>World Health Organisation</i> , Weltgesundheitsorganisation
ü.N.	über Nacht

# 1 Einleitung

## 1.1 Neuroendokrine Tumoren

### 1.1.1 Definition und Epidemiologie

Neuroendokrine Tumoren (NETs) entwickeln sich aus einer heterogenen Gruppe von Zellen, die aus einer gemeinsamen Vorläuferzellpopulation entstanden sind (Rindi G 2001). Allen Zellen gemeinsam ist die Expression von Antigenen (Rindi et al., 2000), die sonst nur auf Zellen des neuronalen Systems zu finden sind, die Produktion von bestimmten Markerproteinen (siehe Tab.1.1) und ihre endokrine Aktivität.

**Tabelle 1:** Immunhistochemische Marker neuroendokriner Tumoren (Höfler et al., 1997)

---

**Cytoplasmatisch:**

- Neuron-specific enolase (NSE)
- Protein gene product 9,5 (PGP 9,5)
- Neurofilament

**Vesikulär:**

- Synaptophysin

**Granulär:**

- CgA und B
  - Sekretogranin II (CgC)
  - Sekretogranin III
  - Sekretogranin IV (HISL19)
  - Sekretogranin V
  - Phe 5
  - Lue-7
- 

Das neuroendokrine System umfasst endokrine Drüsen wie z.B. die Nebenschilddrüse, die Inselzellen des Pankreas sowie das diffuse endokrine System, dessen endokrine Zellen im Respirations- und Intestinaltrakt verstreut liegen.

Ein Teil der neuroendokrinen Tumoren ist mit dem MEN (Multiple endokrine Neoplasien)-Syndrom assoziiert sowie zu einem geringeren Anteil mit Phakomatosen wie z. B. der Neurofibromatose Typ 1 oder der tuberösen Sklerose (Calender A, 2000; Heppner et al., 1997; Zhuang et al., 1997). Die Ätiologie oder die genetische Faktoren sind bis auf die oben genannten nicht hinreichend bekannt.



Im Folgenden wird sich diese Arbeit auf die neuroendokrinen Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems fokussieren, unter die Karzinoide, VIPome (vasoaktives intestinales Peptidom), Gastrinome, Somatostatinome, Insulinome, Glukagonome, PPome (Pankreatisches Polypeptidom) und funktionell nicht aktive Tumoren fallen.

Als Karzinoide werden im engeren Sinne Tumoren bezeichnet, die Serotonin synthetisieren, speichern und sezernieren (Bishop und Polak, 1996). Zusätzlich dazu können sie auch noch andere Hormone freisetzen (Caplin et al, 1998; Kulke und Mayer, 1999; Limper et al., 1992). Traditionellerweise wird der Begriff aber in der Literatur häufig als Sammelbegriff für NETs aus dem Gastrointestinaltrakt, Pankreas, Lunge und Thymus genutzt.

Die aktuelle WHO-Klassifikation nimmt hingegen folgende Einteilung vor:

- 1) hochdifferenzierte endokrine Tumoren (benigne oder leichtgradig maligne  
→makroskopisch lokal begrenzt)
- 2) gut differenzierte endokrine Karzinome (Metastasen oder makroskopisch sichtbare Invasion in Nachbargewebe) (Capella et al., 1994)
- 3) niedrig- differenzierte endokrine Karzinome (kleinzellige Karzinome)
- 4) gemischt endokrin- exokrine Karzinome
- 5) Tumorartige Läsionen

Insgesamt sind neuroendokrine Tumoren mit einer jährlichen Inzidenz von 3,8/100.000 sehr seltene Tumoren. Interessanterweise scheint die Inzidenz von neuroendokrinen Tumoren in den letzten Jahren deutlich zugenommen zu haben, 1973 erkrankten nur 0.85/100.000 an diesem Tumorleiden (Maggard et al., 2004; Modlin u. Sandor, 1997). Tab.1.2 gibt einen Überblick über die Verteilung der neuroendokrinen Tumoren im Gastroenteropankreatischen (GEP) System:

**Tabelle 2:** Verteilung endokriner Tumoren im gastroenteropankreatischen System (Maggard et al. 2004)

---

Dünndarm	44.7%	Kolon	10.6%
Rektum	19.6%	Magen	7.2%
Appendix	16.7%	Andere	1.2%

---

### 1.1.2 Klassifikation

Williams und Sandler haben 1963 eine erste Klassifikation der neuroendokrinen Tumoren vorgeschlagen. Entsprechend des Lage des Primärtumors unterschieden sie in „Foregut“- (Respirationstrakt, Magen, Duodenum, oberes Jejunum und Pankreas), „Midgut“- (unteres Jejunum, Ileum, Appendix und rechtes Kolon) und „Hindgut-Karzinoide“ (linkes Kolon und Rektum). Diese Einteilung wird zwar in vielen Lehrbüchern immer noch postuliert, hat aber in der Praxis nur noch bedingt einen Einfluss auf die Klassifikation und Behandlung der Tumoren. Heute wird der Tumor gemäß seiner Gewebsherkunft, seines biochemischen Verhaltens und seiner Prognose eingeteilt und mit Hilfe der WHO-Leitlinien klassifiziert (s.o.).

Die zellspezifische Klassifizierung erfordert einen Hormonnachweis mittels Immunhistochemie (Bishop u. Polak, 1996; Rindi et al, 2000). Tumoren mit einem Hyperfunktionssyndrom sind als funktionelle NETs definiert. Als nicht funktionelle NETs werden Tumoren bezeichnet, die trotz erhöhten Serum-Hormonwerten keine klinische Symptomatik hervorrufen oder die durch das Fehlen von Hormonproduktion gekennzeichnet sind (Solcia et al., 2000). Der Differenzierungsgrad hängt von der Histomorphologie, der Tumorgöße und dem Vorliegen makroskopisch sichtbarer lokaler Invasion oder Metastasen ab. Das Ki-67-Antigen ist ein Proliferationsmarker, das während des Zellzyklus exprimiert wird. Ruhende Zellen, also Zellen, die sich in der G<sub>0</sub>-Phase befinden, exprimieren das Ki-67-Antigen nicht. Mit Hilfe der Anzahl Ki-67 positiven Zellen wird der Proliferationsindex bestimmt, der bei hochdifferenzierten Zellen bei <2% und bei kleinzelligen Karzinomen >15% liegt (Solcia et al. 2000). Alle diese Kriterien zusammen reflektieren das biologische Verhalten des Tumors und helfen, die Tumoren gemäß der WHO-Klassifikation (s.o.) einzuteilen.

### 1.1.3 Symptomatik

Die Symptomatik von neuroendokrinen Tumoren ist aufgrund ihrer unterschiedlichen Hormonproduktion sehr vielfältig. Sie ist gekennzeichnet durch die überschießende Wirkung ihrer Sekretionsprodukte Serotonin, ACTH, Histamin, Dopamin, Substanz P, Neurotensin, Prostaglandinen, Kallikrein oder Tachykininen (Caplin et al., 1998; Kulke et al., 1999; Limper et al., 1992). Mischbilder kommen

häufig vor, außerdem kann es gelegentlich vorkommen, dass sich die klinische Symptomatik durch ein verändertes sezerniertes „Hormongemisch“ im Verlauf der Zeit vollständig ändert oder seltener, dass Metastasen andere Hormone sezernieren als der primäre Tumor. In 40- 60% bleibt die Krankheit symptomlos(Vinik et al., 1989).

Das klassische Karzinoidsyndrom tritt insgesamt bei 8,4% aller Patienten mit diagnostizierten Karzinoiden auf und zeigt sich deutlich häufiger bei älteren Patienten mit Lebermetastasen (Soga et al., 1999). Es manifestiert sich in 90% mit Flushing, in 70% mit Diarrhö , in 40% mit Bauchschmerzen, in 40-45% mit Fibrose der rechten Herzklappe (die in 10 % zu einem trikuspidalen Vorfall führen kann) und zu je 5% mit Teleangiektasien, bronchialer Obstruktion und/oder Pellagra (Caplin et al., 1998; Ganim et al.,2000; Kulke et al., 1999; Soga et al.,1999; Tomassetti et al., 2001; Vinik et al., 1989).

Diese Symptome sind die Konsequenz der synergistischen Wirkung von Serotonin, Kininen, Kallikrein und Prostaglandinen, die nicht mehr in ausreichendem Maße von der Leber abgebaut werden können und somit in den systemischen Kreislauf gelangen. Abhängig von der Lokalisation des Tumors steigt die Wahrscheinlichkeit für ein Karzinoidsyndrom. Bei den Midgut-Tumoren ist sie deutlich höher als bei den Foregut- oder Hindgut-Tumoren. Foregut-Tumoren sezernieren eher die Serotonin- Vorläuferstufe 5-Hydroxytryptophan (5-HTTP), Histamin und andere polypeptidische Hormone, während Hindgut-Tumoren meist mit vermehrter Sekretion von gastrointestinalen Hormonen assoziiert sind (Onaitis et al., 2000).

Eine kumulative Analyse von allen Karzinoidtypen zeigte, dass schon bei Diagnosestellung 45% aller Patienten Metastasen aufwiesen und die 5 Jahres-Überlebensrate (JÜR) ohne Berücksichtigung der Lage des Tumors bei ungefähr 50% lag (Modlin/Sandor, 1997). NETs in Pankreas, Kolon und Dünndarm zeigen mit 70% ein deutlich erhöhtes Metastasierungsrisiko und gehen entsprechend häufiger mit Hyperfunktionssyndromen einher. Des Weiteren korrelieren sie mit einer deutlich verschlechterten 5-JÜR (Modlin/Sandor, 1997; Onaitis et al., 2000).

#### 1.1.4 Diagnostik und Therapie

Chromogranin A ist saures Glykoprotein, das ausschließlich in endokrinen und neuroendokrinen Zellen gefunden wird. In den meisten Fällen wird CgA gleichzeitig mit koresidenten Peptiden der endokrinen Zellen sezerniert (Iacangelo et al., 1986; Arps et al., 1987; Wand et al., 1991). Aktuell wird empfohlen, bei Verdacht auf ein Karzinoid routinemäßig CgA im Serum zu bestimmen. In 80 % der Fälle ist dieses erhöht. Außerdem scheint es gut mit der Tumorgroße zu korrelieren und bei der Einschätzung der Prognose hilfreich zu sein (Caplin et al., 1998; Ganim et al., 2000; Oberg, 2004; Tiensu Janson/Oberg, 1996). Die Bestimmung von Chromogranin A als Marker für neuroendokrine Tumoren hat eine 92%ige Spezifität und eine 96% Sensitivität (Pirker et al., 1998). Bei Patienten mit Midgut-Karzinoiden, Karzinoidsyndrom oder Lebermetastasen wird zusätzlich dazu 5-Hydroxy-Indolessigsäure (5-HIES), ein Abbauprodukt des Serotonins im Urin bestimmt. Wenn Verdacht auf ein anderes hypersekretorisches Syndrom besteht, werden die jeweiligen Hormone oder ihre Abbauprodukte bestimmt.

Zur genauen Lokalisation des Tumors und Abklärung von möglichen Metastasen werden computertomographische, sonographische sowie szintigraphische Untersuchungen durchgeführt. Für die Szintigraphie werden <sup>111</sup>In-Pentetreotid oder <sup>111</sup>In-Octreotid routinemäßig eingesetzt.

Die Therapie der Wahl ist die chirurgische Totalresektion des Tumors. (Arnold et al., 1996; Landry et al., 2008). Medikamente sollten nur adjuvant oder bei Kontraindikationen für eine Operation eingesetzt werden. Zur Verfügung stehen zurzeit im Wesentlichen langwirksame Somatostatin (SS) Analoga, Interferon- $\alpha$  und eine Chemotherapie. Langwirksame SS-Analoga als Mittel der 1.Wahl wirken gut gegen die Symptomatik, möglicherweise tumorstatisch und führen in seltenen Fällen zu einer Tumorregression. Gleichzeitig zeigen sie ein sehr mildes, klinisch meist nicht relevantes Nebenwirkungsspektrum (Arnold 1996; Arnold et al., 2000; Di Bartolomeo et al., 1996; Eriksson /Oberg, 1999; O'Toole et al., 2000; Trendle et al., 1997). Problematisch ist allerdings eine mögliche Tachyphylaxie, die auch mit Dosiserhöhung zu keiner ausreichenden Kontrolle der Symptomatik mehr führt (Eriksson/Öberg, 1999; Hofland/Lamberts, 2003; Wynick et al., 1989).

Chemotherapie wird nur für therapieresistente oder niedrig differenzierte (Ki-67-Index > 20%) pankreatische NETs und fortgeschrittene Tumoren eingesetzt und

zeigt nur geringe Ansprechraten (Caplin, 1998; Kaltsas, 2002; Oberg, 2001; Oberg, 2002; Rougier, 2000). Eingesetzt wird in der Regel Streptozotocin in Kombination mit Doxorubicin oder 5-FU. Außerdem kann eine radiopharmazeutische Therapie mit  $^{90}\text{Y}$ -Somatostatin-Analoga versucht werden. Lebermetastasen können durch chirurgisches Debulking oder Leberarterienembolisation in ihrer Größe reduziert werden.

Die Wirksamkeit neuerer Therapieansätze mit Tyrosin-Kinase-Inhibitoren, anti-angiogenen Komponenten und Kombinationen aus diesen wird zurzeit in klinischen Studien ausgetestet (Dhan et al., 2008; Gross et al., 2006; Yao et al., 2008).

### **1.2 Sekretion aus dem Golgiapparat**

Der Golgiapparat erfüllt vielfältige Aufgaben der Umwandlung, Sortierung, Lagerung und Konzentration von Stoffen, die im Endoplasmatischen Retikulum produziert werden. Er weist eine eindeutige Polarität auf, seine beiden Pole bezeichnet man als *cis*- und *trans*-Seite. In der Regel nimmt die *cis*-Seite Substanzen in den Golgi-Apparat auf und auf der *trans*-Seite verlassen sie ihn. Transport der Sekretgranula vom Transgolginetzwerk (TGN) zur Plasmamembran erfolgt mithilfe von Mikrotubuli (Thyberg et al, 1999).

Bei der Sortierung unterschiedlicher Sekretprodukte werden zwei verschiedene Pfade der Sekretion vorgeschlagen: Der konstitutive Pfad soll ubiquitär in allen Zellen vorkommen und liegt der spontanen oder auch basalen Exozytose von Sekret- und Membranproteinen zugrunde. Der zweite Pfad kommt nur in hochspezialisierten exokrinen, endokrinen, neuroendokrinen und neuronalen Zellen vor. Dieser so genannte regulierte Sekretionsweg geht mit einer Konzentrierung von ausgewählten Sekretionsproteinen im TGN einher, die dann in wachsenden Sekretgranula gesammelt werden. Diese Sekretgranula unterscheiden sich von den kleinen konstitutiven Vesikeln durch ihre Größe und Funktion. Eine Verschmelzung der Sekretgranula mit der Plasmamembran und der sukzessiven Freisetzung darin enthaltener Proteine erfolgt als Antwort auf einen physiologischen Stimulus, z.B. Gastrin (Li et al., 2004). Proteintransport sowohl der konstitutiven als auch der regulierten Sekretion erfolgt vom endoplasmatischen Retikulum in den Cis-Golgiapparat entlang gemeinsamer Pfade. Erst hier werden

die Proteine, die für den regulierten Pfad bestimmt sind, von den Produkten, die die Zellen entlang des konstitutiven Weges verlassen werden, aktiv getrennt.

Für die Sortierung der Sekretprodukte des regulierten Sekretionspfades werden 2 Hypothesen vorgeschlagen (Arvan und Castle, 1992 und 1998). Zum einen können die Proteine laut der „Sorting for Entry“-Hypothese schon vor der Abschnürung vom TGN sortiert werden. Dabei kann man dabei die Sortierung im Groben auf 3 Pfade zusammenfassen. Ein Pfad entspräche der konstitutiven Route zur Zelloberfläche, der Zweite entspräche dem Weg der sekretorischen Granula und der dritte führe zum endosomal-lysosomalen System via AP1/Clathrin ummantelten Vesikeln. Dem TGN kommt bei dieser These eine Schrankenfunktion zu. Regulierte Sekretionsproteine formieren unlösliche Aggregate durch Interaktion mit Rezeptoren auf der TGN-Membran oder mit anderen dort schon aggregierten Proteinen. Proteine, die dies nicht schaffen, würden demnach automatisch entlang des konstitutiven Sekretionspfades sezerniert werden.

Das „Sorting by Retention“-Modell sieht die unreifen Granula (immature Granules=IG) als eine funktionelle Verlängerung des TGN an. In Anlehnung an diese Sichtweise können auch Proteine in das IG-Lumen gelangen, die nicht direkt oder indirekt mit der TGN-Membran verbunden sind. Es gelangen also auch Proteine in die unreifen Granula, die nicht entlang des regulierten Pfades ausgeschieden werden. Die Idee über den Aussortierungsmechanismus basiert auf der Fähigkeit granulärer Proteine, bei Veränderungen der intraluminalen Ionenzusammensetzung zu „Cores“ zu kondensieren. Diese ermöglichen es dann wiederum, dass die nicht zur Sekretion bestimmten löslichen Proteine per Clathrin-Ummantelung aus den Granula entfernt werden können. Diesen Prozess nennt man auch Reifung. Die entfernten Proteine werden in Endosomen überführt, die ihrerseits entweder in Lysosomen abgebaut werden oder in den konstitutiven Weg der Exozytose eingeschleust werden. Letzteres wird dann als constitutive-like-Sekretion bezeichnet.

Die bisherigen Forschungsergebnisse deuten darauf hin, dass die regulierte Sekretion weder ausschließlich mit dem Sorting by Entry- noch mit dem Sorting by Retention-Modell vollständig erklärbar ist. Im Moment wird davon ausgegangen, dass sie durch beide Mechanismen beeinflusst wird. Zu welchen Anteilen dies aber stattfindet, konnte bisher noch nicht geklärt werden (Arvan und Halban, 2004).

## **1.3 Proteinkinase D2**

### **1.3.1 Die PKD2 – ein Mitglied der Proteinkinase D Familie**

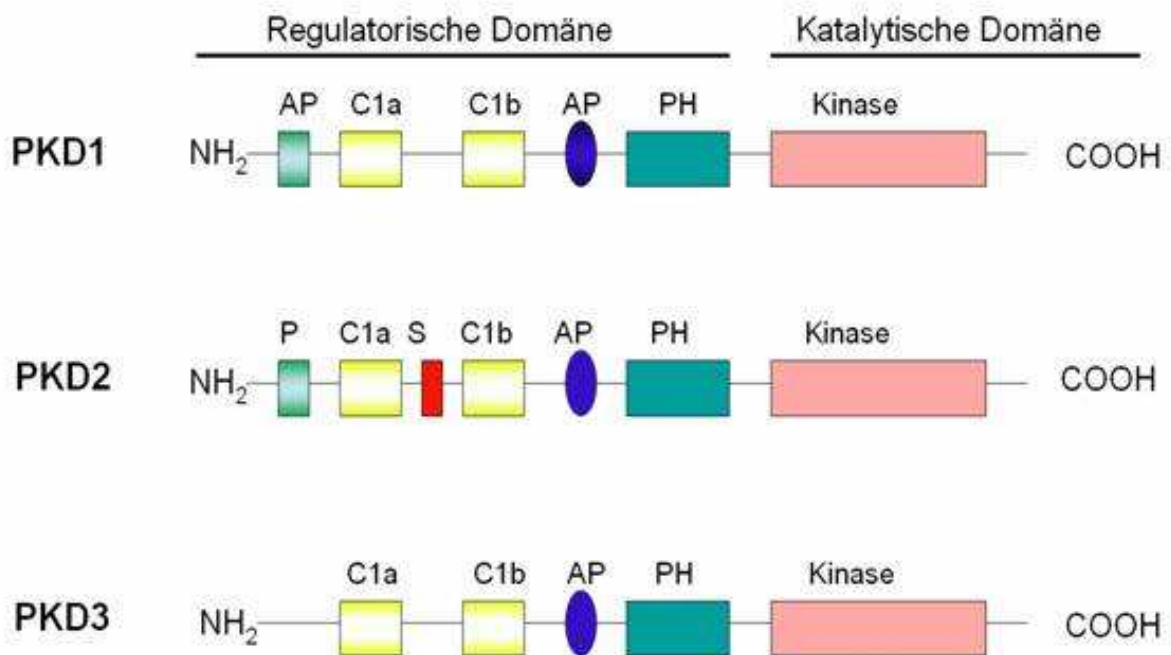
Die Proteinkinase D2 gehört zu der Proteinkinase D (PKD) Familie, die aus drei strukturell verwandten Isoformen der Serin/Threonin Kinasen besteht: PKD1/PKC $\mu$  (Johannes et al., 1994; Valverde et al., 1994), PKD2 (Sturany et al., 2001) und PKD3/PKC $\nu$  (Hayashi et al., 1999). PKD1/PKC $\mu$  wurde 1994 zuerst als ein atypisches Mitglied der PKC Familie beschrieben (Johannes et al., 1994; Valverde et al., 1994). Da aber molekulargenetisch die katalytischen Domänen der PKC und PKD nur eine sehr geringe Homologie aufweisen und die katalytische Sequenz der PKD ihrerseits eine hohe Ähnlichkeit mit der Calcium/Calmodulin-abhängigen Kinase (CAMK)-Domäne aufweist, wurden die PKDs als eine neue Subgruppe der CAMK klassifiziert (Mannig et al., 2002). PKD sind Zielstrukturen für tumorfördernde Phorbolster und gelten als ein Hauptangriffspunkt der Proteinkinase C Familie. Sie sind somit als Second-Messenger in viele zelluläre Funktionen mit eingebunden, die sich von der Golgiorganisation und dem zur Plasmamembran gerichteten Transport bis hin zur Regulation der Immunantwort, Proliferation, Apoptose, zytoskelettale Reorganisation und Metastasierung erstrecken (Ryckx et al. 2003; Van Lint et al. 2002).

PKD2 wird ubiquitär exprimiert. Die Expression in verschiedenen Zell- und Gewebstypen ist dabei aber unterschiedlich hoch. Besonders auffällig ist, dass PKD2 verglichen mit PKD1 vermehrt in Zellen des rasch proliferierenden Gewebes vorkommt und dort ein höheres Expressionsniveau präsentiert. Darunter fallen Darmmukosa und Testis, aber auch epitheliale Tumorzellen, unter anderem Pankreaskarzinomzellen. Interessanterweise war im Gegensatz dazu die Expressionsrate von PKD2 in Zellen aus gesundem Pankreas, Niere, Leber und Plazenta im Vergleich zu PKD1 relativ geringer (Johannes et al., 1994; Sturany et al., 2001). Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass PKD2 als ein Vermittler für tumorspezifische Eigenschaften in der Zelle zu agieren scheint.

Weitere Unterschiede und Parallelen zu der am besten untersuchten Isoform PKD1 werden im Folgenden dargestellt.

### 1.3.2 Struktureller Aufbau und dessen Einfluss auf die Aktivierung

Der charakteristische Aufbau der Mitglieder der Proteinkinase D-Familie ist wichtig für die Regulation von Enzymaktivität und der Lokalisation der Enzyme innerhalb der Zelle. PKD1, 2 und 3 teilen eine ähnliche molekulare Struktur bestehend aus einer N-terminalen regulatorischen Domäne und einer C-terminalen Kinase-Domäne. Der N-Terminus von PKD1 und 2 beginnt mit einer apolaren Region, die reich an Alanin- und Prolinresten ist. PKD3 besitzt diesen hydrophoben Abschnitt nicht. Alle drei Isoformen enthalten zwei Cystein-reiche Zinkfinger, C1a und C1b, die durch eine ungewöhnlich lange Verbindungsregion verbunden sind. In PKD2 ist in der Verbindungszone zusätzlich ein serinreicher Abschnitt enthalten.



**Abbildung 1: Domänen-Aufbau der Proteinkinase D-Familie:** Abkürzungen: AP = Alanin- und Prolinreiche Domäne; P = Prolinreiche Domäne; C1a/C1b = Cysteinreiche Domäne; S = Serinreiche Domäne; AC = Azide Domäne; PH = Pleckstring Homologie Domäne; Kinase = Katalytische Domäne. Nach Van Lint et al., 2002.

PKDs werden während der in vivo Aktivierung an mehreren Stellen phosphoryliert. Zwei dieser Stellen, Ser744 und Ser748, die beide in der Aktivierungsschleife lokalisiert sind (Vertommen et al., 2000; Waldron et al., 2001), scheinen eine



besondere Rolle in der Aktivierung von PKD1 zu spielen. In PKD2 entsprechen Ser706 und Ser710 diesen Stellen (Sturany et al., 2002).

Trotz der großen Sequenzhomologie der PKD-Isoformen und der dadurch zu vermutenden ähnlichen Wirkweise konnten aber schon jetzt einige auffallende Unterschiede zwischen PKD1 und PKD2 festgestellt werden. Zum Beispiel führt in PKD1 die Deletion oder Blockade sowohl der PH-Domäne als auch der beiden Zinkfinger zu einer vollen Aktivierung des Enzyms. Beide Abschnitte wirken also in PKD1 inhibitorisch auf die katalytische Einheit (Ryckx et al., 2003). Im Gegensatz dazu hat die C1a/C1b Domäne der PKD2 einen positiven Effekt auf die katalytische Aktivität, während ihre PH-Domäne analog der PKD1 als negativer Regulator der Enzymaktivität fungiert (Auer et al., 2005).

### **1.3.3 Aktivierungsmechanismen und Protein-Interaktionen**

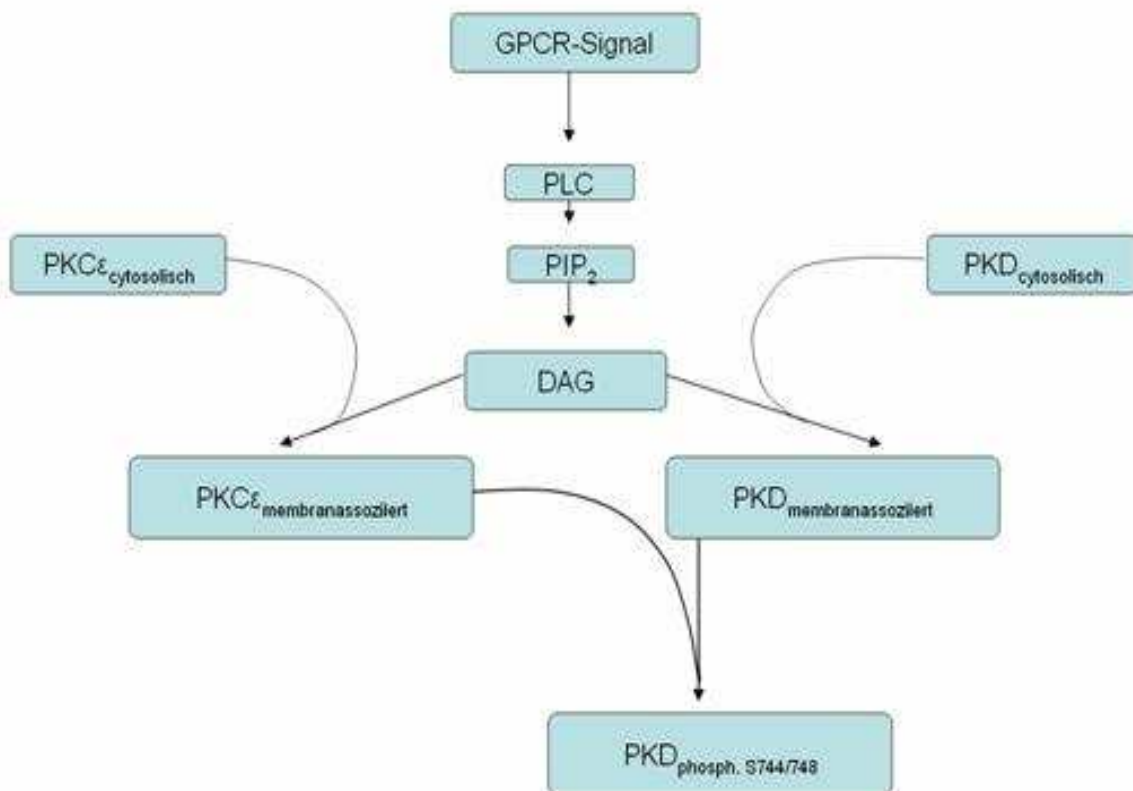
In unstimulierten Zellen ist PKD durch Autoinhibition (s.o.) nur geringgradig katalytisch aktiv. Zur suffizienten Auflösung dieser Inhibition bedarf es der Interaktion mit anderen Substanzen.

PKD1 kann in vivo durch mindestens drei verschiedene Mechanismen aktiviert werden:

Viele exogene Signale werden mittels G-Protein (GTP-bindendes Protein) gekoppelten Rezeptoren und daran gekoppelte Signaltransduktion ins Zellinnere weitergeleitet. Das G-Protein ist ein heterotrimeres Protein, das aus 3 Untereinheiten besteht ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ). Die Aktivierung des Rezeptors sorgt für den Austausch von GDP gegen GTP an der  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteins. Als Folge ändert sich die Konformation des heterotrimeren G-Proteins, und es kann so in die  $\alpha$ - und die  $\beta\gamma$ -Untereinheit dissoziieren. Die dissoziierte  $G\alpha$ -Untereinheit aktiviert Phospholipase C (PLC), die zu einer Produktion von Diacylglycerin (DAG) führt, das seinerseits PKC $\epsilon$  und PKC $\eta$  aktiviert. Diese führen dann zu einer Phosphorylierung von Ser744/Ser748 in der Aktivierungsschleife der PKD. Dieser Mechanismus ist auch für PKD2 nachgewiesen worden, bei der respektive Ser706/Ser710 durch PKC $\alpha$ , PKC $\epsilon$  und PKC $\eta$  phosphoryliert werden (Sturany et al., 2002). Zusätzlich dazu kann die  $G\beta\gamma$ -Untereinheit PKD1 direkt durch Interaktion mit der PH- Domäne im Golgi aktivieren (Jamora et al., 1999). Als

dritter Mechanismus wurde eine Caspase3 vermittelte Aktivierung durch Spaltung des Enzyms beschrieben (Endo et al., 2000).

PKDs besitzen zusätzlich zu den oben beschriebenen Aktivierungsmechanismen auch eine gewisse Autophosphorylierungsfähigkeit. So wird Ser748 auf einem langsamen Weg autophosphoryliert und kann dadurch die Transphosphorylierung von Ser744 durch PKC $\epsilon$  bahnen und so die Aktivierung der PKD1 insgesamt beschleunigen (Waldron et al., 2003).



**Abbildung 2: Die Aktivierung der Proteinkinase D2 durch G-Protein-Rezeptor gekoppelte Signale ist PLC-DAG-PKC abhängig.** Abkürzungen: GPCR = G Protein gekoppelte Rezeptoren; PLC = Phospholipase C; PIP<sub>2</sub> = Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat; DAG = Diacylglycerin; PKC $\epsilon$  = Proteinkinase  $\epsilon$ . Nach Rey et al., 2004.

Da viele Wirkstoffe PKD1 und 2 in vivo über die Aktivierung von PKC aktivieren, soll der PLC-DAG-PKC-Signalweg hier noch einmal näher ausgeführt werden:

PKD Isoformen sind in ihrer inaktiven Form v.a. im Zytoplasma und zu einem kleineren Teil im Golginetzwerk der Zelle lokalisiert (Rey et al., 2003 und 2004). Die oben beschriebene Produktion von DAG induziert eine Translokation der PKDs vom Cytosol zur Plasmamembran (Auer et al., 2005; Maeda et al., 2001).

Außerdem aktiviert DAG allosterisch PKC $\alpha$ ,  $\epsilon$  und  $\eta$ , die so PKD1 an Ser744 und Ser748 (bzw. an entsprechenden Stellen PKD2) transphosphorylieren können. Dadurch kommt es zu einer Konformationsänderung der PKD und zu einer Aufhebung der PH-Domänen induzierten Autoinhibition. Dieser Prozess kann ausschließlich membrangebunden stattfinden.

Die aktivierte PKD löst sich dann von der Zellmembran und dissoziiert rasch in das Zytoplasma. Gleichzeitig kann die Aktivierung von PKD1 durch den GPCR-DAG-PKC-Signalweg auch zu einer verlängerten zellulären Antwort auf einen kurzen hormonalen Stimulus führen, indem ein kleiner Teil der aktivierten PKD1 mit ihrer C1b Region an die aktivierte G $\alpha$ -Untereinheit bindet, anstatt ins Zytoplasma zu dissoziieren (Oancea et al., 2003). Es gibt also bei PKC1 eine schnelle Antwort via C1a und eine protrahierte, über Stunden dauernde Antwort via C1b (Matthews et al., 2000; Oancea et al., 2003). Ob diese Variation auch für die anderen PKD-Isoformen gilt, ist noch nicht geklärt.

In Experimenten lässt sich die DAG Aktivierung durch Phorbolster, wie zum Beispiel 12-O-Tetradecanoyl-Phorbol-13-Acetat (TPA) und Phorboldibutyrat (PDBu), nachahmen (Waldron et al., 2001; Zugaza et al., 1996).

### 1.3.4 Biologische Funktionen von PKD

PKDs sind in ein bemerkenswert breites Feld von fundamentalen biologischen Prozessen mit eingebunden. Es wird immer deutlicher, dass sie eine Schlüsselrolle in der Regulation von Signalwegen, Organisation, Migration, Apoptose und Proliferation von Zellen besetzen.

So können sie die relative Aktivität der Signalwege der Protein-Serin/Threonin-Kinasen der JNK-Familie (c-Jun N-terminale Kinasen) und der ERK-Familie (Extracellulär-signal Regulated Kinasen) modifizieren. Die JNK Aktivierung und die c-Jun Phosphorylierung als Antwort auf den aktivierten Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGF) wird durch Phosphorylierung des EGF-Rezeptors (Bagowski et al., 1999) in direkter Interaktion von JNK mit aktivierter PKD1 und Phosphorylierung von c-Jun deutlich abgeschwächt (Hurd et al., 2002). Dadurch wird das Zellwachstum gebremst. Der Raf-MEK/MAPKK-ERK-Signalweg wird über Interaktion von RIN1, Ras und 14-3-3 Proteinen mit aktivierter PKD1 und PKD2

stimuliert und führt so zu einem beschleunigten Zellzyklus (Sinnott-Smith et al., 2004; Sinnott-Smith et al., 2007; Van Lint et al., 2002).

In Swiss3T3 Zellen resultiert eine durch den GPCR-Agonisten Bombesin induzierte Überexpression von PKD1 und PKD2 zu einer verstärkten DNA-Synthese und Zellwachstum (Sinnott-Smith et al., 2007; Zhukova et al., 2001). In endothelialen Zellen begünstigt hingegen nur PKD2 und nicht PKD1 die Angiogenese durch erhöhte Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren, die zu einer vermehrten Proliferation und zur Migration dieser Zellen führt (Hao et al., 2008). Auch in neuroendokrinen Zellen ist eine besondere Bedeutung von PKD2 für Invasion und Proliferation der entarteten Zelle nachgewiesen (Jackson et al., 2006). In gesunden, langsam proliferierenden Epithelzellen wird PKD1 mehr exprimiert als PKD2, in entarteten epithelialen Zellen verschiebt sich hingegen das Verhältnis von PKD1 zu PKD2 zu Gunsten von PKD2. Dies deutet auf eine wichtige Rolle der PKD2 für die Vermittlung von tumorspezifischen Eigenschaften der epithelialen Tumorzelle hin (Johannes et al., 1994; Sturany et al., 2001).

Des Weiteren scheinen sowohl PKD1 als auch PKD2 eine wichtige Rolle für das Überleben von Zellen zu spielen. In HeLa-Zellen führt oxidativer Stress über PKD1-Aktivierung zu einer NF- $\kappa$ B Aktivierung und damit zum Zellüberleben. In LAMA84 geschieht die zum Zellüberleben nötige NF- $\kappa$ B Aktivierung über eine BCR-Abl-Tyrosinkinase-vermittelte PKD2-Aktivierung (Mihailovic et al., 2004; Storz et al., 2003). Darüberhinaus beschrieben Endo et al. (2000), dass in humanen leukämischen Myeloidzellen, die mit genotoxischen Substanzen behandelt worden waren, eine Caspasen induzierte Spaltung von PKD1 zu beobachten war, die so zu einer Aktivierung der katalytischen Einheit der PKD1 und damit zur Einleitung der Apoptose führte. Proteinkinasen D scheinen also den Zellzyklus auf mannigfaltige Art und Weise zu beeinflussen.

Die Rolle der PKDs in der Immunregulation ist durch mehrere Studien unterstützt, PKD1 ist in T- und B-Zellen exprimiert und wird durch Vernetzung der B- und T-Zell-Rezeptoren aktiviert (Matthews et al., 2000; Sidorenko et al., 1996). Selbiges ist für PKD3 in B-Zellen belegt (Matthews et al., 2003).

### 1.3.5 PKD – Einfluss auf das Transgolginetzwerk

PKD1 ist in bestimmten Zelllinien (Magenantrumzellen, Zervixkarzinomzellen, hepatozelluläre Karzinomzellen und Nierenepithelzellen) ein ortsständiges Protein des Golgikompartmentes und hat dort Teil an der Organisation des Golgiapparats, indem sie die Abschnürung der Vesikel vom TGN entlang des konstitutiven Transportprozesses reguliert (Jamora et al., 1996; Liljedahl et al., 2001; Moore et al., 1999; Prestle et al., 1996;). In einem interessanten Versuch mit nicht polarisierten HeLa-Zellen zeigte Liljedahl (Liljedahl et al., 2001), dass sich die katalytisch inaktiven PKDs analog der Wildtypform im TGN lokalisieren und dort dann zu einer extensiven Tubulation des Transgolginetzwerks mit Retention des Transportguts in dieser Region führen. Die Abspaltung der Vesikel für den Proteintransport zur Plasmamembran in HeLa-Zellen scheint also nur erfolgen zu können, wenn die Proteinkinase D1 in aktivierter Form vorliegt (Liljedahl et al., 2001).

Der Mechanismus, wie PKD1 die Vesikelbildung am Transgolginetzwerk von epithelialen Zellen vermittelt, wurde in den letzten Jahren genauer erforscht: Die lokale Produktion von DAG an den TGN-Membranen ist essentiell für die Rekrutierung von PKD1 zur Golgimembran, an der die Proteinkinase dann mit seiner ersten Zinkfinger-Region an DAG bindet (Baron et Malhotra., 2002; Maeda et al., 2001). Maeda formulierte deshalb die Hypothese, dass PKDs über die DAG-Verteilung auf der Membran des Golgiapparates spezifisch an solche Stellen des TGN rekrutiert werden, an denen die Abschnürung von Transportcarriern zur Zelloberfläche stattfinden soll und die durch bestimmte Moleküle, z.B. TGN46, markiert sind (Maeda et al., 2001). Die Bindung von PKD an die Membranen des TGN via DAG erlaubt dann wiederum die Rekrutierung von Effektorproteinen, die an ihrer regulatorischen Domäne binden. Diese besteht aus C1a, C1b und der PH-Domäne. Der Komplex aus PKD1 und ihren Effektoren kann lokale Deformierungen an der TGN-Membran hervorrufen und so zur Abspaltung von Vesikeln führen (van Lint et al., 2002). Zwei mögliche Effektoren werden durch Van Lint vorgeschlagen: Katalytisch aktivierte PKD1 assoziiert mit Phosphatidylinositol 4-Kinase und Phosphatidylinositol-4-Phosphat 5-Kinase, die dann phosphorylierte Inositol-Lipiden synthetisieren können (Hsuan et al., 1998; Nishikawa et al., 1998). Ein anderer möglicher Effektor könnte die DA-Kinase sein,

die nach ihrer Aktivierung zu einer Bildung von phosphatidic acid, einem Fission-promoting Lipid, führt (Schmidt et al., 1999).

2004 zeigten Yeaman et al. indes, dass in HeLa-Zellen keine endogene PKD1, sondern nur endogene PKD2 und 3 exprimiert werden und dass vor allem PKD2 für die Abspaltung der exozytotischen Transportvesikel vom TGN verantwortlich ist. Da exogen applizierte PKD1 in epithelialen Zellen funktionell redundant zu der endogen exprimierten Proteinkinase D2 zu sein scheint (Liljedahl et al., 2001), ist zu vermuten, dass der für PKD1 oben beschriebenen Mechanismus auch auf PKD2 übertragbar ist.

Zusätzlich zu der postulierten direkten Wirkung als Teil einer Vesikel-Budding-Maschine aktiviert die Proteinkinase D1 durch Phosphorylierung die Phosphatidylinositol 4-Kinase III $\beta$ , die so die Struktur und Funktion des Golgikomplexes wesentlich mitbestimmt und damit zusätzlich eine Kontrolle über den vesikulären Transport gewährleistet (Hausser et al., 2005).

Des Weiteren spielt PKD2 bei Regulation der Sekretion in neuroendokrinen Zellen eine Schlüsselrolle (Li et al., 2008). Wo und wie das Enzym in die komplexen Regulationsmechanismen eingreift, ist allerdings noch nicht ausreichend geklärt und Gegenstand dieser Arbeit.

### **1.4 Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit ist es, die Wirkung und Wirkweisen der PKD2 auf die Sekretion in neuroendokrinen Zellen, hier am Beispiel der Zelllinie BON, zu untersuchen. Dabei musste zunächst geklärt werden, ob PKD2 in neuroendokrinen Tumorzellen exprimiert wird und wo sie sich in der Zelle lokalisiert. Danach sollte mithilfe von Überexpression von unterschiedlich aktiven PKD2-Mutanten und Ausschalten der endogenen Expression von PKD2 durch selektive siRNA untersucht werden, ob und wie PKD2 in die basale und stimulierte Sekretion von neuroendokrinen Zellen eingreift. Der Schwerpunkt lag dabei darauf zu erkennen, auf welcher Ebene der Sekretionsregulation PKD2 angreifen könnte. Die durch die unterschiedlichen Aktivitätszustände der PKD2 hervorgerufenen Effekte innerhalb der Zelle sollten unter Zuhilfenahme von GFP-markiertem CgA mit In-Vivo-Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden. Dadurch sollen Rückschlüsse auf die Angriffspunkte der PKD in neuroendokrinen Zellen gewonnen werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Medien, Plasmide

Sämtliche Chemikalien wurden in p.a. Qualität von den Firmen Fluka (Buchs, Schweiz), Merck (Darmstadt), Roche (Basel, Schweiz), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Deisenhofen) bezogen. Auf weitere Bezugsquellen wird in den jeweiligen Methodenabschnitten eingegangen.

#### Antiseren und monoklonale Antikörper

Anti- Golgin 97	InVitrogen, Karlsruhe
Polyklonaler Anti-Chromogandin A – Antikörper	DAKO Diagnostics, Hamburg
Polyklonaler Anti-Aktin-Antikörper	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Polyklonale Anti-Phospho-PKD-Ser744/Ser748 - Antikörper	Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Peroxidasekonjugiertes Antimaus IgG	Amersham Biosciences / Pharmacia, Piscataway, USA
Monoklonale Anti-PKD2 Antikörper	Orbigen, San Diego, USA
Alexa 488, Alexa 568, Alexa 647 markierte Antiziege-, Antikaninchen und Antipferd-Antikörper	InVitrogen, Karlsruhe

Der Anti-Phospho-PKD1-Ser744/Ser748-Antikörper erkennt auch analog die phosphorylierten Serine 706/710 in PKD2.

### Verwendete Kits

Kit	Bezeichnung	Hersteller
Plasmid-Präparation	Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden

### Rekombinante Plasmide

CgA- EGFP	BON-Zell- cDNA- Bibliothek
PKD2-wt/ PKD2-wt-EGFP	Dr. Sabine Sturany, Innere Medizin 1, Universität Ulm
PKD2-S706/710E / PKD2-S706/710E-EGFP	Dr. Sabine Sturany, Innere Medizin 1, Universität Ulm
PKD2-D695A / PKD2-D695A-EGFP	Dr. Sabine Sturany, Innere Medizin 1, Universität Ulm

### Small-Interference RNA

Stealth™ RNAi: PKD2-siRNA: CCUGAGUAUGGCUUCUACGGCCUUU	InVitrogen, Karlsruhe
Stealth™ RNAi Negativkontrolle	InVitrogen, Karlsruhe
Alexa 568 markierte RNA	Molecular Probes, Leiden, Niederlande

### Transfektionsreagenzien

FuGENE 6	Roche, Indianapolis,USA
Lipofectamine 2000	InVitrogen, Karlsruhe
HiPerfect	Qiagen, Hilden
Nucleofector-System	Amaxa, Köln
Nucleofector-Kit	Amaxa, Köln



### **2.1.2 BON-Zellen**

BON-Zellen sind humane neuroendokrine Tumorzellen, die sich bereits in der Forschung bewährt haben. Sie gelten als ein „Modell-System“ für die Erforschung von neuroendokrinen Tumoren (Evers et al., 1994). Seit der Etablierung 1986 durch Townsend Jr. und Mitarbeiter befinden sich die Zellen in permanenter Kultivierung.

### **2.1.3 Analysegeräte**

Wir nutzen in unseren Versuchen das Inverted Research Mikroskop Olympus IX 71 (Olympus, Hamburg). Die Bilder wurden durch eine CCD-Kamera (Hamatsu Orca, Hamatsu, Japan) an einen Computer weitergeleitet, auf dem die Bilder dann mit dem Softwareprogramm Simple PCI (Compix, Sewickley, USA) dargestellt werden konnten. Die Bildanalyse wurde im Folgenden mit Image J, einer frei zugänglichen Software (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>), analysiert.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Versuchsdurchführung

Um die subzelluläre Lokalisation von PKD2 und CgA in der Zelle darzustellen, wurden auf Objektträgern wachsende Zellen fixiert und mit fluoreszierenden Antikörpern gefärbt. Zuerst wurden native Zellen zur Darstellung der Kolokalisation von Golgiapparat und Chromogranin A mit CgA-IF und Golgin 97 gefärbt. Der Zellkern wurde zur genaueren Abgrenzung mit DAPI (358nm) dargestellt. In einem zweiten und dritten Versuchsschritt wurde, in mit PKD2-wt-GFP transient transfizierten Zellen, die Kolokalisation von CgA mit PKD2-wt und schließlich die Kolokalisation von CgA und Golgiapparat mit Hilfe der oben genannten Antikörper dargestellt.

Zur Klärung der Frage, ob Inhibition oder Stimulation von PKC einen messbaren Einfluss auf die Sekretion von CgA hat, wurden die Zellen mit dem spezifischen PKC Inhibitor Bisindolylmaleimid (GF) und/oder mit dem stimulierenden Phorbol-12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) behandelt. Der Einfluss der PKD2 auf die Sekretion von CgA in BON-Zellen wurde untersucht, indem die Zellen mit den unterschiedlich aktiven PKD2-Konstrukten transfiziert wurden, bzw. die PKD2 Expression mit Transfektion von PKD2-siRNA unterdrückt worden war. Die CgA Konzentration im Überstand der BON-Zellen wurde mit einem spezifischen ELISA und einer anschließenden Abtastdensitometrie quantifiziert.

Zum Nachweis, ob PKD2-siRNA spezifisch die Bildung von PKD2 verhindert, wurden BON-Zellen mit PKD2-siRNA und Kontroll- siRNA transfiziert, lysiert und die Proteine mit Hilfe von SDS-PAGE extrahiert. Diese wurden mit einem Westernblot unter Zugabe von anti-PKD2- und Anti-Aktin-Antikörper (Ladungskontrolle) weiter analysiert. Die Ergebnisse von 3 unabhängigen Experimenten wurden mittels Abtastdensitometrie ermittelt und mit den Kontrollwerten verglichen.

Die Autokinaseaktivität der verschiedenen PKD-Mutanten wurde mittels In Vitro Kinaseassay (IVK) bestimmt. Dazu wurden die transient transfizierten Zellen lysiert, das Lysat mit Hilfe von polyklonalem anti-GFP-Antikörper immunpräzipitiert und mit dem Immunpräzipitat ein IVK durchgeführt.

Zur Darstellung des Effektes von PKD2-siRNA auf die Verteilung von Chromogranin A in der Zelle wurden die Zellen mit PKD2-siRNA oder Non-Sense siRNA transfiziert, fixiert und mit CgA-IF gefärbt. Gleichzeitig wurden die Kerne mit DAPI (358 nm) markiert. Zur Kontrolle über die Aufnahme der siRNA in die Zelle wurde Alexa 568nm markierte RNA benutzt.

In einem weiteren Versuchsschritt wurde die Verteilung von CgA nach Transfektion mit den unterschiedlichen PKD2-EGFP-Mutanten an fixierten Zellen untersucht. Dazu wurden mit den unterschiedlichen PKD-Konstrukten transfizierte und anschließend fixierte Zellen mit immunfluoreszenz-markierten Anti-CgA-Antikörpern und DAPI gefärbt.

Vesikeltransport erfolgt entlang von Mikrotubuli. Zur Darstellung der Kollokalisierung von CgA und Tubulin wurden mit CgA-GFP transfizierte Zellen fixiert und mit Anti-Tubulin gefärbt. Auf bewegten Bildern stellen sich diese Regionen als Transportstraßen dar. Um herauszufinden, ob PKD2 einen Einfluss auf die Transportgeschwindigkeit der Sekretionsvesikel hat, wurden die Zellen mit den unterschiedlichen PKD-Mutanten transfiziert und dann am Tag nach der Transfektion auf einem auf 37°C vorgewärmten Mikroskop mikroskopiert. Die Dynamik entlang der Transportwege wurde im Folgenden mit dem Softwareprogramm ImageJ analysiert.

Zur Klärung der Frage, ob PKD2 bei der Ausschleusung von Vesikeln aus dem TGN eine Rolle spielt, wurden die Zellen nach erfolgter Transfektion über Nacht bei 20°C gelagert, was zu einer Retention von CgA führt, die sich in einer perinukleären Signalverstärkung darstellen lässt. Bei Erwärmen der Zellen auf dem Mikroskop auf 37°C löst sich diese Retention auf. Je PKD2-Konstrukt wurden mindestens 10 Filme hinsichtlich der Größenveränderung der perinukleären Retention bei Temperaturanhebung analysiert

Der Anteil an Zellen mit perinukleärer CgA-Retention in Abhängigkeit von der PKD2-Aktivität, -Expression und Temperatur wurde quantifiziert, indem Zellen aus je 20 fortlaufenden, nicht überlappenden Feldern bei 100facher Vergrößerung ausgezählt wurden. Aus mindestens drei unabhängigen Experimenten je PKD2-Konstrukt bzw. nicht PKD2 transfizierten Zellen bei 37°C und 18°C wurde der Durchschnitt +/- SD ermittelt.

### **2.2.2 Zellkultur**

Die BON-Zellen wurden in D-MEM – Medium unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (FCS), 1% Penicillin/Streptomycin und 1% L-Glutamin (BON-Medium) in 37°C warmer, feuchter Atmosphäre bei 5% CO<sub>2</sub>: 95% Luft kultiviert.

Alle 4 Tage wurden die Zellen geteilt. Dafür wurden die Zellen mit PBS gewaschen und zum Ablösen der Zellen vom Untergrund mit 1 ml Trypsin inkubiert. Nach Ablösung der Zellen wurde Trypsin mit BON-Medium inhibiert und die Zellen vorsichtig resuspendiert. Verdünnung der Zellen erfolgte dabei im Verhältnis 1:8 bis 1:10 je nach Bewachungsdichte der ursprünglichen Gewebekulturplatte.

### **2.2.3 Immunpräzipitation von PKD2**

Die Zellen wurden mit 50 mM Tris/HCL, pH 7.6, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 2 mM Dithiothreitol, 1% Triton X-100 (Lysepuffer A) sowie 10µg/ml Aprotinin, 100µg/ml Leupeptid, 0.7µg/ml Pepastatin und 1 mM AEBSF als Poteaseinhibitoren lysiert. Der Überstand nach der Zentrifugation wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und mit dem PKD2-Antikörper (1:200; Orbigen, San Diego, USA) für 60 Minuten bei 4°C auf dem Rollschüttler inkubiert. Nach Zugabe von 30µg Protein A-Sepharose 6MB (Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) wurde weitere 60 Minuten bei 4°C inkubiert, kurz abzentrifugiert und die Immunkomplexe zweimal mit Lysepuffer A gewaschen. Zu den abzentrifugierten, gewaschenen Protein A Sepharose Kügelchen wurde 2x SDS-PAGE-Probenpuffer gegeben, das Gemisch 5 min bei 95°C erhitzt und die eluierten Proteine mittels SDS -PAGE und anschließendem Western Blot (siehe unten) analysiert.

### **2.2.4 Western Blot**

Serumfrei kultivierte BON-Zellen wurden in 50 mM Tris/HCL, pH 7,6; 5 mM EDTA, 100 mM NaCl, 40 mM β-Glycerophosphat, 50 mM NaF, 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% Triton X-100, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin 15 min bei 4°C lysiert und anschließend für 10 min zentrifugiert (14 000 U/min bei 4°C). Der Überstand wurde mit 200µl 5x SDS-PAGE-Probenpuffer (30% (w/v)

Glycerin, 4% (w/v) DSD, 50 mM TrisHCL pH 6,8, 5% (w/v) DTT, 0,005% (w/v) Bromphenolblau) pro ml Zelllysate versetzt und für 5 min bei 95°C erhitzt.

SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) Proteine wurden in einem diskontinuierlichen SDS-Elektrophoresesystem nach Lämmli (Lämmli, 1970) in einem Sammelgel (Sammelgelpuffer: 0,5M TrisHCL; pH 6.8 mit 4% Acrylamid) und einem anschließenden Trenngel (Trenngelpuffer: 1,5M TrisHCL; pH 8,8 mit 10% bzw. 12,5% Acrylamid) aufgetrennt. Die in der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden durch Elektrotransfer (4h bei 400 mA) auf eine PVDF-Membran (Millipore) transferiert (Transferpuffer: 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol). Die PVDF-Membran wurde nach dem Transfer zum Blocken der freien Bindungsstellen für 1h bei RT in PBS mit 3% Milchpulver (fettfrei) inkubiert. Dann wurde die Membran mindestens 1h mit entsprechend in PBS mit 3% fettfreiem Milchpulver verdünntem Antikörper geschwenkt. Als Erstantikörper dienten polyklonale Anti-Chromogranin A-, Anti-Aktin-, Anti-PKD-Ser744/748, Anti-GFP-Antikörper oder monoklonale Anti-PKD2 Antikörper. Die Immundetektion spezifischer Proteine erfolgte im Folgenden mit Peroxidasegekoppelten anti-Maus Zweitantikörpern in 0.05% PBS/Tween20, mit denen die Proben nach mehrmaligem Waschen mit 0.05% PBS/Tween20 für eine Stunde inkubiert wurden. Zur Visualisierung der Immunkomplexe wurde die Membran anschließend mehrmals mit PBS/0.05% Tween 20 gewaschen und mit Substratlösung (Enhanced Chemo-Luminescence=ECL) (Amersham Biosciences / Pharmacia, Piscataway, USA) für die Peroxidase 1 min inkubiert und auf einen Röntgenfilm (BioMaxLight-1/BioMaxML, Eastman Kodak) zwischen 1 und 30 min exponiert.

### **2.2.5 In Vitro-Kinaseassay**

Die Kinaseaktivität von PKD2 und ihren Mutanten und der Effekt von PDBu wurde mittels In Vitro-Kinaseassays untersucht. PKD2-Immunpräzipitate wurden wie oben beschrieben hergestellt und die Immunkomplexe zweimal mit Lysierungspuffer A, zweimal mit Lysierungspuffer B (Lysierungspuffer 1 ohne Triton X-100) und zweimal mit Kinasepuffer (30 mM Tris/HCL, pH 7,4, 30 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT) gewaschen und anschließend trocken gesaugt. Für eine Untersuchung der Autokinaseaktivität wurden die gewaschenen Immunkomplexe

in 20µl Kinase Puffer mit 100 µM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP – 400-600 cpm/pmol (Amersham Biosciences/Pharmacia, Piscataway, USA) resuspendiert und für 10 min bei 30°C inkubiert. Nach Stoppen der Kinaseaktivität mit 20 µl 2x SDS-Probenpuffer und 5 min Erhitzung bei 95°C, erfolgte eine Analyse mittels SDS-PAGE. Nach der SDS-PAGE wurde das Gel für 5 min in Fixierlösung (Essigsäure:7%, Methanol:25%) fixiert, getrocknet und auf einen Röntgenfilm (BioMaxLight-1/BioMaxML, Eastman Kodak) zwischen 30 min und 2 h exponiert.

### **2.2.6 Fixierung transfizierter Zellen**

BON-Zellen wurden wie oben beschrieben auf Deckgläschen ausgesät und transfiziert. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen einmal mit warmem PBS gewaschen und dann mit 3,7 % Formaldehyd in PBS für 10-20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden sie erneut 2x mit PBS gewaschen und das Formaldehyd mit 50 mM Ammoniumchlorid in PBS inaktiviert. Nach 10 Minuten wurden die Zellen erneut 2x mit PBS gewaschen, anschließend die Deckgläschen mit Mounting Medium auf Objektträger aufgebracht und über Nacht bei Raumtemperatur ausgehärtet.

### **2.2.7 Immunfärbungen**

Bei dieser Methode wird im ersten Schritt ein spezifischer Antikörper (Primärantikörper) auf die Zellen aufgebracht. In einem zweiten Schritt wird ein Antikörper aufgetragen, der sich gegen den ersten Antikörper richtet. Es ist der so genannte Sekundärantikörper, der hier typischerweise mit einem Fluorochrom (Alexa 488 nm, 568 nm, 647nm) gekoppelt ist, das nach Anregung bestimmte Wellenlängen ausstrahlt. Für die Immunfärbungen erfolgte die Fixierung der Zellen wie oben beschrieben. Nach der Inaktivierung des Formalins wurden die Zellen erneut 2x gewaschen und die Zellen anschließend zur Permeabilisierung mit 0.1% Triton für 5 bis 10 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Fishskin-Gelatine 0.2%PBS (50 ml PBS + 0.1 ml Fishskin) für 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde der in Fishskin-Gelatine 0.2% PBS verdünnte Antikörper aufgetragen und für weitere 60 min

inkubiert. Nach erneutem mehrmaligen Waschen wurde der sekundäre Antikörper in Fishskin-Gelatine 0.2% PBS verdünnt aufgetragen. Nach 60 min wurden die Zellen 6 bis 8x mit Fishskin-Gelatine 0.2% PBS gewaschen und das Präparat mit Mounting Medium eingedeckelt. Alternativ erfolgte das Eindeckeln bei gleichzeitig erwünschter Färbung des Zellkerns mit ProLong Gold Antifade Reagent mit DAPI (Invitrogen, Carlsbad, USA). So konnten je nach Fragestellung unterschiedliche Zellstrukturen und Lokalisationen von Chromogranin A auch im Vergleich zur Lokalisation transient transfizierten GFP-markierten Proteine in der Zelle dargestellt werden.

### **2.2.8 Sekretionsanalysen (Assays)/ Sekretionsuntersuchung**

Um die Chromogranin A Sekretion in nativen BON Zellen zu ermitteln wurden die Zellen mit Krebs-Ringer-HEPES Puffer für 2 h bei 37°C inkubiert. Dann erfolgte eine vierstündige Inkubation mit dem spezifischen PKC-Inhibitor Bisindolylmaleimid (5µM GF-109203X) (Chemicon; Temecula, USA) oder mit der gleichen Menge neutraler Lösung. Anschließend wurden die Zellen mit 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) (400 nM, jeweils in D-MEM-Medium verdünnt) für 25 min bei 37°C stimuliert. Dann wurde der Überstand aspiriert und sofort bei -80°C gelagert. Die Chromogranin A-Konzentration wurde daraus im Folgenden mithilfe eines spezifischen Chromogranin A ELISAs (DAKO Diagnostics, Hamburg) gemäß der Herstellerangaben ermittelt. Als Vergleich diente das Aspirat aus einer unstimulierten Kontrollgruppe.

In Zellen mit Überexpression von PKD2-wt und PKD2-da erfolgte 24 bis 48h nach der Transfektion die oben beschriebene 25minütige Stimulation mit TPA oder mit der gleichen Menge Kontrolllösung in serumfreiem Nährmedium. Der Überstand wurde mit einem Western Blot mit polyklonalem CgA Antikörper untersucht und die CgA-Konzentration mittels Abtastdensitometrie quantifiziert.

Alternativ wurden BON-Zellen mit Amara-GFP und pCDNA3-PKD2wt, pCDNA3-PKD2se, oder pCDNA3-PKD2da transfiziert, dann gewaschen und mit serumfreiem Medium über Nacht inkubiert. Im Folgenden wurde der Zellüberstand aspiriert und mit dem Aspirat ein Anti-CgA Western Blot mit polyklonalem CgA

Antikörper durchgeführt. Die Expressionsrate der pCDNA wurde mittels Visualisierung der Expression von Amara GFP kontrolliert.

### 2.2.9 Generierung der Plasmid-DNA

Kompetente *E. coli* XL-1blue-Bakterien (Bullock et al., 1987) wurden auf Eis aufgetaut und 0,1 bis 1 µg der Plasmid-DNA zu 50 µl kompetente *E. coli* Zellen pipettiert. Zur Transformation wurden die Bakterien für 20 min auf Eis inkubiert und einem anschließenden Hitzeschock bei 42°C für 2 min zugeführt. Anschließend wurden die Bakterien auf Ampicillin-Platten (LB-Medium 1,5% (w/v) Agar, 100µg/ml Ampicillin) ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert.

Zur Gewinnung des Plasmides wurde das Quiagen Mini Kit nach der Methode der alkalischen Bakterienlyse entsprechend dem Herstellerprotokoll verwendet:

Die gewonnene Bakterienzellmasse wurde bei 3000 U/Min für 15 min abzentrifugiert und in 0,3 ml des RNase-haltigen Puffers P1 resuspendiert (Degradation bakterieller RNA). Durch Zugabe von 0,3 ml SDS- und NaOH-haltigem Puffer P2 und 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellwände der Bakterien unter vorsichtigem Schütteln gelöst und chromosomale DNA sowie Proteine denaturiert. Das Lysat wurde anschließend mit 0,3 ml des sauren, Kaliumacetat-haltigen Puffers P3 für 5 Minuten auf Eis unter Schütteln inkubiert. Durch das entstandene Kaliumdodecylsulfat bildeten die denaturierten Proteine und DNA sowie der bakterielle Zelldetritus unlösliche Komplexe und wurden zusammen mit dem Salz präzipitiert, während die Plasmid-DNA bei wieder neutralem pH-Wert renaturieren konnte.

Nachdem die Lösung bei 15.000 U/Min und 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert wurde, wurde der jetzt klare und die DNA enthaltende Überstand in die, mit 1 ml Puffer QBT vorher equilibrierten, Anionenaustauscher-Säulen gefüllt. Die negativ geladene DNA wird bei Durchlaufen der Anionenaustauscher-Säulen an das Säulenmaterial gebunden, während degradierte RNA und Proteine nicht binden. Es erfolgte das zweimalige Waschen der Säulen mit jeweils 2 ml Puffer QC der eine Salzkonzentration von 1 M besitzt, um Spuren von Proteinen oder RNA-ase zu eliminieren, bevor die gebundene DNA mit 0,8 ml Puffer QF ausgeschlämmt wurde.



Das so entstandene Eluat wurde mit 0,56 ml Isopropanol gefällt. Bei 10.000 U/Min wurde die Plasmid-DNA dann für 15 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert und in 300 µl sterilem TE-Puffer resuspendiert.

Die Konzentration an gewonnener Plasmid-DNA konnte aus der Messung der verdünnten Suspension (10 µl der Suspension in 990 µl TE-Puffer) mit dem RNA/DNA Calculator Genequant berechnet werden: 5x Meßwert = DNA in µg/µl.

### **2.2.10 Transfektion**

#### **2.2.10.1 Transfektion mit FuGENE**

Bei der Transfektion von Zellen mit dem Reagenz FuGENE handelt es sich um einen Liposomen-vermittelten Gentransfer. Die zu transfizierende DNA wird von polykationischen Lipiden komplexiert und in dieser Form durch Verschmelzung mit der Zellmembran oder über Endozytose in die eukaryotischen Zellen aufgenommen. 24 h vor der Transfektion mit DNA der PKD2-Konstrukte wurden BON-Zellen auf die Wells einer 6-Well-Gewebsplatte verteilt und bei 37°C inkubiert.

Die Transfektion erfolgte im Verhältnis 2:1 oder 3:2 (Fugene zu cDNA), dafür wurde je 0,5 µg cDNA pro Milliliter Zellsuspension die entsprechende Menge Fugene in D-MEM gemischt und nach 15 minütiger Inkubation 100 µl dieser Mischung auf jedes Well getropft. Bei der Kotransfektion von CgA + PKD2-Mutanten (2x 0,5 µg cDNA pro ml) verdoppelte sich die FuGene Menge entsprechend.

Danach folgte je nach Versuchsaufbau vor der Weiterverwendung der Zellen eine Inkubation von mindestens 24 h.

#### **2.2.10.2 Transfektion mit Nucleofector**

Diese Art der Transfektion stellte eine Mischung aus Elektroporation und liposomaler Transfektion dar. Hierfür wurde das Gerät (Nucleofector) und der Kit der Firma Amaxa verwendet. BON Zellen einer konfluent bewachsenen 10 cm Schale wurden bei 1000 U/min für 4 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert und das überstehende Medium vorsichtig abgesaugt. Das Zellpellet wurde in 100 µl

Solution-R resuspendiert, 5 µg DNA zugesetzt und in eine sterile Elektroporationsküvette transferiert. Die Elektroporation wurde für BON Zellen mit dem Programm A-23 durchgeführt. Anschließend wurden die Zellen mit DMEM inkl. FCS verdünnt und in einer Dichte von  $4 \times 10^4$  Zellen pro 33 mm Schale ausgesät. Für Experimente wurden die Zellen 24 bis 48 h nach der Transfektion eingesetzt.

### **2.2.10.3 Transfektion mit HiPerfect**

HiPerfect ist ein hoch effizientes siRNA Transfektions Reagenz auf Lipidbasis. 150 ng PKD2-siRNA (CCUGAGUAUGGCCUUCUACGGCCUUU) wurde in 100 µl D-MEM verdünnt und dieser Mischung anschließend 12 µl HiPerfect Reagenz hinzugefügt. Nach dem Durchmischen wurde die Mischung 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf die Zellen getropft. 24 bis 48 h später konnten die Zellen für die Experimente genutzt werden.

### **2.2.10.4 Kotransfektion von siRNA und Plasmid DNA mit Lipofectamin 2000**

Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagenz ist wie FUGENE und HiPerfect eine polykationische Lipidrezeptur, die Liposomen-vermittelten Gentransfer in die eukaryotische Zelle von DNA und RNA ermöglicht. Einen Tag vor der geplanten Transfektion wurden  $25 \times 10^4$  Zellen mit 2 ml antibiotikafreiem Medium (D-MEM, 10% FCS, 1% L-Glutamin) ausplattiert. Für die Transfektion wurden 1 µg Plasmid CgA-DNA und 50 pmol PKD-siRNA in 250 µl Opti-MEM verdünnt und leicht gemischt. Anschließend wurde 2,5 µl Lipofectamin 2000 in 250 µl Opti-MEM verdünnt und ebenfalls leicht durchgemischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden die Verdünnungen von siRNA/DNA und Lipofectamin2000 vermischt, leicht geschüttelt und bei Raumtemperatur 20 Minuten zur Komplexbildung inkubiert. Das DNA-siRNA-Lipofectamin 2000-Gemisch wurde dann auf die Schalen einer 6-Well-Platte getropft. Anschließend wurde sie bei 37°C im CO<sub>2</sub> Inkubator über Nacht inkubiert.

Am darauf folgenden Tag wurden die Zellen erneut mit siRNA transfiziert. Dazu wurde 150 ng Kontroll- siRNA + 150 ng PKD2-siRNA in 100 µl D-MEM verdünnt und dieser Mischung anschließend 18 µl HiPerfect Reagent hinzugefügt (die finale siRNA Konzentration entspricht somit 5nM). Nach dem Durchmischen wurde die Mischung 5 bis 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und dann auf die Zellen getropft.

### **2.2.11 Bildgebung**

#### **2.2.11.1 Vorbereiten der Zellen zum Mikroskopieren**

Zum Mikroskopieren von lebenden Zellen wurde eine versiegelte, mit Medium gefüllte Observationskammer benutzt. Dafür wurde ein Deckglas mit Silikon auf eine Aussparung in einem Stahlobjektträger geklebt, mit Paraffin versiegelt und wiederum mit Silikon die Grenzen der Kammer vorgeformt. Diese „Kammer“ wurde mit 400 µl Mikroskopiermedium (50 ml D-MEM-White, 0.250 g BSA (Serva-Electrophoresis GmbH), 20mM Laktat + 10 µl Oxyrase je 1 ml Medium) gefüllt. Die mit Zellen bewachsenen Deckgläser wurden 1x mit PBS gewaschen und mit der Zellseite zur Flüssigkeit auf die Kammer gelegt, angedrückt und schließlich mit Wachs versiegelt.

#### **2.2.11.2 Erstellung von Filmsequenzen**

Der Objektisch des Mikroskops wurde vorab auf 37°C aufgewärmt. Die Probe wurde mit blauem Licht (446-477nm Wellenlänge) bestrahlt. Dieses wurde vorher durch einen Filter auf 1/12 seiner Intensität reduziert, um den Bleichungseffekt so gering wie möglich zu halten. Das blaue Licht erzeugt bei dem GFP eine sekundäre grüne Fluoreszenz, die unter dem Mikroskop sichtbar wird.

Zur Darstellung der Zellen wurde die 100fache Vergrößerung mit Ölimmersion genutzt. Sobald eine geeignete Zelle gefunden wurde, wurde auf die Kamera umgestellt und die Zelle bestmöglich auf dem Bildschirm eingestellt. Zur Darstellung und Speicherung der Bilder auf dem Computer wurde die Bildverarbeitungssoftware Simple PCI genutzt.

Die Zellen wurden pro Bild ca. 0,4 Sekunden mit Fluoreszenzlicht bestrahlt. Bilder wurden alle 10 Sekunden gemacht, bei Bedarf wurde während einer Filmsequenz nachfokussiert. Beendet wurde der Film nach Serien von maximal 300 Bildern, oder wenn die emittierte Lichtintensität vorab schon zu schwach geworden war, um die Zelle adäquat auf dem Bildschirm abzubilden.

## **2.2.12 Auswertung mit Image J**

Zur Auswertung wurden die in Simple PCI gespeicherten Filme als Bildserien exportiert und in mit der Bildbearbeitungssoftware ImageJ analysiert.

### **2.2.12.1 Kymographenanalyse**

Für die Analyse der Vesikel- Dynamik wurden einzelne Transportstrassen ausgewählt. Die Vesikelbewegung in die Zellperipherie wurde als Plus-End-Bewegung, die Vesikelbewegung in Richtung Zellkern als Minus-End-Bewegung definiert. Der relevante Bildausschnitt wurde anschließend per Fotomontage als Sequenz zeitlich aufeinander folgender Bilder zusammengestellt. Die so dargestellten Vesikelbewegungen wurden über die Zeit markiert. Die gespeicherten x-y-Koordinaten wurden in Excel übertragen, die Pixeldistanzen in metrische Einheiten umgerechnet und in Hinblick auf Transportrichtung und Geschwindigkeit ( $\mu\text{m/s}$ ) ausgewertet.

### **2.2.12.2 Auswertung der perinukleären Retention**

Pro PKD2- Mutante wurden 10 Filme analysiert, die je mindestens 246 Bilder umfassten. Ausgewertet wurden nur die Filme, die am Anfang eine deutliche Intensitätssteigerung der perinukleären Fluoreszenz aufzeigten. Diese wurde umzeichnet, um dann die Fläche und die Durchschnittslichtintensität zu bestimmen. Dieser Vorgang wurde alle 5 Bilder, entsprechend alle 50 Sekunden, wiederholt,

Die wärmeinduzierte Auflösung des retinierten TGNs manifestiert sich nicht ausschließlich durch eine Größenabnahme, sondern auch durch einen

Dichteverlust, der sich in einem Verlust der Signalintensität präsentiert. Gleichzeitig gibt es auch einen morphologisch ähnlichen Intensitätsverlust der Signalstärke durch Bleichung der Probe, der durch Zerfall des GFPs unter UV-Bestrahlung entsteht.

Um den perinukleären Dichteverlust in unsere Ergebnisse mit einfließen zu lassen, wurden vorab fixierte Zellen mikroskopiert und anhand dieser Filme der durchschnittliche Signalverlust durch GFP Zerfall ermittelt. Dieser wurde von der relativen Lichtstärke abgezogen und die so ermittelte korrigierte Lichtstärke mit der relativen Fläche multipliziert. Die so errechneten Werte wurden in eine Tabelle übertragen und ihr Mittelwert bestimmt. Die Mittelwerte der jeweiligen Versuchsreihen (PKD2-da, PKD2-se, PKD2-wt, PKD2-siRNA), wurden dann mit den Ergebnissen der anderen PKD2-Mutanten und der Kontrollmessung ohne PKD2-Transfektion verglichen. Da im Mittel ein relatives Plateau nach 20 Minuten Filmzeit erreicht worden war, wurden die 0, 5, 10, 15, und 20 Minuten-Werte miteinander verglichen.

### **2.2.13 Statistik**

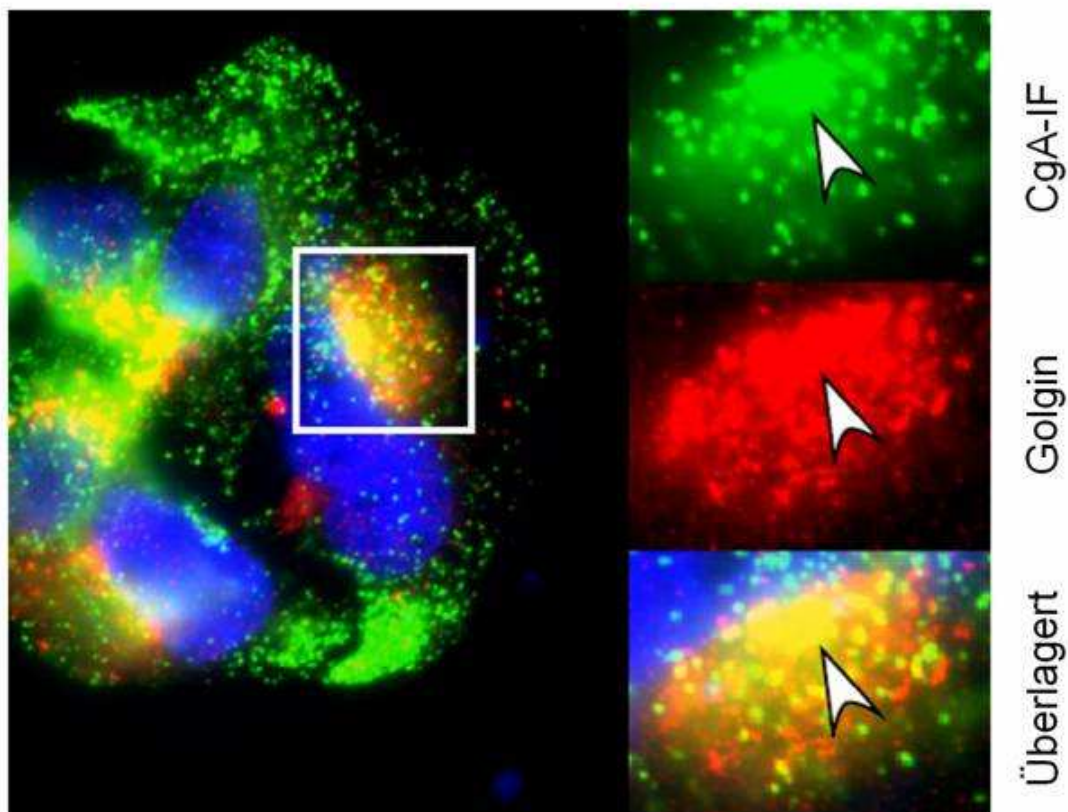
Statistische Analysen wurden mit Hilfe der SigmaStat Software (Version 2,0) durchgeführt.

Zur Bestimmung der statistischen Signifikanz wurde der Anova Test verwendet gefolgt von einem Student-Newman-Keuls post-hoc. Im Folgenden wurde  $p < 0,05$  als statistisch signifikant festgelegt. In den Abbildungen erfolgte lediglich die Darstellung der Standardabweichung, die statistisch nicht signifikanten Ergebnisse wurden im Text als solche aufgeführt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1. CgA enthaltende sekretorische Granula sind in BON-Zellen im Transgolginetzwerk lokalisiert

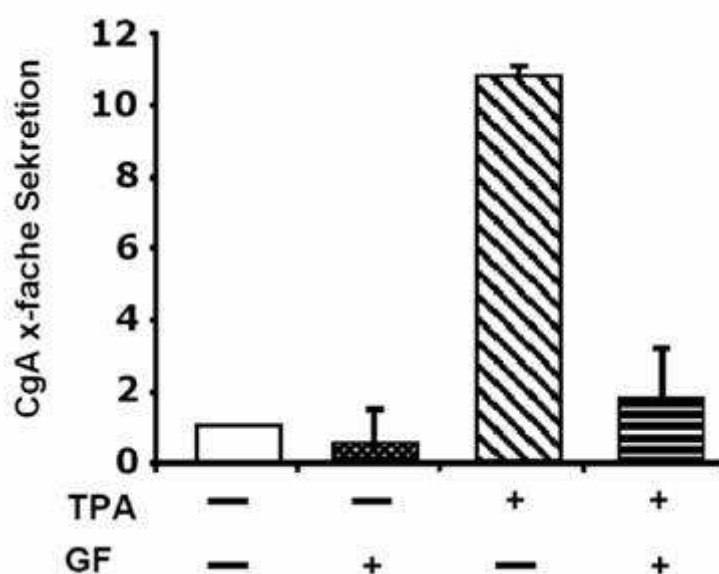
In BON-Zellen konnten per Immunfluoreszenz CgA enthaltende Granula im Zytoplasma nachgewiesen werden, die in der perinukleären Region mit Golgin 97, einem spezifischen Transgolginetzwerk Marker, kolokalisiert sind (siehe Abb.3). Diese Überschneidung fand sich nicht bei dem Einsatz des spezifischen Cis-Golginmarkers GS28 (unveröffentlichte Daten von der AG G. v. Wichert). Das heißt, dass CgA enthaltende Granula ausschließlich in der Trans-Seite des Golginetzwerks zu finden sind.



**Abbildung 3: Kolokalisation von Chromogranin A mit dem Transgolginetzwerk-Marker Golgin 97.** Die fixierten Zellen wurden mit CgA-IF (Immunfluoreszenzantikörper gegen CgA) und Golgin 97 angefärbt. Das weiße Quadrat markiert den 100fach vergrößerten Ausschnitt, der auf der rechten Seite dargestellt ist. Die Pfeile kennzeichnen die große überlappende Fläche, die an den Nucleus angrenzt. Die Nuclei wurden mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI 358 nm) angefärbt.

### 3.2. Stimulation der CgA Sekretion ist in BON-Zellen PKC abhängig

Wenn man mit TPA stimulierte BON-Zellen mit dem PKC Inhibitor Bisindolylmaleimid (GF 5  $\mu$ M) behandelte, sah man in dem Überstand, im Vergleich zu nicht inhibierten Zellen, eine ca. 5fach verringerte CgA Konzentration. Dieser Effekt war auch bei nicht TPA-stimulierten Zellen noch deutlich sichtbar, aber nicht statistisch signifikant. Dies deutet daraufhin, dass sowohl die basale als auch die Phorbol ester-stimulierte CgA Sekretion in BON-Zellen PKC abhängig ist.

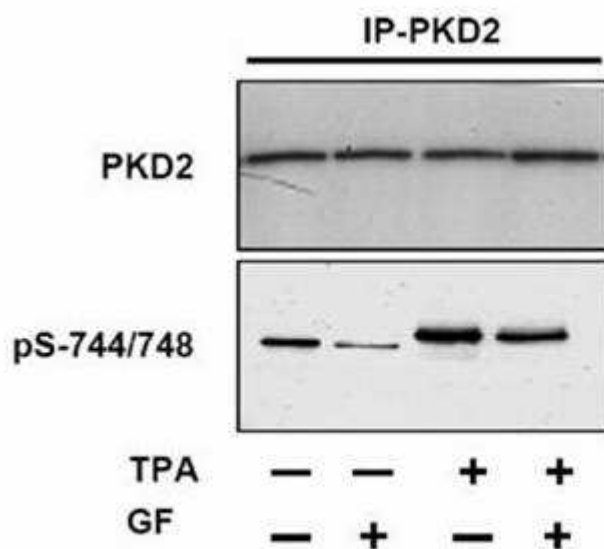


**Abbildung 4: Chromogranin A (CgA) Sekretion in den Überstand von BON-Zellen** gemessen mit einem spezifischen ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay). Zu sehen ist der Mittelwert aus mindestens 3 unabhängigen Versuchen +/- Standardabweichung. Die BON-Zellen wurden vorab für 4 Stunden mit dem spezifischen Proteinkinase C-Inhibitor Bisindolylmaleimide (5 $\mu$ M GF  $\rightarrow$  GF-109203X ) oder mit der gleichen Menge neutraler Lösung (-) inkubiert. Nach einer 25-minütigen Stimulation mit 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) (400 nM), wurde der Zellüberstand aspiriert, sofort bei -80°C gelagert und danach mit einem ELISA analysiert. Als Vergleich diente das Aspirat aus einer unstimulierten Kontrollgruppe (-).

### 3.3. PKD2 wird in BON-Zellen exprimiert und wird durch TPA via PKC in ihrer Aktivität gesteigert

Wie in Abbildung 5 sichtbar ist, wird PKD2 in BON-Zellen exprimiert. Der Aktivitätsstatus der Proteinkinase kann mit Phospho-spezifischen Antikörpern (pS-744/748) gegen die phosphorylierten Serinreste der aktivierten PKD2 beurteilt werden. In den Westernblotuntersuchungen zeigte sich sowohl bei den TPA-

stimulierten Zellen als bei auch den unstimulierten Zellen eine Aktivitätsabnahme nach Behandlung mit Bisindolylmaleimid (GF). PKD2 aus TPA-stimulierten Zellen zeigten in dieser Untersuchung allerdings einen deutlich erhöhten Aktivitätsstatus. Das heißt also, dass PKD2 bereits in ruhenden BON-Zellen teilweise aktiv vorliegt, durch Inkubation mit Phorbol ester aber eine deutliche Aktivitätssteigerung hervorgerufen werden kann. Sowohl die stimulierte als auch die nicht stimulierte PKD2 Aktivierung wird zum großen Teil durch PKC vermittelt.



**Abbildung 5: Western-Blot mit Antikörpern gegen Proteinkinase D2 (PKD2, oben) und Phospho-PKD2-Ser744/748 (unten).** Nach einstündiger Inkubation mit 3,5  $\mu$ M GF 109203X oder mit neutraler Lösung (-) wurden die BON-Zellen für weitere 15 Minuten mit 400 nM 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) oder mit neutraler Lösung (-) inkubiert. Die Lysate der Zellen wurden einer Anti-PKD2-Immunopräzipitation zugeführt, um mit diesem Präzipitat anschließend einen Western Blot gegen PKD2 oder gegen die phosphorylierten Serine der aktivierten PKD2 durchzuführen. Anti-Phospho-PKD-Ser744/748-Ak erkennen dabei auch analog die phosphorylierten Ser706/710 in PKD2.

### 3.4. PKD2 ist in BON-Zellen in vesikulären Strukturen lokalisiert

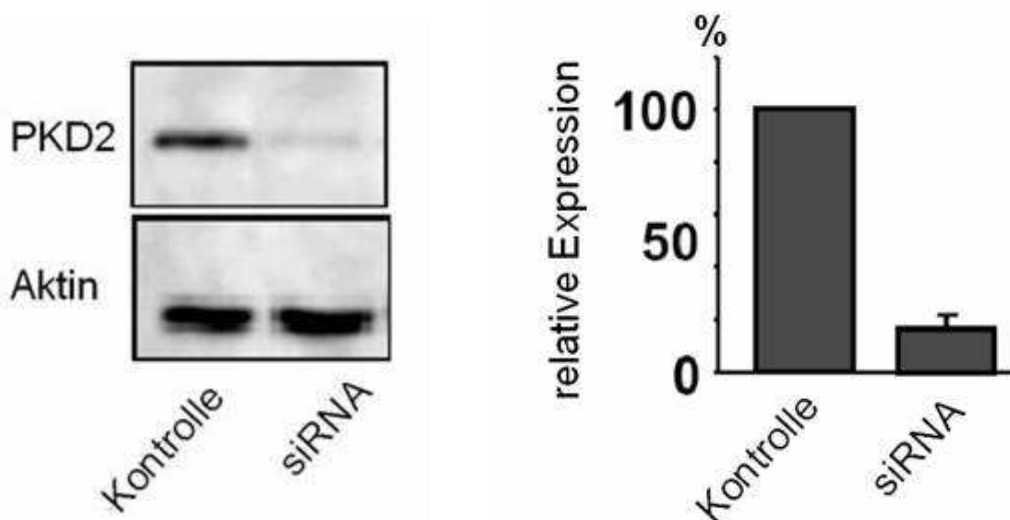
Immunfärbung für CgA in transient mit PKD2wt-GFP transfizierten Zellen zeigte eine deutliche Überlappung der Immunfluoreszenzen von markierten CgA-Antikörpern und PKD2wt-GFP nahe des Zellkerns (Abb. 6 oben).

Zusätzliche Färbung des Präparats mit Golgin 97 verdeutlicht den räumlichen Zusammenhang zwischen PKD2, CgA-enthaltenden Granula und dem TGN

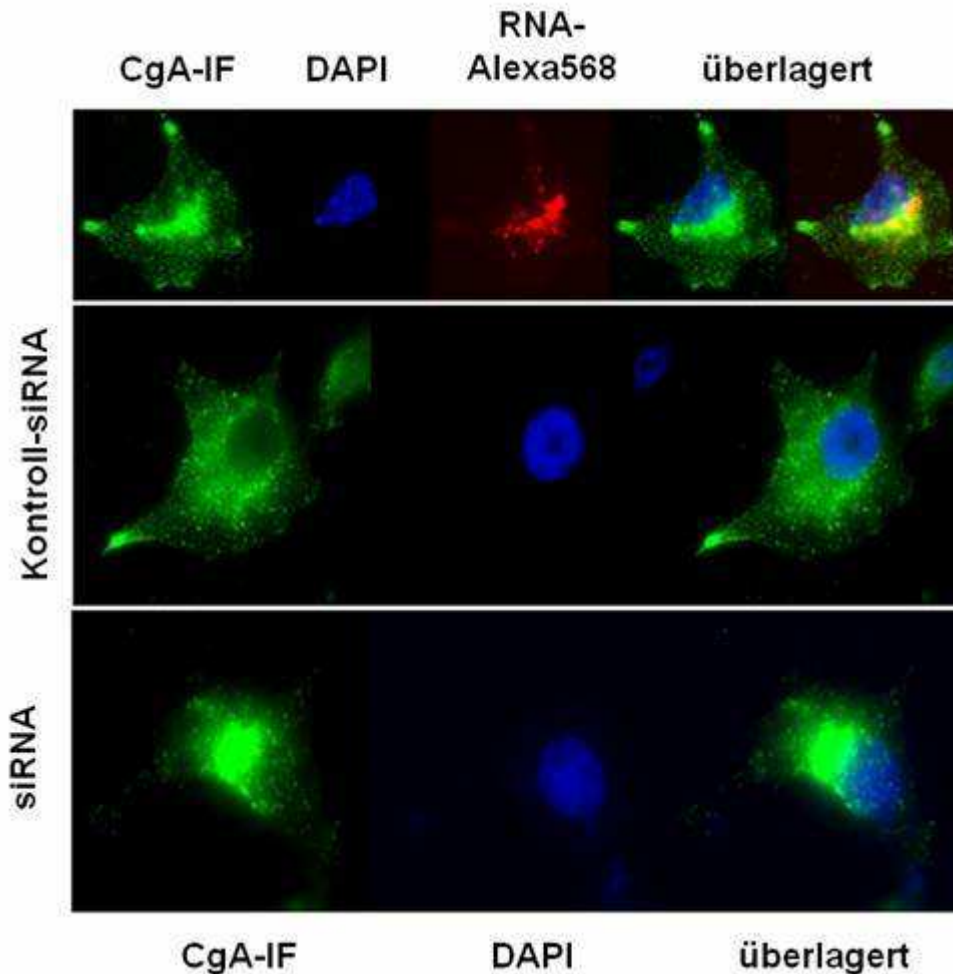




gegen PKD2 geblockt. Wie Abb. 7 zeigt, konnte dadurch die Konzentration von PKD in der Zelle auf <20% gesenkt werden. Abb. 8 stellt exemplarisch den Effekt dar, den die Suppression von PKD2 auf die Verteilung von CgA in der Zelle hat. Zellen die mit siRNA transfiziert worden waren, zeigten, im Vergleich zur Kontrollgruppe mit non-sense siRNA-Transfektion, eine deutliche Zunahme der Fluoreszenzintensität um den Nukleus herum, während sich gleichzeitig in peripheren Anteilen der Zellen kaum CgA darstellen ließ. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Expression von PKD2 entscheidend für die Ausschleusung von sekretorischen Granula aus dem TGN ist.

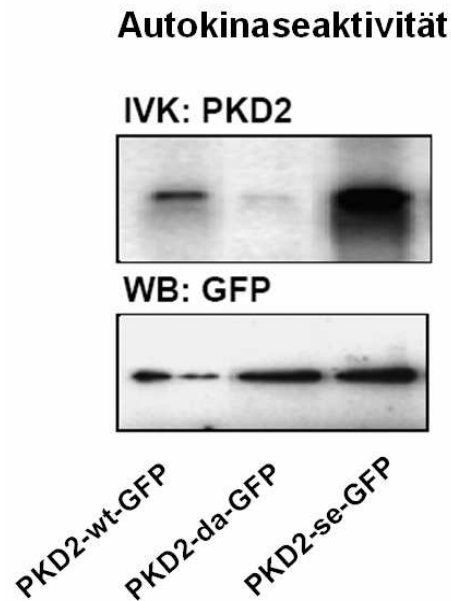


**Abbildung 7: Verhinderung der Proteinkinase D2 (PKD2) Expression durch selektive siRNA.** LINKS: BON-Zellen wurden unter Zuhilfenahme von Highperfect (150ng/12µl) mit spezifischen PKD2- siRNA (small interference RNA) transfiziert. Anschließend wurden die Zellen in Lysepuffer lysiert und die Proteine mit 5fachem SDS-PAGE Probenpuffer extrahiert. Mittels SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) wurden gleichgroße Mengen Proteingemisch aufbereitet und via Western Blot mit spezifischen monoklonalen Anti-PKD2 Antikörpern oder polyklonalen Anti-Aktin Antikörpern weiter analysiert. Als Kontrolle wurden Zellen mit Non-sense RNA-Oligonukleotiden transfiziert. RECHTS: Die Ergebnisse wurden mittels Scanning-Densitometrie analysiert. Die PKD2-Expression in den Kontrollzellen diente als Vergleichsreferenz. Evaluiert wurde der Durchschnitt aus mindestens je drei unabhängigen Versuchen +/- Standardabweichung.



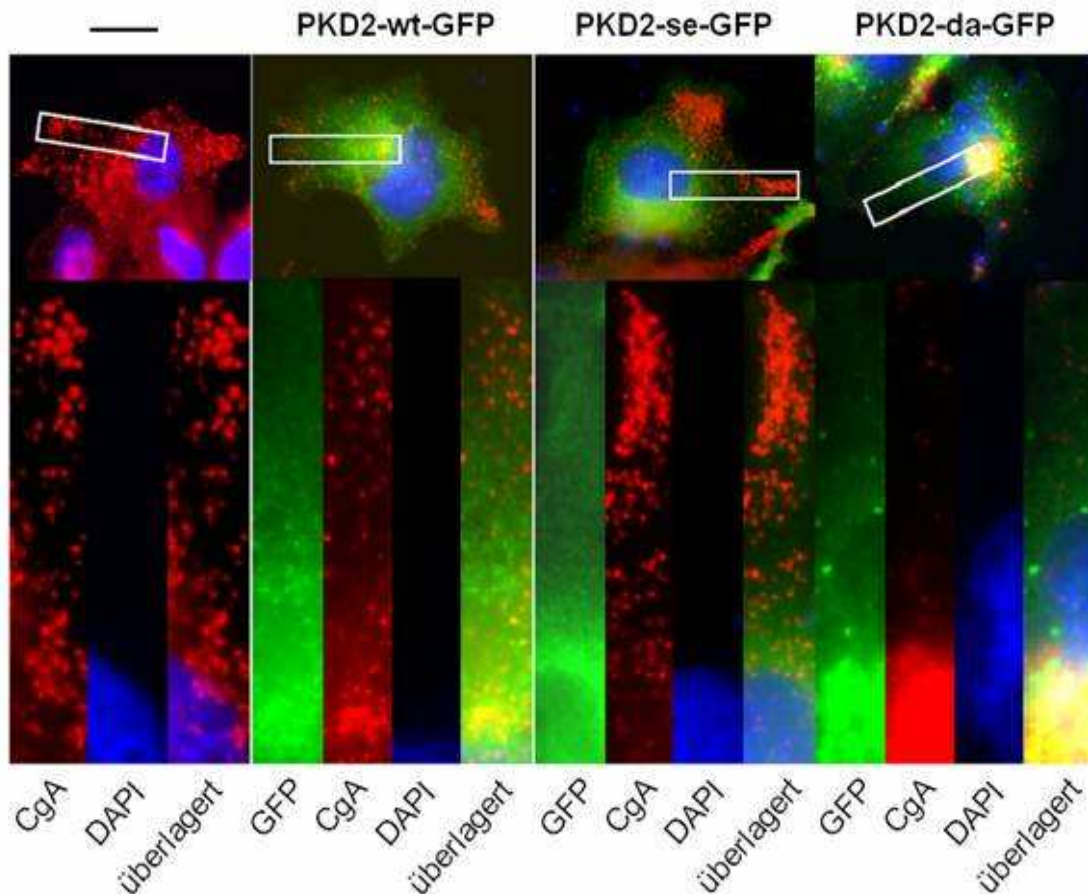
**Abbildung 8: Effekte der spezifischen Proteinkinase D2-siRNA auf die Verteilung von Chromogranin A in der Zelle.** BON-Zellen wurden auf Objektträgern ausplattiert. Transfektion der spezifischen PKD2 siRNA (Proteinkinase D2-small interference RNA) erfolgte mit Highperfect (150ng/12µl). Die Zellen wurden fixiert und Chromogranin A (CgA) mit CgA-Immunfluoreszenz-Ak (CgA-IF) (grün) gefärbt. Als Kontrolle dienten Non Sense RNA-Oligonukleotide. Der Zellkern wurde mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI 358 nm) angefärbt. Abgebildet sind repräsentative Fluoreszenzbilder (100fache Vergrößerung, 1,35 NA, Olympus IX71) aus mindestens drei unabhängigen Versuchen. OBEN: Kontrolle mit Alexa 568nm markierter RNA, die zeigt, dass die siRNA in die Zelle aufgenommen wird. MITTE: Effekte der NON-Sense Kontroll-siRNA auf die intrazelluläre CgA-Verteilung. UNTEN: Effekte der spezifischen PKD2-siRNA auf die CgA-Verteilung in der Zelle.

Um nachzuweisen, ob die alleinige Präsenz von PKD2 in der Zelle für die Bildung von CgA enthaltenden Vesikeln ausreicht oder ob diese von ihrer katalytischen Aktivität abhängig ist, wurden BON-Zellen mit katalytisch unterschiedlich wirksamen PKD-Mutanten transfiziert: Wildtyp PKD2 (PKD2-wt), die, wie oben unter 3.3. beschrieben, auch schon in ruhenden Zellen teilweise aktiv vorliegt, PKD2-S706/710E-GFP, die eine deutlich erhöhte Autokinasaktivität aufweist und PKD2-D695A-GFP, die katalytisch inaktiv ist (Abb. 9)



**Abbildung 9: Autokinaseaktivität der unterschiedlichen Proteinkinase D2 Mutanten.** Nach Transfektion mit je 5µl/ml Wildtyp-Proteinkinase D2 (PKD2wt-GFP), PKD2-S706/710E-GFP (PKD2se-GFP) oder PKD2-D695A-GFP (PKD2da-GFP) mit Fugene 6 (2:1) wurden die BON-Zellen lysiert. Das Lysat wurde mit Anti-Green Fluorescent Protein (GFP)-Antikörpern immunpräzipitiert und danach entweder mit einem In Vitro-Kinaseassay (IVK: PKD2 (Autoradiographie)) oder mit einem Anti-GFP-Western Blot (WB:GFP) weiteranalysiert.

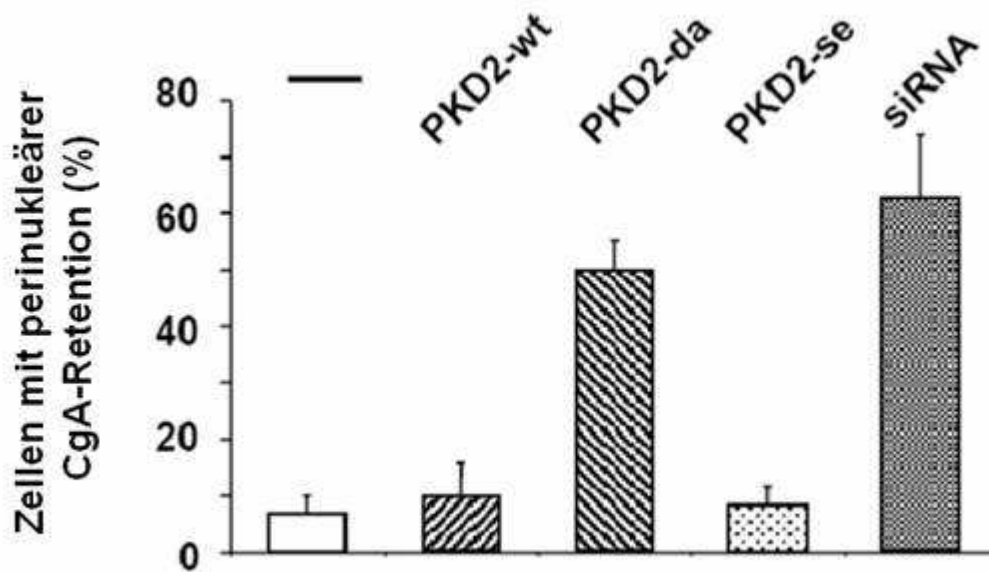
In den Immunfluoreszenzbildern zeigt sich bei der konstitutiv aktivierten PKD2-S706/710E-GFP Mutante eine leichte Zunahme der peripheren Vesikel, bei der PKD2-D695A-GFP Mutante hingegen zeigt sich, ähnlich wie bei der siRNA Transfektion, eine perinukleäre Agglomeration von CgA-Immunfluoreszenz und gleichzeitig eine deutlich verringerte Präsenz im restlichen Zytoplasma (Abb. 10).



**Abbildung 10: Einfluss der Proteinkinase D2 (PKD2) -Aktivität auf die subzelluläre Lokalisation von Chromogranin A (CgA).** BON-Zellen wurden auf Objektträgern ausplattiert, mit Fugene 6 und mit je 0,5 µg/ml Wildtyp (wt) -PKD2-GFP (Green Fluorescent Protein), PKD2-S706/710E-GFP (PKD2<sup>se</sup>-GFP) oder PKD2-D695A-GFP (PKD2<sup>da</sup>-GFP) im Verhältnis 2:1 transfiziert und fixiert. Anschließend erfolgte die Anfärbung von CgA mit Alexa 568nm (rot). Die Rechtecke markieren den unten dargestellten vergrößerten Bereich (100x, 1,35 NA, Olympus IX71). Die Nuklei wurden mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI 358 nm) angefärbt.

Um den Einfluss der verschiedenen PKD-Mutanten und die Inhibition der Expression von endogener PKD mit siRNA auf die perinukleäre Retention zu quantifizieren, wurde der Anteil der retinierten Zellen in den jeweiligen Proben untersucht. Dabei zeigte sich bei PKD2-D695A und siRNA Vorbehandlung, dass bis zu 60% aller Zellen eine Retention aufwiesen, während dies nur bei bis zu 10% der Zellen mit PKD2-wt, PKD2-S706/710E Transfektion und Zellen ohne PKD2-Transfektion zu sehen war (Abb.11)

Dies alles deutet daraufhin, dass das Vorkommen von CgA enthaltenden Vesikeln im Zytoplasma von der PKD2-Aktivierung abhängig ist.

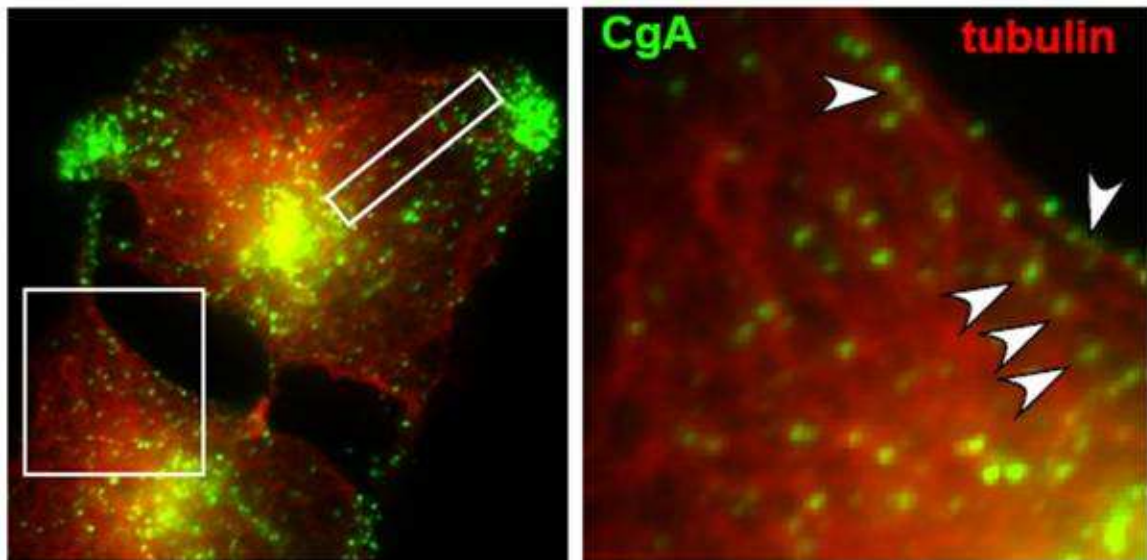


**Abbildung 11: Abhängigkeit der perinukleären Chromogranin-Retention von der Proteinkinase D2-Aktivität.** Transfektion von Wildtyp-Proteinkinase D2 (PKD2-wt), PKD2-D695A (PKD2-da), PKD2-S706/710E (PKD2se) und PKD2 spezifischer siRNA (small interference RNA) (siehe Abb. 11 und Abb. 7). Der Anteil der Zellen mit perinukleärer Chromogranin A (CgA) - Retention an der Gesamtzahl transfizierter Zellen wurde quantifiziert, indem Zellen aus je 20 fortlaufenden, nicht überlappenden Feldern bei 100facher Vergrößerung ausgezählt wurden. Dargestellt ist der Durchschnitt aus mindestens drei unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichung.

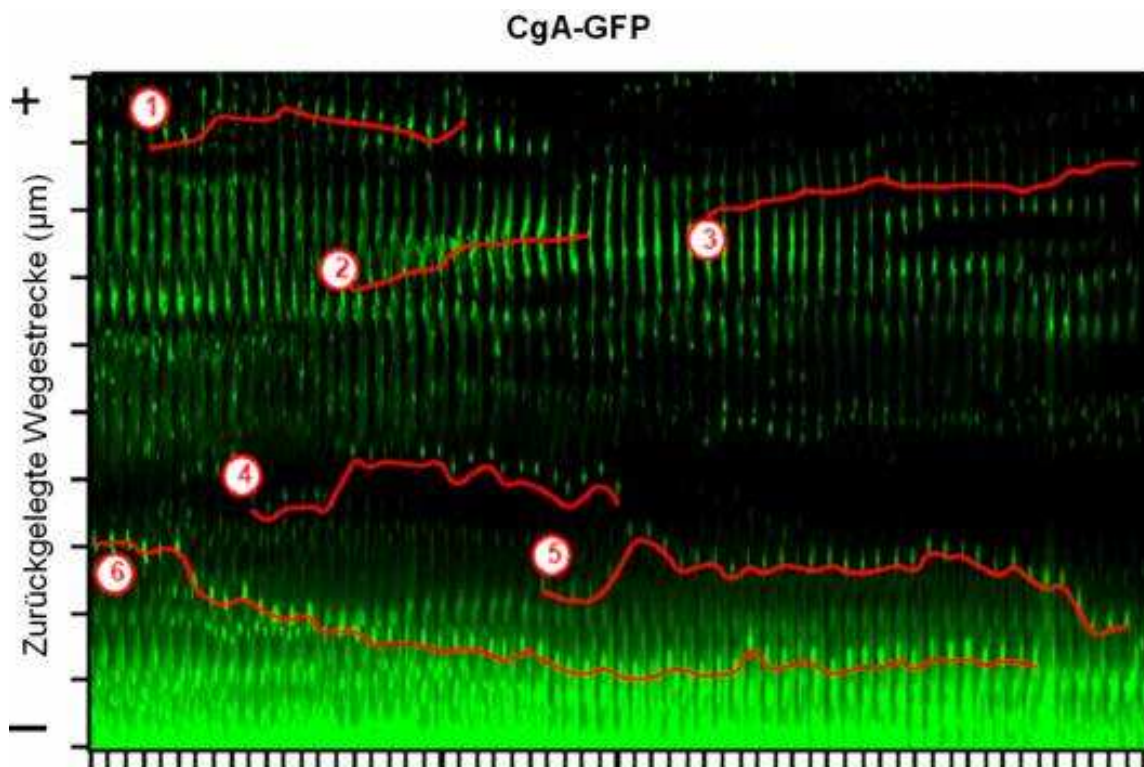
### 3.6. Richtung und Geschwindigkeit des Vesikeltransportes sind unabhängig von PKD2 in BON-Zellen

Es gibt 2 mögliche Ursachen für die oben beschriebene perinukleäre Akkumulation von CgA Immunfluoreszenz. Einerseits kann die Abschnürung der Granula vom TGN verhindert werden, andererseits kann aber auch eine veränderte Transportdynamik der Vesikel zu einer Akkumulation im TGN führen. Diese könnte durch eine verringerte Geschwindigkeit, eine reduzierte Plus-End-Bewegung oder einen gesteigerten Minus-End-Transport verursacht werden.

Wir gingen davon aus, dass sekretorische Vesikel entlang von Mikrotubuli vom TGN in die Zellperipherie transportiert werden und somit Straßen bilden, an denen die Vesikel „entlanglaufen“. Um unsere These zu verifizieren, wurden CgA-GFP transfizierte Zellen mit Anti-Tubulin immungefärbt. In der Abb. 12 sieht man deutlich, dass die Vesikel eng mit den Mikrotubuli korrelieren. Die Vesikel wurden im Folgenden mit einer Computersoftware markiert und ihre räumliche Bewegung über die Zeit als Kymograph dargestellt (siehe Abb. 13).

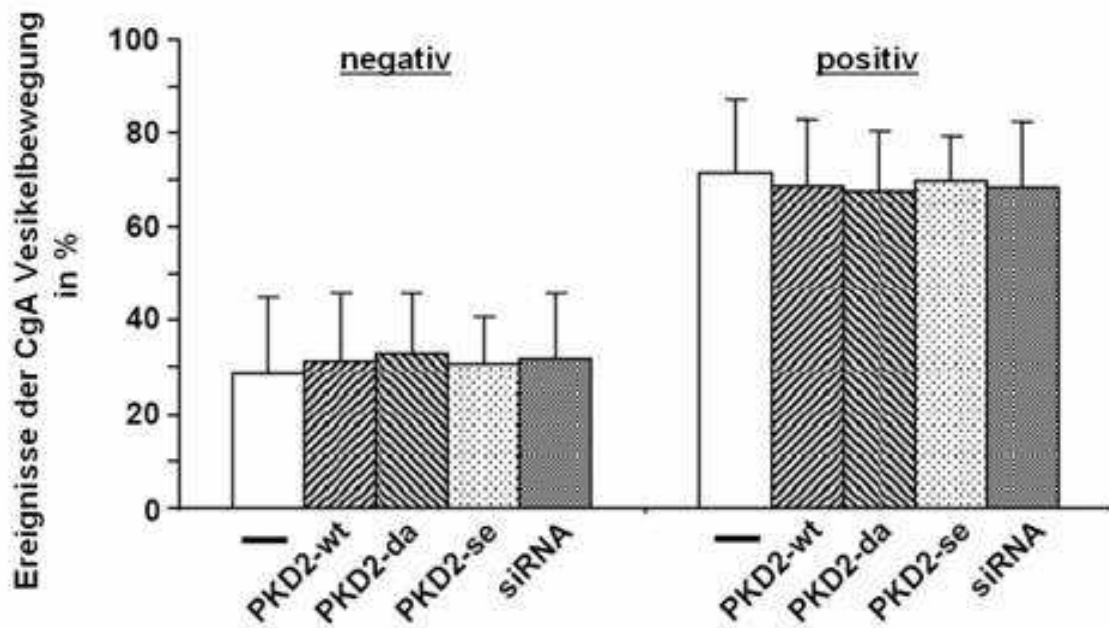


**Abbildung 12: Vesikeltransport entlang von Mikrotubulistrukturen.** BON-Zellen wurden auf Objektträgern ausplattiert, mit ChromograninA-Enhanced Green Fluorescent Protein (CgA-EGFP) transfiziert, dann fixiert und das Tubulin in den Zellen angefärbt (Alexa 568, rot). Das Rechteck markiert einen typischen Bereich wie er für die Generierung von Kymographen genutzt wurde (siehe Abb. 13). Das Quadrat im linken Bild markiert den rechts vergrößerten Ausschnitt. Die Pfeile rechts markieren die entlang der Mikrotubuli liegenden Vesikel.



**Abbildung 13: Kymographen.** BON-Zellen wurden mit ChromograninA-Enhanced Green Fluorescent Protein (CgA-EGFP) transfiziert und mittels In Vivo Fluoreszenzmikroskopie alle 10 Sekunden fotografiert. Per Fotomontage wurden rechteckige Flächen ausgewählt (siehe Abb. 12), die hintereinander gelegt wurden. Die Spuren einzelner CgA enthaltender Vesikel konnten so verfolgt und als Kymographen dargestellt werden. Diese sind hier exemplarisch mit roten Linien gekennzeichnet.

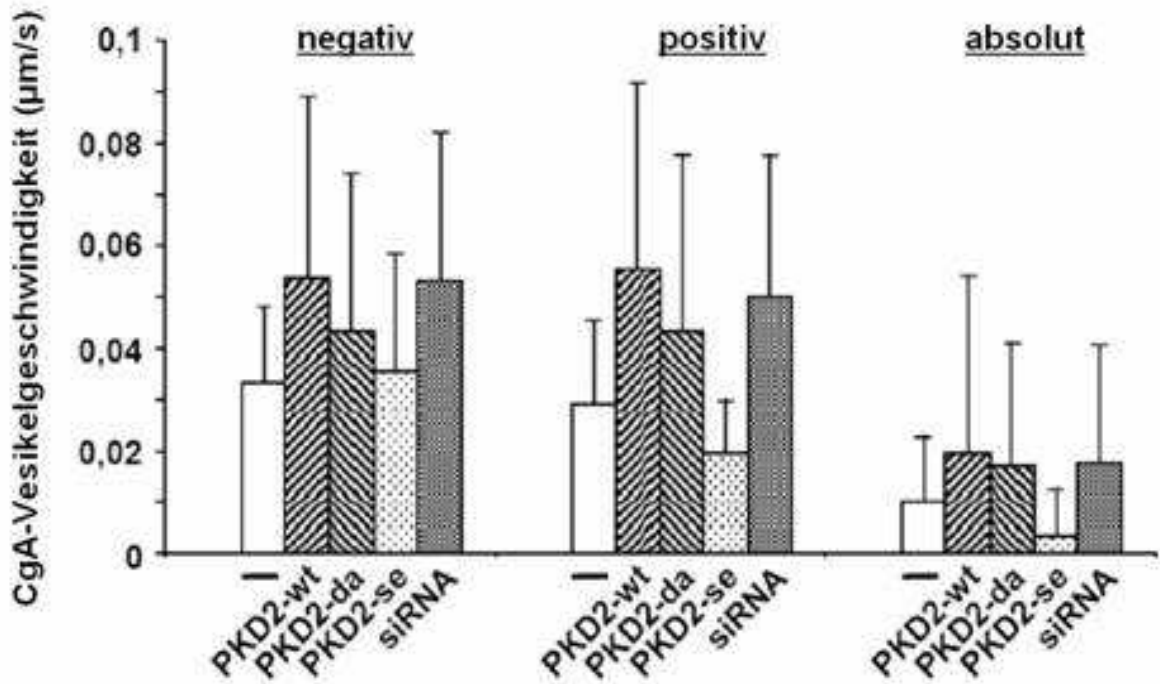
Mit Hilfe des Live Cell Mikroskops konnte die Bewegung von den CgA enthaltenden Vesikeln in den BON-Zellen dargestellt und ausgewertet werden (siehe Methoden). Das Verhältnis von Plus-End- (positiv) zu Minus-End-Transport (negativ) lag ungefähr bei 2/3 zu 1/3. Weder PKD2-wt, PKD2-se und PKD2-da Überexpression noch die komplette Blockade von PKD durch siRNA führten zu einer messbaren Veränderung in der Plus-End- oder Minus-End-Bewegung.



**Abbildung 14: Direktionalität des Vesikeltransportes in Abhängigkeit von dem Aktivitätsstatus der Proteinkinase D2 (PKD2).** BON-Zellen wurden mit Wildtyp-Proteinkinase D2 (PKD2-wt), PKD2-D695A (PKD2-da), PKD2-S706/710E (PKD2-se) oder siRNA und ChromograninA-Enhanced Green Fluorescent Protein (CgA-GFP) kotransfiziert. Abschließend wurden mittels In Vivo-Fluoreszenzmikroskopie Filme erstellt. Die Vesikelbewegung wurde anhand ihrer Richtung entlang der Tubulinstrukturen eingeteilt (nach außen: positiv; nach innen: negativ), ohne die zurückgelegte Strecke zu berücksichtigen. Dargestellt ist hier die Verteilung der Anzahl der nach innen gerichteten versus der nach außen gerichteten Bewegungen über den jeweiligen Beobachtungszeitraum. Abgebildet ist der Durchschnitt aus je mind. 3 voneinander unabhängigen Experimenten.

Aus Abb. 15 wird deutlich, dass zusätzlich dazu auch kein signifikanter Geschwindigkeitsunterschied zwischen den katalytisch unterschiedlich aktiven Mutanten und der siRNA-Blockade bestand.





**Abbildung 15: Geschwindigkeit der Vesikelbewegung in Abhängigkeit von dem Aktivitätsstatus der Proteinkinase D2 (PKD2).** Versuchsaufbau wie in Abb. 14 beschrieben. Die Säulengraphen zeigen die Durchschnittsgeschwindigkeiten ( $\mu\text{m/s}$ ) der nach innen gerichteten Bewegungen (negativ) versus der nach außen gerichteten Bewegungen (positiv) versus der Gesamtgeschwindigkeit (absolut) während des Beobachtungszeitraums in Abhängigkeit von PKD2-Expression und Aktivität. Die Abbildungen stellen den Durchschnitt aus mind. 3 voneinander unabhängigen Versuchen dar.

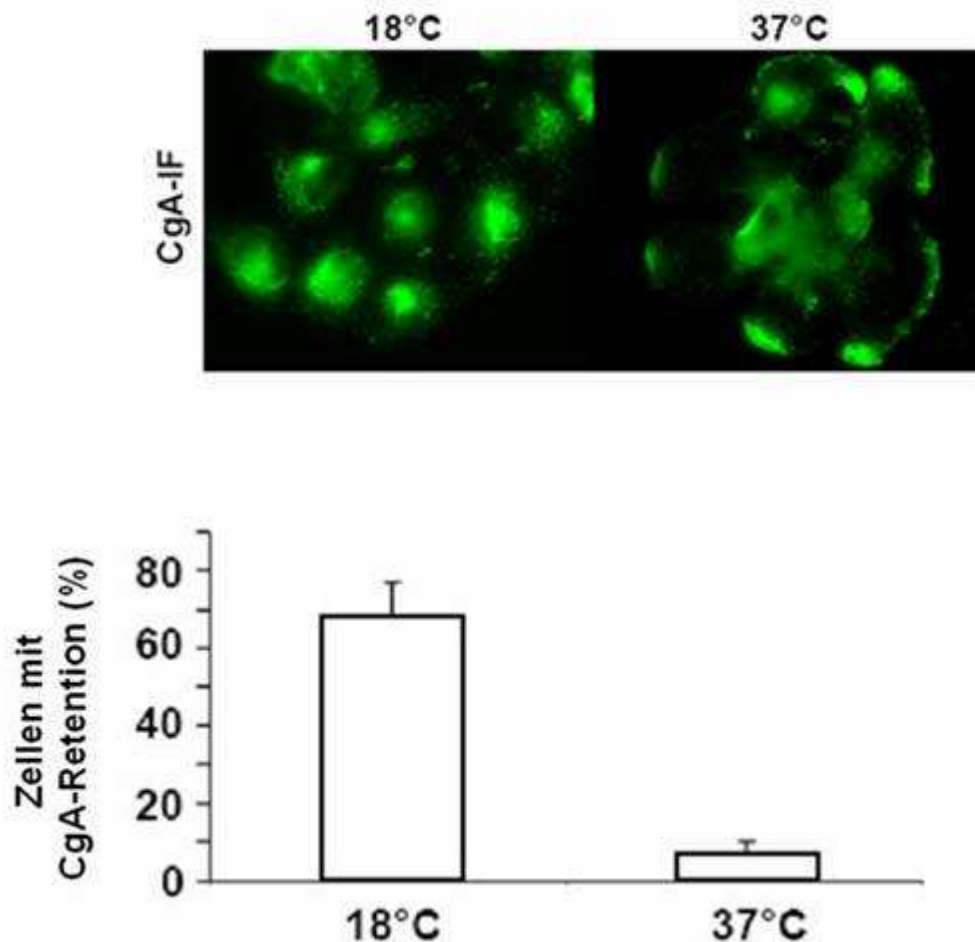
Abkürzungen: PKD2-wt = Wildtyp-Proteinkinase D2, PKD2-da = PKD2-D695A, PKD2-se = PKD2-S706/710E

Aus diesen Ergebnissen kann man also folgern, dass die verminderte CgA-Sekretion (siehe unter 3.9.) und die perinukleäre Retention, die bei Überexpression von PKD2-D695A und bei Inhibition der PKD2 Expression zu beobachten sind, sehr wahrscheinlich nicht durch eine veränderte Transportdynamik verursacht worden sind.

### 3.7. Die katalytische Aktivität von PKD2 wird für die Abschnürung von CgA enthaltenden Vesikeln vom TGN benötigt

Wie oben beschrieben ist davon auszugehen, dass PKD2 die Vesikeltransportgeschwindigkeit nicht reguliert. Deshalb wurde weiter untersucht, wie PKD2 die Freisetzung von sekretorischen Granula aus dem TGN beeinflussen könnte.

Die Freisetzung von Sekretionsprodukten aus dem TGN ist ein temperatursensitiver Prozess. Inkubation der BON-Zellen bei 18°C führte zu einer Akkumulation von CgA in der perinukleären Region, die mit dem TGN korrespondiert (s.o.). Die Freisetzung von sekretorischen Vesikeln ist bei dieser Temperatur also blockiert (Abb. 16 oben links). Wenn die Zellen dann in eine Temperatur von 37°C überführt werden, löst sich diese Blockade und sekretorische Granula können wieder vom TGN abgeschnürt werden. In der In Vivo-Fluoreszenzmikroskopie stellte sich dies durch eine schnelle CgA-Vesikel-Redistribution im gesamten Plasma und an der Plasmamembran dar (Abb. 16 oben rechts).



**Abbildung 16: Einfluss der Temperatur auf die Chromogranin A (CgA)-Vesikelbildung aus dem Transgolginetzwerk.** OBEN: BON-Zellen wurden auf Objektträger ausplattiert. Ein Teil der Zellen wurde über Nacht bei 18°C inkubiert, daraufhin fixiert und Chromogranin mit CgA-IF (CgA-Immunfluoreszenzantikörper, Alexa 488, grün) angefärbt. Zum Vergleich dienten Zellen, die bei 37°C kultiviert worden waren. (100fache Vergrößerung, 1,35 NA (numerische Apertur), OlympusIX71). UNTEN: Der Anteil an Zellen mit perinukleärer CgA-Retention wurde ausgezählt.

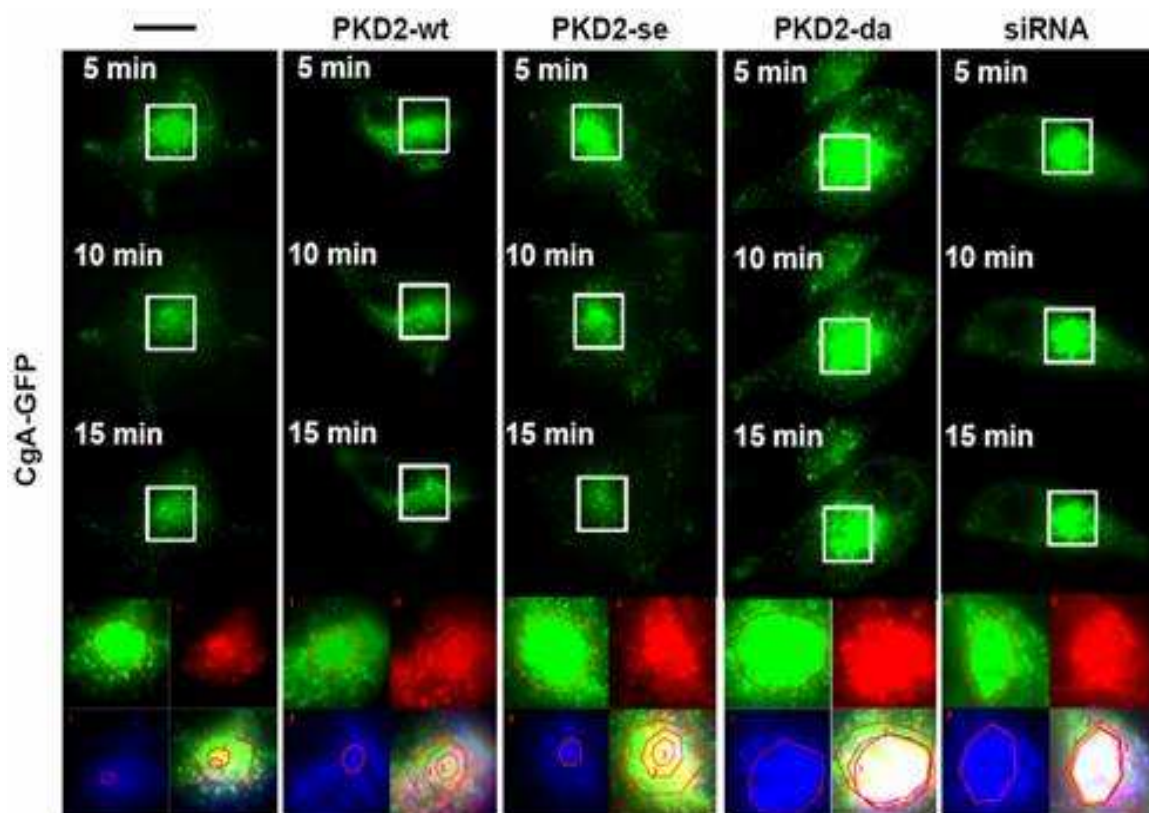
## Ergebnisse

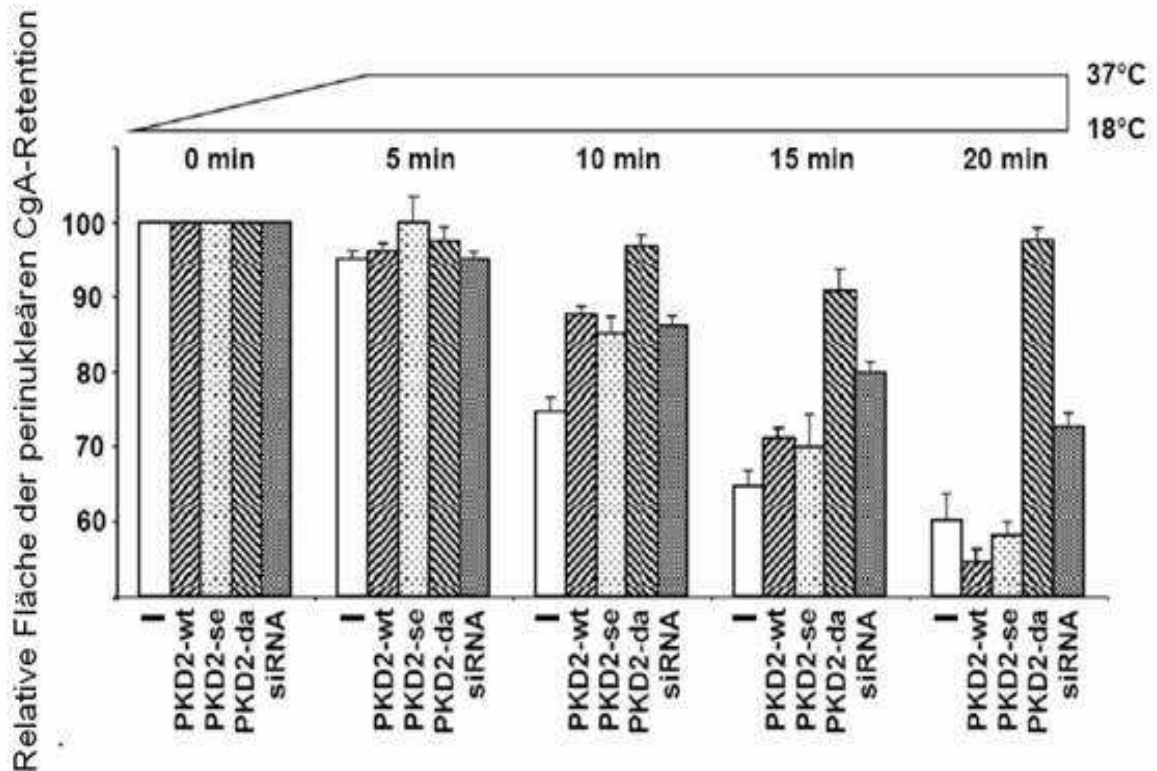
Dargestellt ist der Durchschnitt aus mind. 3 voneinander unabhängigen Experimenten +/- Standardabweichung.

Dementsprechend verringerte sich der Anteil mit überwiegender perinukleären CgA-Retention bei 37°C von ca. 70% bei 18°C auf unter 10% (Abb. 16, unten).

Um zu sehen, ob sich die wärmeinduzierte Redistribution der kälteabhängigen CgA Retention im TGN der BON-Zellen in Abhängigkeit von der katalytischen Aktivität verändert, wurden die Zellen nach Inkubation bei 20°C bei 37°C mikroskopiert und der Größenverlauf der perinukleären Retention über die Zeit ausgemessen (Abb. 17, oben).

Zellen, die vorab mit PKD2-wt oder PKD2-S706/710E transfiziert worden waren, zeigten die oben beschriebene Redistribution ähnlich wie Zellen ohne PKD2-Überexpression. Die perinukleäre Retention nahm kontinuierlich über die Zeit ab, ein Fießgleichgewicht wurde nach ca. 20 minütiger Inkubation bei 37°C erreicht (Abb. 17, unten). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei PKD2-D695A- und bei PKD2-siRNA-transfizierten BON-Zellen eine persistierende perinukleäre Immunfluoreszenzakkumulation bei Umlagerung der Zellen von 18°C auf 37°C. Gleichzeitig waren nur sehr wenige CgA enthaltende Vesikel im Zytoplasma nachweisbar (Abb. 17, oben)





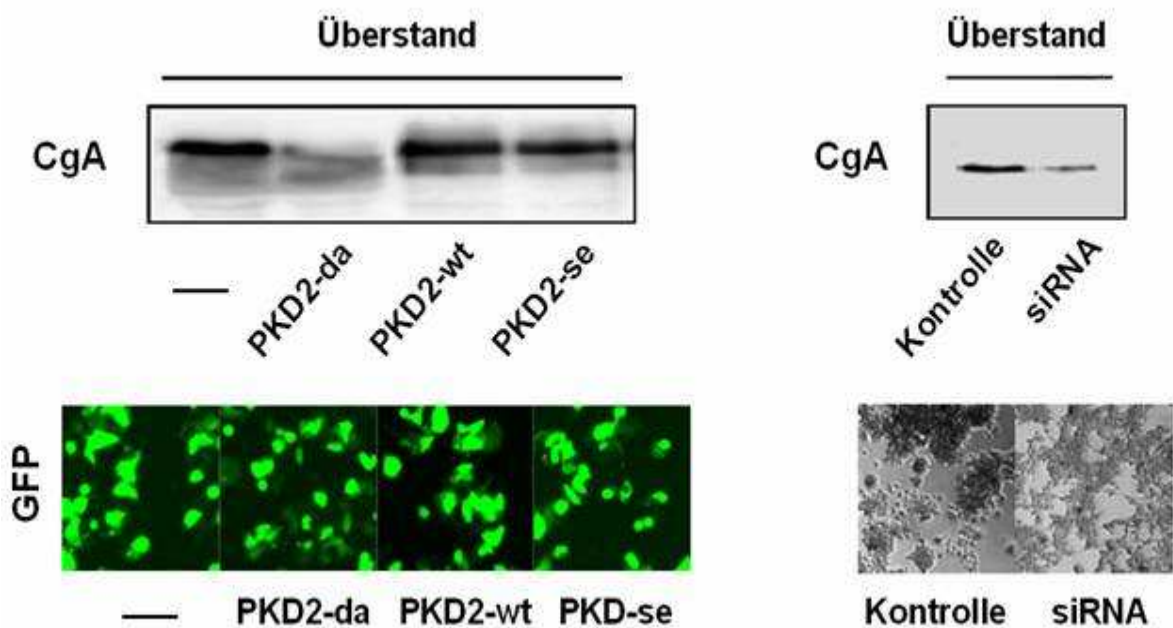
**Abbildung 17: Proteinkinase D2 (PKD2) -Aktivität moduliert die Auflösung der kälteinduzierten perinukleären Chromogranin A (CgA) -Retention.** Kofransfektion der BON-Zellen mit Chromogranin A- Green Fluorescent Protein (CgA-GFP) und DNA3-PKD2wt (Wildtyp-Proteinkinase D2), DNA3-PKD2se (PKD2-S706/710E) oder DNA3-PKD2da (PKD2-D695A). Vor dem Mikroskopieren wurden die Zellen über Nacht bei 18°C inkubiert und anschließend auf einem beheiztem Mikroskopiertisch mit In Vivo Fluoreszenz mikroskopiert. Die Probe wurde so innerhalb von 5 Minuten auf 37°C erwärmt. Auflösung der perinukleären Retention während der Erwärmung wurde quantifiziert, indem die Fläche und der Intensitätsverlust der Fluoreszenz der retinierten CgA-Fläche mittels ImageJ gemessen wurden und diese Werte dann miteinander verrechnet wurden. OBEN: Die weißen Quadrate markieren die im unteren Abschnitt dargestellten vergrößerten Areale (grün: nach 5 Minuten, rot: nach 10 Minuten, blau: nach 15 Minuten, weiß: Überlagerung der 5-, 10 und 15 Minuten Bilder). UNTEN: Das Säulendiagramm stellt den Durchschnitt der Messungen der relativen perinukleären Retentionsfläche nach 0, 5, 10, 15 und 20 Minuten im Vergleich zu den initial gemessenen Werten (entsprechend 100%) dar.

### 3.8. PKD2 Expression und ihre Aktivierung ist notwendig für basale und TPA-stimulierte CgA Sekretion in den Überstand von BON-Zellen

Wenn, wie oben beschrieben, PKD2 für die Abschnürung von sekretorischen Vesikeln vom TGN benötigt sein sollte, so liegt der Schluss nahe, dass die Inhibierung der katalytischen Aktivität von PKD2 oder gar der PKD2 Expression zu

einer verringerten Konzentration von CgA im Überstand der BON-Zellen führen sollte.

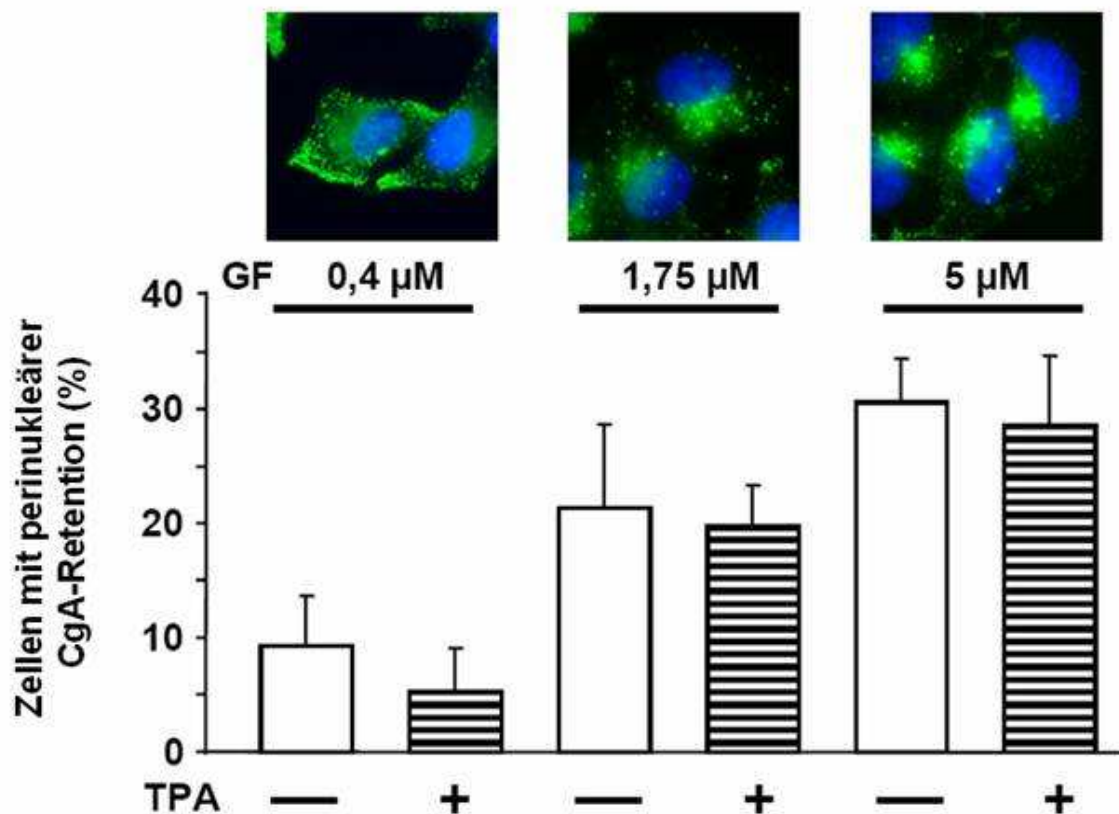
Tatsächlich konnten wir nachweisen, dass im Vergleich zu PKD2-wt oder PKD2-S706/710E transfizierten Zellen oder Kontrollzellen im Überstand von PKD2-D695A oder PKD2-siRNA transfizierten Zellen eine beträchtliche Reduktion der Konzentration von CgA-Protein zu finden war.



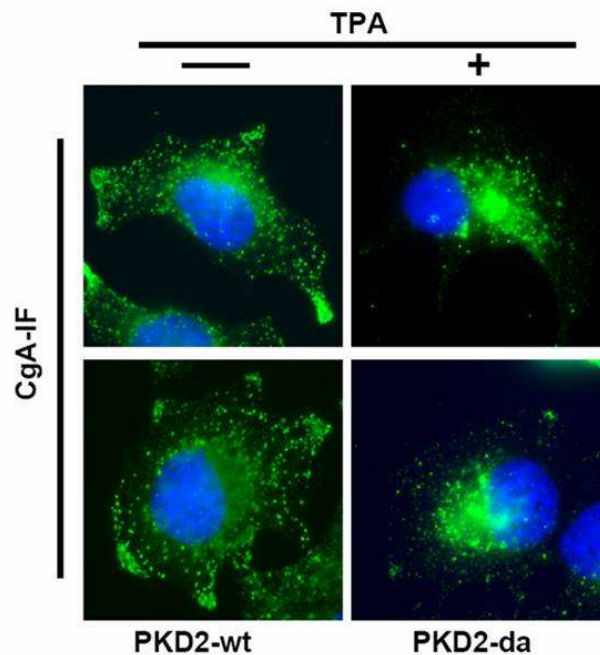
**Abbildung 18: Sekretion von Chromogranin A (CgA) ist abhängig von Expression und Aktivitätsstatus der Proteinkinase D2 (PKD2).** BON-Zellen wurden mit Amaxa-GFP und DNA3-PKD2wt (Wildtyp-Proteinkinase D2), DNA3-PKD2se (PKD2-S706/710E) oder DNA3-PKD2da (PKD2-D695A) transfiziert, dann gewaschen und mit serumfreiem Medium über Nacht inkubiert. Dann wurde der Zellüberstand aspiriert und mit dem Aspirat ein Anti-CgA Western Blot mit polyklonalem CgA Antikörper durchgeführt (Oben). Unten: Expression der hinzugefügten DNA und Zelldichte wurde links mittels Visualisierung der Expression von Amaxa GFP (Green Fluorescent Protein) kontrolliert, rechts wurde die Zelldichte mit einem Phasenkontrastmikroskop bestimmt (40 fache Vergrößerung, 0,6 NA, Olympus IX71).

Ein hervorstechendes Merkmal der regulierten Sekretion ist ihre Modulation durch Moleküle, die über Interaktion mit Rezeptoren an der Zellmembran und nachfolgende Signalwege die Sekretion steigern oder inhibieren können. So sind Phorbolester sehr potente Stimulatoren der CgA Sekretion (siehe oben). Gleichzeitig ist bekannt, dass sie PKD2 via PKCs aktivieren (Sturany et al., 2002)

In der Tat konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibition der basalen als auch der Phorbol ester stimulierten PKC-Aktivität durch Inkubation der BON-Zellen mit dem PKC Inhibitor GF 109203X, einem Bisindolylmaleimid-Derivat, in einer konzentrationsabhängigen perinukleären CgA-Retention resultierte. Diese war sowohl mit als auch ohne TPA-Stimulation deutlich zu erkennen (Abb.19). Das bedeutet also, dass sowohl basale als auch Phorbol ester-stimulierte Induktion der Vesikelfreisetzung am TGN durch PKC Inhibition verhindert werden kann.



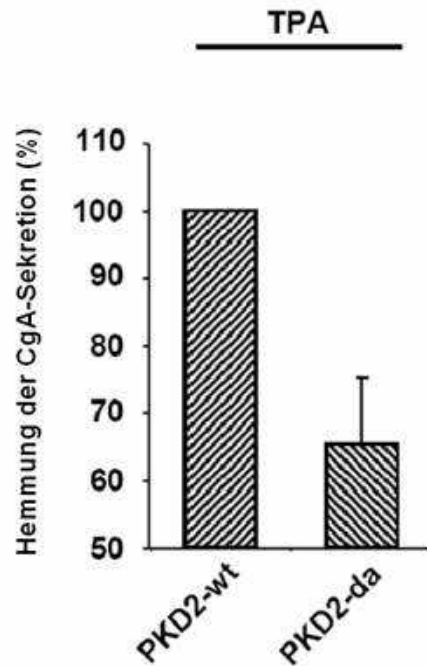
**Abbildung 19: Inhibition der basalen und Phorbol ester stimulierten Proteinkinase C (PKC) Aktivierung führt zu perinukleärer Chromogranin A (CgA) -Retention.** BON-Zellen wurden mit serumfreiem Medium kultiviert und mit dem spezifischen PKC Inhibitor GF 109203X (GF 0,4; 1,75 oder 5 µM) für 4 Stunden inkubiert. Dann wurden die Zellen für 25 Minuten mit 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA 400nM) oder einer Kontrolllösung (-) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit CgA-IF (CgA- Immunfluoreszenzantikörper) (grün, Alexa 488) immungefärbt. Der Nukleus wurde mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI 358 nm) blau gefärbt. (100fache Vergrößerung, 1,35 NA, Olympus IX71) (Oben). Die Anzahl der Zellen mit perinukleärer CgA-Retention wurde bei 100facher Vergrößerung bestimmt, indem sie in Serien von 20 aufeinander folgenden, nicht überlappenden, Bildern pro Probe ausgezählt wurden.



**Abbildung 20: Überexpression von inaktiver PKD2-da inhibiert die TPA stimulierte Distribution von Transportvesikeln im Zytoplasma.** Transfektion mit PKD2-wt (Wildtyp-Proteinkinase D2) oder inaktiver PKD2da (PKD2-D695A). In serumfreiem Nährmedium erfolgte die 25minütige Stimulation mit Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) oder mit der gleichen Menge Kontrolllösung. Nach der Fixierung der Zellen wurde Chromogranin A angefärbt (CgA-IF, grün). Nuklei wurden mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI 358 nm) gefärbt. (100fache Vergrößerung, 1,35 NA, Olympus IX71)

Die perinukleäre Akkumulation der CgA Immunfluoreszenz in GF-behandelten Zellen ähnelt sehr stark dem Effekt von PKD2-D695A auf die Immunfluoreszenzverteilung in BON Zellen. Selbst wenn man PKD2-D695A transfizierte Zellen mit TPA stimulierte, war die CgA Immunfluoreszenz zum großen Teil auf die perinukleäre Region und somit respektive auf das TGN konzentriert (Abb. 20).

Außerdem konnten wir nachweisen, dass PKD2-da transfizierte Zellen im Vergleich zu Zellen, die mit PKD2-wt transfiziert wurden, eine um 35% reduzierte CgA- Proteinkonzentration im Überstand aufwiesen (Abb. 21). PKD2 beeinflusst also im positiven Sinne die Sekretion von CgA.



**Abbildung 21: Überexpression von inaktiver Proteinkinase D2-da (PKD2-D695A) inhibiert die TPA stimulierte Sekretion von Chromogranin A (CgA).** Die BON-Zellen wurden wie in Abb. 20 beschrieben vorbereitet. Nach der 25minütigen Stimulation mit TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat) wurde der Zellüberstand aspiriert und mit dem Aspirat ein Anti-CgA Western Blot mit polyklonalem CgA Antikörper durchgeführt. Mittels Abtastdensitometrie wurden so im Folgenden die Konzentrationen des sezernierten Chromogranin As ermittelt. Die gemessene CgA-Konzentration der PKD2-wt transfizierten Zellen wurde gleich 100 Prozent gesetzt. Die Ergebnisse von mindestens drei unabhängigen Experimenten wurden mit den Ergebnissen der Wildtypform (PKD2-wt) verglichen.

Zusammenfassend kann man sagen, dass die Freisetzung von CgA enthaltenden Granula vom TGN und damit auch die CgA Sekretion einen PKC-PKD2 abhängigen Signalweg in BON-Zellen erfordern.



## 4. Diskussion

Bis heute gibt es, mit Ausnahme der chirurgischen Intervention, keine effektiven kurativen Strategien zur Behandlung neuroendokriner Tumoren des gastroenteropankreatischen Systems beim Menschen. Hormonsekretion ist ein Hauptmerkmal der funktionellen metastasierten neuroendokrinen Tumoren und ist häufig sehr beeinträchtigend für die Patienten. Die medikamentösen Therapieansätze mit langwirksamen Somatostatinanaloga wirken initial häufig gut gegen die für den Patienten sehr belastende Symptomatik und weisen bei einem Teil der Patienten tumorstatische und zum Teil sogar tumorregressive Effekte auf. Problematisch ist dabei allerdings eine mögliche Tachyphylaxie, die auch mit Dosissteigerung meist nicht ausreichend kontrolliert werden kann.

Neue Behandlungsansätze in der Krebstherapie basieren zunehmend mehr auf molekular zielgerichteten Therapien mit Antikörpern oder anderen „kleinen Molekülen“, die das Wachstum oder das biologische Verhalten der Krebszellen beeinflussen. Für die weitere Entwicklung symptomatischer sowie kurativer Therapien von Karzinoiden muss also das genaue biologische Verhalten dieser Tumoren weiter aufgeklärt werden. Insbesondere Einflüsse von Enzymen, die die Sekretion von Hormonen regulierend beeinflussen, sind bei neuroendokrinen Tumoren genauer zu betrachten, um selektiv und effektiv die Hormonsekretion zu limitieren.

Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich heraus, dass PKD2 die Freisetzung von Sekretgranula in neuroendokrinen Tumorzellen auf der Ebene des Golgiapparates kontrolliert und somit als eine neue Zielstruktur zur gerichteten Blockierung von Hormonsekretion in funktionellen neuroendokrinen Tumoren dienen könnte:

Die PKD-Isoformen werden in den verschiedenen Zell- und Gewebstypen unterschiedlich stark exprimiert. Besonders auffällig ist, dass PKD2 verglichen mit PKD1 vermehrt in Zellen des rasch proliferierenden Gewebes vorkommt. Darunter fallen physiologischerweise Darmmukosa und Testis, aber auch epitheliale Tumorzellen. Interessant ist, dass sich das Verhältnis von PKD2 zu PKD1 in malignen Zellen im Vergleich zu gesunden Zellen der gleichen Art zu Gunsten von PKD2 verschiebt (Johannes et al., 1994; Sturany et al., 2001). Nicht polarisierte Zervixkarzinomzellen (HeLa) exprimieren nur PKD2 und PKD3, in polarisierten

Nierenepithelzellen (MDCK) hingegen kann man alle drei bisher bekannten PKD Isoformen nachweisen. Für BON-Zellen war bisher nur bekannt, dass sie PKD1 exprimieren. Wir konnten nachweisen, dass PKD2 in BON-Zellen in vergleichbarem Maße wie PKD1 exprimiert wird. Endogenes PKD3 hingegen findet sich in BON-Zellen in weit geringerem Ausmaß (Li et al., 2008).

Auch die subzelluläre Lokalisation der PKD-Isoformen variiert stark in Abhängigkeit von der Zellart und ihrem Aktivitätszustand. PKD1 ist in bestimmten Zelllinien (AGS-B-Zellen, HeLa-Zellen, HepG2-Zellen, NRK-Zellen) ein ortsständiges Protein des Golgikompartmentes und hat dort Teil an der Organisation des Golgiapparats, indem es die Abschnürung der Vesikel vom TGN entlang des konstitutiven Transportprozesses reguliert (Jamora et al., 1997; Liljedahl et al., 2001; Moore et al., 1999; Prestle et al., 1996). Im Gegensatz dazu fanden Li et al. 2003 heraus, dass PKD1 in BON-Zellen gleichmäßig im Zytosol verteilt ist und bei Stimulierung der Zellen eine Translokation zur Plasmamembran erfolgt. Ähnliches wurde in einer Studie über B-Lymphozyten (Matthews et al., 2000) und in Panc-1, humanen pankreatischen Karzinomzellen, beobachtet. In diesen Zellen erfolgt die schnelle reversible PKC-abhängige Translokation zur Plasmamembran nach Stimulierung der Zelle mit Neurotensin, einem Neuropeptid aus den N-Zellen des Dünndarms, via G-Protein-gekoppelter Rezeptoren (Rey et al., 2003). Außerdem kann PKD in den Mitochondrien einiger spezialisierter Zellen nachgewiesen werden (Storz et al. 2000).

Wir zeigten durch Immunfärbung gegen PKD2, CgA und Golgin 97 eine enge räumliche Korrelation von PKD2 mit CgA gefärbten Vesikeln und dem mit Golgin angefärbten perinukleären Transgolginetzwerks. Zusätzlich ist aber auch immer eine homogene zytoplasmatische Lokalisation der PKD2 nachweisbar. In einer neuen Studie mit BON-Zellen, die nach Abschluss unserer Versuche veröffentlicht wurde, demonstrierten Li et al., dass PKD2, ähnlich wie PKD1, in ruhenden Zellen v.a. cytoplasmatisch mit einer Betonung der distalen Zellfortsätzen vorliegt. Außerdem finde sich in diesen eine deutliche Überlappung neurotensinhaltiger Strukturen mit PKD2 (Li et al., 2008). Eine Überlappung mit dem TGN konnten sie im Gegensatz zu uns nicht nachweisen. Indes zeigen insbesondere unsere Überlagerungsbilder (Abb. 3.4) keinerlei Betonung der PKD2-wt-Verteilung auf die distalen Zellfortsätze.

Eine mögliche Erklärung für diese sehr unterschiedlichen Ergebnisse könnte in den unterschiedlichen Methoden liegen: Li und seine Arbeitsgruppe arbeiteten

vorrangig mit Immunfärbung endogener PKD2. Da in unserer Arbeitsgruppe die Erfahrung gemacht wurde, dass die Immunfärbungen oftmals Lokalisationen von Proteinen entlang zellulärer Strukturen nur unsicher abbilden, wählten wir zur Darstellung der Sublokalisierung von PKD2 innerhalb der Zelle die Überexpression von GFP-markierter PKD2, mit denen in unserer Arbeitsgruppe bisher bessere Ergebnisse erzielt worden sind. Was nun tatsächlich zu solch diskrepanten Ergebnissen geführt hat, sollte allerdings noch näher untersucht werden.

Für BON-Zellen war bekannt, dass sie kontinuierlich Chromogranin A in ihr Kulturmedium abgeben (von Wichert et al., 2000) und dass diese Sekretion über einen PKC-abhängigen Mechanismus durch Behandlung mit Phorbolestern zusätzlich gesteigert werden kann (von Wichert et al., 2000; Zhang et al., 1995). Zhang zeigte in seiner Arbeit, dass bei Behandlung der Zellen mit Chelerythrin, einem PKC-Inhibitor, nur die TPA stimulierten Zellen eine reduzierte Konzentration von CgA im Überstand zeigten. Die nicht TPA-vorbehandelten Zellen blieben von der PKC-Inhibition unbeeinflusst (Zhang et al., 1995). Auch in unseren Versuchen zeigte sich, dass in BON-Zellen durch Hemmung der PKC mit Bisindolylmaleimid, einem anderen PKC-Inhibitor, die TPA-stimulierte CgA-Sekretion deutlich vermindert wird. Des Weiteren zeigte sich eine deutliche, aber nicht statistisch signifikante negative Beeinflussung der basalen Sekretion durch die PKC-Inhibition. PKC scheint in BON-Zellen somit auf die stimulierte und wahrscheinlich auch auf die basale Sekretion einen prosekretorischen Einfluss zu haben.

Proteinkinase D Isoformen gelten als wichtige Downstream-Targets von PKCs. So konnte in BON-Zellen gezeigt werden, dass die Aktivierung von PKD1 und damit sukzessive die Neurotensin-Sekretion mit PKC-Inhibitoren deutlich vermindert werden kann (Li et al., 2004). Indes zeigten Sturany et al. 2002 für PKD2 in der Magenkarzinomzelllinie AGS-B, dass ihre Phorbol ester-induzierte Aktivierung über PKCs erfolgte (Sturany et al., 2002). Unsere Ergebnisse zeigen, dass auch in BON-Zellen die PKD2-Aktivierung durch Phorbol ester PKC abhängig ist.

Mit Hilfe von phosphospezifischen Anti-PKD2-Antikörpern kann der Aktivitätsstatus der endogenen Proteinkinase in der Zelle bestimmt werden. Wir fanden heraus, dass die Kinase schon in ruhenden BON-Zellen zum Teil aktiv ist und diese basale Aktivität durch PKC-Inhibition vermindert wird. Dies könnte auf die Existenz von autokrinen, PKC-abhängigen Sekretionsschleifen hindeuten.

PKD1 wird zu seiner in vivo Aktivierung durch PKC Isoformen, v.a. PKC $\alpha$ ,  $\epsilon$  und  $\eta$ , an multiplen Stellen phosphoryliert. Zwei dieser Stellen, Ser744 und Ser748, die beide in der Aktivierungsschleife lokalisiert sind (Waldron et al., 2001 und 2003; Vertommen et al., 2000), scheinen eine herausstechende Rolle in der Aktivierung von PKD1 zu spielen. Durch ihre Phosphorylierung wird die Aufhebung der Autoinhibition der PH-Domäne mechanisch getriggert (Waldron und Rozengurt, 2003). Gleiches konnte für PKD2 nachgewiesen werden, bei der dieser Aktivierungslokus Ser706/710 entspricht (Sturany et al., 2001 und 2002).

Die in der Literatur beschriebene erhöhte Autokinaseaktivität, der an den Serinresten 706/710 phosphorylierten PKD2-S706/710E-Mutante, bestätigte sich in unseren Versuchen (Sturany et al., 2002). Wir erwarteten, dass Überexpression mit konstitutiv aktivierter PKD2-S706/710E die Sekretion von BON-Zellen in ähnlichem Maße wie die Stimulation mit Phorbolestern beeinflussen könnte. Tatsächlich zeigten unsere Ergebnisse aber, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der CgA-Konzentration im Überstand der Zellen mit Überexpression der Wildtypform der PKD2 und der CgA-Konzentration im Überstand der Zellen mit Überexpression der konstitutiv aktivierten PKD2-Mutante bestand.

Im Gegensatz dazu besitzt PKD2-D695A keinerlei Autokinaseaktivität. Überexpression dieser Kinase-inaktiven PKD-Mutante hat einen dominant negativen Effekt auf die endogene PKD-Aktivität (unveröffentlichte Daten von AG G.v.Wichert). In unseren Sekretionsassays zeigte sich eine deutlich reduzierte CgA-Konzentration im Überstand der mit PKD2-D695A transfizierten Zellen.

Die Reduktion der sezernierten CgA-Konzentration durch inaktive PKD2-Mutanten und die nicht veränderte Sekretion bei Überexpression von konstitutiv aktivierter PKD lässt darauf schließen, dass PKD2 in den Signalkaskaden eine Schlüsselrolle einnimmt, dass aber die Induktion der regulierten Sekretion in neuroendokrinen Tumorzellen ein Zusammenspiel aus mehreren unterschiedlichen Signalmolekülen erfordert, die ihrerseits auch durch Phorbolester aktiviert werden müssen.

Der Transport von Membranvesikeln in Zellen erfolgt entlang Mikrotubuli (Bloom et al., 1998; Schmitz et al., 1994). Kinesin fungiert dabei als Plus-End-Motor, Dynein als Minus-End-Motor. Beide haben die Fähigkeit, mit Membranen zu assoziieren. Effiziente Membranbindung und daraus nachfolgende Bewegung erfolgt aber erst nach Stimulierung der Zelle (Schmitz et al., 1994; Schroer et al., 1991). Schroer et al. schlagen in einer interessanten Arbeit vor, dass Bewegung von Organellen

durch einen hoch regulierten Motorkomplex reguliert wird, der sowohl Plus- als auch Minus-End-Transportmotoraktivität enthält. Unterschiedliche Aktivatormoleküle können dann die jeweilige Richtung und die Schnelligkeit der Bewegung bestimmen (Schroer et al., 1991). PKD2 könnte also demzufolge an diesen Motorkomplexen als Stimulator der Plus-End-Bewegung wirken oder aber die Minus-End-Bewegung hemmen und so den Vesikeltransport und sukzessive die davon abhängige Proteinsekretion beeinflussen.

Entsprechend unserer Erwartungen konnten wir auch für unsere CgA enthaltenden Vesikel zeigen, dass sie entlang Mikrotubuli transportiert werden. Diese verfolgbaren Transportstraßen nutzten wir, um die Bewegung einzelner Vesikel zu verfolgen. Eine Veränderung in der Direktionalität oder in der Transportgeschwindigkeit der Vesikel in Abhängigkeit von PKD2-Aktivität oder gar PKD2-Abwesenheit konnte indes nicht festgestellt werden. Daraus kann man folgern, dass PKD2 die Transportdynamik von Vesikeln der regulierten Sekretion nicht beeinflusst.

Die Freisetzung von Sekretionsproteinen vom TGN ist ein temperatursensitiver Prozess, d.h. Inkubation von Zellkulturen bei 15 bis 20°C führt zur Zurückhaltung von exkretorischen Proteinen und Membranproteinen im TGN. Erwärmt man die Zellen wieder auf 37°C, ist dieser Effekt in kürzester Zeit reversibel. Andere Funktionen der Zelle, insbesondere die Proteinbiosynthese und ihr Transport ins Golgisystem, werden bei diesen Temperaturen nicht gehemmt. (Fuller et al., 1985; Matlin et al., 1983). Wir zeigten nun, dass diese Retention in vergleichbarer Morphologie und Quantität in Zellen bei 37°C Umgebungstemperatur zu sehen war, wenn sie PKD2-D695A überexprimierten oder PKD mit siRNA aus der Zelle eliminiert worden war. Dies deutet daraufhin, dass PKD2 die Freisetzung von exkretorischen Proteinen am TGN reguliert.

Der Einfluss von PKD-Mutanten auf Proteintransport und Golgi-Organisation in epithelialen Zellen ist schon recht gut untersucht worden. Der Einfluss der PKD-Isoformen in Zellen mit regulierter Sekretion ist hingegen bisher nicht hinreichend bekannt. Proteintransport durch oder aus dem Golgiapparat ist charakterisiert durch die Vesikelbildung aus Golgimembranen. Dieselbe Vesikelformierung kann in epithelialen Zellen durch Ilimaquinon (IQ), den Metaboliten eines Meeresschwammes, nachgeahmt werden. Bei Behandlung von Zellen mit Ilimaquinon resultiert eine komplette Vesikulation des Golgiapparats. IQ-induzierte

Vesikulation ist durch G $\beta$  $\gamma$  (Jamora et al., 1997) und PKD1 als downstream target von G $\beta$  $\gamma$  vermittelt und ohne die intakte Funktion der Proteinkinase nicht möglich (Jamora et al., 1999). Mehrere Studien haben gezeigt, dass Kinase-inaktive PKD-Mutanten als dominant-negative Mutanten agieren und demzufolge die endogene PKD-Aktivität blockieren können (Iglesias et al., 1998; Liljedahl et al., 2001). Nach ihrer Expression lokalisieren sich diese katalytisch inaktiven Mutanten im TGN und führen zu einer extensiven Tubulation des Transgolginetzwerks mit Retention des Transportguts in dieser Region (Liljedahl et al., 2001). Die Abspaltung der Vesikel für den Proteintransport zur Plasmamembran kann in HeLa-Zellen nur erfolgen, wenn die Proteinkinase D1 in aktivierter Form vorliegt (Liljedahl et al., 2001).

In einem interessanten Review trug Van Lint (Van Lint et al. 2002) Ergebnisse von Yeaman, Maeda, Baron und Malhotra zusammen und schlug ein hypothetisches Modell vor, wie PKD1 am Golgiapparat agieren könnte: PKD1 wird durch Interaktion seiner ersten Zinkfingerdomäne mit lokal produziertem DAG zum Golgiapparat rekrutiert. Dies erlaubt dann wiederum die Rekrutierung von Effektorproteinen, die an ihrer regulatorischen Domäne binden. Zusammen mit ihren Effektoren bildet die PKD1 einen Teil einer *Vesikel-Budding-Maschine*, die lokale Deformationen an der TGN-Membran hervorruft und so zur Abspaltung von Vesikeln führt. Die Kinaseaktivität der PKD1 diene als eine Art Timer innerhalb dieser „Budding“-Maschine. Demzufolge wäre das „Budding“ ein selbstlimitierender Prozeß, der mit der Abtrennung des Vesikels vom TGN und der daraus folgenden Abdissoziation des PKD-Effektorkomplexes enden würde. Dem entgegen steht eine Studie, die zeigt, dass sowohl PKD2 als auch PKD1 in BON-Zellen, die mit dem Phorbolster PMA stimuliert worden waren, an den Vesikelmembranen nachweisbar sind (Li et al., 2008). Die oben postulierte Abdissoziation erfolgt demzufolge nicht in allen Zellen. Alternativ könnte sich PKD aber auch von der TGN-Membran lösen, um dann erneut an die Vesikelmembran zu binden und dort neue Funktionen auszuführen.

Die Tubulation des Golgi-Apparats bei Überexpression von Kinase-inaktiven PKD1-Mutanten, wie ihn Liljedahl (Liljedahl et al., 2001) gezeigt hat, konnten wir in unserem Experiment mit Überexpression von katalytisch inaktiven PKD2-Mutanten nicht nachweisen. Wir konnten lediglich die diffuse, aber deutliche Zunahme der perinukleären Immunfluoreszenz darstellen, die man auch bei der temperaturbedingten Retention von Sekretionsprodukten sieht. Dies scheint darauf

hinzudeuten, dass PKD2 in die regulierte Sekretion auf unterschiedlichere Weise eingreift als in die konstitutive Sekretion epithelialer Zellen.

Für die Sortierung der Sekretprodukte des regulierten Sekretionspfades werden die „Sorting for Entry“-Hypothese und die „Sorting by Retention“-Hypothese vorgeschlagen (Arvan und Castle, 1992 und 1998):

Das „Sorting for Entry“-Modell fasst die Sortierung im Groben auf 3 Sekretionspfade zusammen. Die Auftrennung der Proteine zur Sekretion entlang des konstitutiven Pfads, entlang des Pfads der sekretorischen Granula oder zur Einschleusung in das endosomal-lysosomalen System erfolgt demnach durch Interaktion mit Rezeptoren auf der TGN-Membran vor Verlassen der Vesikel aus dem TGN. Dieses Modell voraussetzend könnte PKD2 in ähnlicher Weise, wie es in epithelialen Zellen für die konstitutive Sekretion vorbeschrieben ist, die Abtrennung von den Vesikeln bzw. Granula fördern. Dazu müssten aber die Sortierungsmechanismen durch unterschiedliche Rezeptoren und Effektoren am Golgikomplex wenigstens teilweise zelltypspezifisch sein.

Das „Sorting by Retention“-Modell hingegen sieht die unreifen Granula (immature Granules=IG) als eine funktionelle Verlängerung des TGNs an. Die Idee des Aussortierungsmechanismus basiert auf der Fähigkeit granulärer Proteine, bei Veränderungen der intraluminalen Ionenzusammensetzung zu „Cores“ zu kondensieren. Die nicht zur Sekretion bestimmten, nicht aggregierten Proteine werden dann in Endosomen überführt, die ihrerseits entweder in Lysosomen abgebaut oder im Sinne der „constitutive-like“-Sekretion in den konstitutiven Weg der Exozytose eingeschleust werden. Nimmt man nun das „Sorting by Retention“-Modell zur Grundlage, so könnte PKD2 in die Reifung der Sekretgranula involviert sein. Zum einen wäre es vorstellbar, dass PKD2 als indirekter oder direkter Modulator des intraluminalen Ionenhaushaltes die Reifung der Granula stimuliert. Zum anderen könnte PKD2 auch, gemäß ihrer Funktion innerhalb konstitutiver Sekretionsmechanismen, als Fission-promoting-Protein die Abschnürung der neu entstandenen Endosomen von den nun reifen Granula ermöglichen. Angenommen, dass die basale Sekretion sich zu einem Teil aus der konstitutiven oder vielleicht schon primär fehlgeleiteten CgA Sekretion und zu einem anderen Teil aus der constitutive-like Sekretion zusammensetzten, so würde diese Hypothese auch erklären, dass sowohl die stimulierte als auch die basale CgA-Sekretion die katalytische Aktivität der Proteinkinase D2 erfordert. Unsere Daten, die zeigen, dass die basale weniger als die stimulierte Sekretion durch inaktive

PKD2 oder ihre gänzliche Abwesenheit vermindert sind, sind gut mit diesem Modell in Einklang zu bringen.

Allgemeiner Konsensus ist im Moment, dass die Sortierung der Sekretprodukte der regulierten Sekretion durch Mechanismen sowohl des Sorting by Entry-, als auch des Sorting by Retention-Modells erfolgt. Zu welchen Anteilen dies stattfindet, konnte bisher noch nicht geklärt werden (Arvan und Halban, 2004).

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse, dass aktivierte PKD2 eine essentielle Rolle in der Bildung von Sekretgranula der regulierten und basalen Sekretion in neuroendokrinen Tumorzellen spielt. Ob diese Funktion wie in epithelialen Zellen als Vermittler der Vesikelabspaltung von der TGN-Membran erfüllt wird oder ob PKD2 modulierend in die Reifung der intermediären Granula eingreift, kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht sicher gesagt werden. Sicher ist, dass PKD2 wirkt, bevor die Sekretgranula in die Peripherie transportiert werden. Deutliche Effekte konnten wir durch die Eliminierung der endogenen PKD2 mit siRNA und durch unsere dominant negative PKD2-Mutante darstellen. Hingegen scheinen autokatalytisch aktive Mutanten die Sekretion nicht in gleichem Maße zu stimulieren wie es eine Stimulierung der Zellen durch Phorbolster oder durch physiologische Stimuli über G-Protein gekoppelten Rezeptoren vermag. Dies deutet darauf hin, dass PKD2 in den Signalkaskaden unersetzlich ist, dass aber für die Reiz-Sekretionsübertragung ein Zusammenspiel aus mehreren Molekülen erfolgen muss.

Des Weiteren zeigen aktuelle Veröffentlichungen, dass PKD2 in BON-Zellen als Aktivator von Kiddyins220 die Verschmelzung der Vesikel mit der Plasmamembran vermittelt (Li et al., 2008). PKD2 scheint also an mehreren Stellen in die regulierte Sekretion der neuroendokrinen Zellen einzugreifen und ist somit durch diesen multiplen Einsatz ein äußerst potenter Regulator der stimulierten sowie der basalen Hormonausschüttung. Andere aktuelle Studien zeigen, dass Überexpression von PKD2-wt mit einer erhöhten Proliferations- und Invasionsrate von BON-Zellen einhergeht, während Inhibition der endogenen PKD2-Expression mit siRNA zu einer deutlich reduzierten Proliferation und Invasion führt (Jackson et al., 2006).

Unsere Ergebnisse in Zusammenschau mit anderen Studien zeigen also die Schlüsselrolle, die PKD2 in neuroendokrinen Tumoren hat. Gezielte Inhibition der PKD2 oder der gesamten PKD-Familie könnte demnach ein neuer wirkungsvoller Behandlungsansatz für Patienten mit neuroendokrinen Tumoren werden.



## 5. Zusammenfassung

Im Gegensatz zur konstitutiven Sekretion in epithelialen Zellen erfolgt Sekretion von Proteinen in neuroendokrinen Zellen zum großen Teil in regulierter Form. Im Golgiapparat werden dabei Proteine der regulierten Sekretion von den Proteinen, die entlang des konstitutiven Pfades sezerniert werden, aktiv getrennt und in Sekretgranula aufbewahrt, die auf einen Reiz hin ausgeschüttet werden. In den letzten Jahren sind viele Elemente der konstitutiven Sekretion in epithelialen Zellen identifiziert worden. Es wurde unter anderem gezeigt, dass Mitglieder der Proteinkinase D Familie unabdingbar für den erfolgreichen Proteintransport vom Golgi zur Plasmamembran sind.

In dieser Arbeit demonstrierten wir, dass Proteinkinase D2 (PKD2) in BON-Zellen, die als Modelllinie funktioneller neuroendokriner Zellen gelten, die Bildung von Chromogranin A enthaltenden Sekretgranula reguliert. Chromogranin A ist ein saures Glykoprotein der Graninprotein-Familie, das ausschließlich in endokrinen und neuroendokrinen Zellen gefunden wird und gleichzeitig mit koresidenten Peptiden der Zellen sezerniert wird. PKD2 zeigt schon in ruhenden Zellen eine gewisse katalytische Aktivität und kolokalisiert sich sowohl mit dem Transgolginetzwerk (TGN) als auch mit Chromogranin A. Inhibition der PKD2 Expression mit siRNA resultierte in einer perinukleären Retention von CgA, die dem TGN entspricht. Außerdem reduzierte sich die Phorbol ester (TPA) stimulierte CgA Sekretion im Zellüberstand. Vergleichbare Effekte zeigten sich auch bei Überexpression von PKD2-D695A, einer katalytisch inaktiven Mutante von PKD2, die einen dominant negativen Effekt auf die endogene PKD-Aktivität hat. Überexpression mit der konstitutiv aktivierten PKD2 Mutante PKD2-S706/710E zeigten vergleichbare Effekte wie Überexpression mit der Wildtypform von PKD2 (PKD2-wt).

Der Transport von Sekretgranula zur Plasmamembran entlang von Mikrotubuli wird durch PKD2-Präsenz oder ihre katalytische Aktivität nicht beeinflusst.

PKD2 könnte demnach die regulierte Sekretion in neuroendokrinen Tumoren kontrollieren, indem es analog der Funktion von PKD in epithelialen Zellen die Abschnürung von Membranvesikeln am Transgolginetzwerk (TGN) begünstigt. Alternativ könnte PKD2 die Bildung von Sekretgranula gemäß des Sorting by Retention Modells beeinflussen. Gemäß dieses Modells werden sekretorische

Proteine, die nicht für die regulierte Sekretion bestimmt sind, aus den intermediären Granula mithilfe von Clathrin ummantelten Vesikeln entfernt und wieder in den konstitutiven Pathway zurückgeleitet. Diese beiden Alternativen schließen sich gegenseitig nicht aus, weil unsere Experimente zeigen, dass sowohl die TPA stimulierte als auch die basale Sekretion die katalytische Aktivität von PKD2 erfordern.

Obwohl in BON-Zellen alle 3 PKD Isoformen exprimiert werden, scheint PKD2 eine Sonderstellung in der Kontrolle der regulierten Sekretion in BON-Zellen einzunehmen. Aktuelle Studien zeigen, dass PKD2 auch in die Verschmelzung der Sekretgranula mit der Plasmamembran involviert ist. Des Weiteren beeinflusst PKD2 im positiven Sinne die Zellproliferations- und Invasionsrate.

Hormonsekretion ist das Hauptmerkmal der sonst eher langsam wachsenden neuroendokrinen Tumoren und ist für die Patienten häufig sehr belastend. Bei Inoperabilität werden langwirksame Somatostatinanaloga eingesetzt, die aber häufig nach kurzer Zeit die Symptome nicht mehr ausreichend unterdrücken können. Inhibition der PKD2 als einer der Hauptmediatoren der Sekretion und Proliferation in neuroendokrinen Zellen könnte demnach in der Zukunft eine neue Therapieoption für Patienten mit einem funktionellen neuroendokrinen Tumor darstellen.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Arnold R.**  
Medical treatment of metastasizing carcinoid tumors.  
*World Journal of Surgery.* 20:203-207, 1996
2. **Arnold R, Simon B, Wied M.**  
Treatment of neuroendocrine GEP tumours with somatostatin analogues: a review.  
*Digestion.* 62 Suppl 1:84-91, 2000
3. **Arps H, Dietel M, Lauritzen B, Elting JJ, Niendorf A, Cohn DV.**  
Co-localization of parathyroid hormone and secretory protein-I in bovine parathyroid glands: a double immunocytochemical study at the electron microscopical level.  
*Bone and Mineral.* 2:175-183, 1987
4. **Arvan P, Castle D.**  
Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking backward and looking forward.  
*The Biochemical Journal.* 332:593-610, 1998
5. **Arvan P, Castle D.**  
Protein sorting and secretion granule formation in regulated secretory cells.  
*Trends in Cell Biology.* 2:327-331, 1992
6. **Arvan P, Halban PA.:**  
Sorting Ourselves Out: Seeking Consensus on Trafficking in the Beta-Cell.  
*Traffic.* 5:53-61, 2004
7. **Auer A, von Blume J, Sturany S, von Wichert G, van Lint J, Vandenheede J, Adler G, Seufferlein T.**  
Role of the Regulatory Domain of Protein Kinase D2 in Phorbol Ester Binding, Catalytic Activity and Nucleocytoplasmatic Shuttling  
*Molecular and Cellular Biology.* 16:4375-4385, 2005
8. **Bagowski CP, Stein-Gerlach M, Choidas A, Ullrich A.**  
Cell-type specific phosphorylation of threonines T654 and T669 by PKD defines the signal capacity of the EGF receptor.  
*The EMBO Journal.* 18:5567-5576, 1999
9. **Baron CL, Malhotra V.**  
Role of Diacylglycerol in PKD Recruitment to the TGN and Protein Transport to the Plasma Membrane  
*Science.* 295:325-328, 2002
10. **Bishop AE, Polak JM:**  
Gastrointestinal endocrine tumours. Pathology.  
*Baillière's Clinical Gastroenterology.* 10:555-569, 1996

11. **Bloom** GS, Goldstein LS.  
Cruising along microtubule highways: how membranes move through the secretory pathway.  
*The Journal of Cell Biology.* 141:1095, 1998
12. **Bowden** ET, Barth M, Thomas D, Glazer RI, Mueller SC.  
An invasion-related complex of cortactin, paxillin and PKC $\mu$  associates with invadopodia at sites of extracellular matrix degradation.  
*Oncogene.* 18:4440-4449, 1999
13. **Bullock** WO, Fernandez JM und Short JM.  
XL-1-blue: A high efficiency plasmid transforming recA E. coli strain with  $\beta$ -galactosidase selection.  
*Bio-Techniques.* 5:376-379, 1987
14. **Calender** A.  
Molecular genetics of neuroendocrine tumors.  
*Digestion.* 62:3-18, 2000
15. **Capella** C, Heitz PU, Höfler H, Solcia E, Klöppel G.  
Revised classification of neuroendocrine tumors of the lung, pancreas and gut.  
*Digestion.* 55 :11-23, 1994
16. **Caplin** ME, Buscombe JR, Hilson AJ, Jones AL, Watkinson AF, Burroughs AK  
Carcinoid tumour.  
*Lancet.* 325:799-805, 1998
17. **Dham** A, Truskinovsky AM, Dudek AZ.  
Thymic carcinoid responds to neoadjuvant therapy with sunitinib and octreotide: a case report.  
*Journal of Thoracic Oncology.* 3:94-97, 2008
18. **di Bartolomeo** M, Bajetta E, Buzzoni R, Mariani L, Carnaghi C, Somma L, Zilembo N, di Leo A.  
Clinical efficacy of octreotide in the treatment of metastatic neuroendocrine tumors. A study by the Italian Trials in Medical Oncology Group.  
*Cancer.* 77:402-408, 1996
19. **Endo** K, Oki E, Biedermann V, Kojima H, Yoshida K, Johannes FJ, Kufe D, Datta R.  
Proteolytic cleavage and activation of protein kinase C [micro] by caspase-3 in the apoptotic response of cells to 1-beta -D-arabinofuranosylcytosine and other genotoxic agents.  
*The Journal of Biological Chemistry.* 275:18476-18481, 2000
20. **Eriksson** B, Oberg K.  
Summing up 15 years of somatostatin analog therapy in neuroendocrine tumors: future outlook.  
*Annals of Oncology.* 10:31-38, 1999

21. **Evers** BM, Ishizuka J, Townsend CM Jr., Rajaraman S, Thompson JC  
Expression of Neurotensin Messenger RNA in a Human Carcinoid Tumor  
*Annals of Surgery.* 214:448-455, 1991
22. **Fuller** SD, Bravo R, Simons K.  
An enzymatic assay reveals that proteins destined for the apical or  
basolateral domains of an epithelial cell line share the same late Golgi  
compartments.  
*The Embo Journal.* 4:297-307, 1985
23. **Ganim** RB, Norton JA.  
Recent advances in carcinoid pathogenesis, diagnosis and management.  
*Surgical Oncology.* 9:173-179, 2000
24. **Gross** DJ, Munter G, Bitan M, Siegal T, Gabizon A, Weitzen R, Merimsky O,  
Ackerstein A, Salmon A, Sella A, Slavin S, The Israel Glivec in Solid Tumors  
Study Group.  
The role of imatinib mesylate (Glivec) for treatment of patients with malignant  
endocrine tumors positive for c-kit or PDGF-R.  
*Endocrine-related Cancer.* 13:535-540, 2006
25. **Hao** Q, Wang L, Zhao ZJ, Tang H.  
Identification of protein kinase D2 as a pivotal regulator of endothelial cell  
proliferation, migration and angiogenesis  
*The Journal of Biological Chemistry.* 284:799-806, 2009
26. **Hausser** A, Storz P, Märtens S, Link G, Toker A, Pfizenmaier K.  
Protein kinase D regulates vesicular transport by phosphorylating and  
activating phosphatidylinositol-4 kinase IIIbeta at the Golgi complex.  
*Nature Cell Biology.* 7:851-853, 2005
27. **Hayashi** A, Seki N, Hattori A, Kozuma S, Saito T.  
PKC $\nu$ , a new member of the protein kinase family, composes a fourth  
subfamily with PKC $\mu$   
*Biochimica et Biophysica Acta.* 1450:99-106, 1999
28. **Heppner** C, Kester MB, Agarwal SK, Debelenko LV, Emmert-Buck MR, Guru  
SC, Manickam P, Olufemi SE, Skarulis MC, Doppman JL, Alexander RH, Kim  
YS, Saggar SK, Lubensky IA, Zhuang Z, Liota LA, Chandrasekharappa SC,  
Collins FS, Spiegel AM, Burns AL, Marx SJ.  
Somatic mutations of the MEN1 gene in parathyroid tumours  
*Nature Genetics.* 16:375-378, 1997
29. **Höfler** H, Stier A, Schusdziarra V, Siewert JR.  
Klassifikation der neuroendokrinen Tumoren des Gastrointestinaltrakts und  
des Pankreas und ihre therapeutische Relevanz  
*Chirurg.* 68:107-115, 1997
30. **Hofland** LJ, Lamberts SW.:  
The pathophysiological consequences of somatostatin receptor internalization  
and resistance.  
*Endocrine Reviews.* 24:28-47, 2003

31. **Hsuan** JJ, Minogue S, dos Santos M.  
Phosphoinositide 4- and 5-kinases and the cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate.  
*Advances in Cancer Research*. 74:167–216, 1998
32. **Hurd** C, Waldron RT, Rozengurt E.  
Protein kinase D complexes with C-Jun N-terminal kinase via activation loop phosphorylation and phosphorylates the C-Jun N-terminus.  
*Oncogene*. 21:2154-2160, 2002
33. **Iacangelo** A, Affolter HU, Eiden LE, Herbert E, Grimes M.  
Bovine chromogranin A sequence and distribution of its messenger RNA in endocrine tissues.  
*Nature*. 323:82-86, 1986
34. **Iglesias** T, Waldron RT, Rozengurt E.  
Identification of in vivo phosphorylation sites required for protein kinase D activation.  
*The Journal of Biological Chemistry*. 273:27662-27667, 1998
35. **Jackson** LN, Li J, Chen LA, Townsend CM, Evers BM.  
Overexpression of wild-type PKD2 leads to increased proliferation and invasion of BON endocrine cells.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications*. 348:945-949, 2006
36. **Jamora** C, Yamanouye N, Van Lint J, Laudenslager J, Vandenheede JR, Faulkner DJ, Malhotra V.  
Gbetagamma-mediated regulation of Golgi organization is through the direct activation of protein kinase D  
*Cell*. 98:59-68, 1999
37. **Jamora** C, Takizawa PA, Zaarour RF, Denesvre C, Faulkner DJ, Malhotra V.  
Regulation of Golgi structure through heterotrimeric G proteins.  
*Cell*. 91:617-626, 1997
38. **Johannes** FJ, Prestle J, Eis S, Oberhagemann P und Pfizenmaier K.  
PKC $\mu$  is a novel, atypical member of the protein kinase C family.  
*The Journal of Biological Chemistry*. 269:6140-6148, 1994
39. **Kaltsas** GA, Mukherjee JJ, Isidori A, Kola B, Plowman PN, Monson JP, Grossman AB, Besser GM.  
Treatment of advanced neuroendocrine tumours using combination chemotherapy with lomustine and 5-fluorouracil.  
*Clinical Endocrinology*. 57:169-183, 2002
40. **Kjer-Nielsen** L, Teasdale RD, van Vliet C, Gleeson PA.  
A novel Golgi-localisation domain shared by a class of coiled-coil peripheral membrane proteins.  
*Current Biology*. 9:385-388, 1999

41. **Kovalevska** LM, Yurchenko OV, Shlapatska LM, Berdova GG, Mikhalap SV, Van Lint J, Sidorenko SP.  
Immunohistochemical studies of protein kinase D (PKD) 2 expression in malignant human lymphomas.  
*Experimental Oncology*. 28:225-230, 2006
42. **Kulke** MH, Mayer RJ.  
Carcinoid tumours.  
*The New England Journal of Medicine*. 340:858-868, 1999
43. **Laemmli** UK.  
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.  
*Nature*. 227:680-685, 1970
44. **Landry** CS, Scoggins CR, McMasters KM, Martin RC 2nd.  
Management of hepatic metastasis of gastrointestinal carcinoid tumors.  
*Journal of Surgical Oncology*. 97:253-258, 2008
45. **Li** J, O'Connor KL, Hellmich MR, Greeley GH, Townsend CM, JR., Evers BM.  
The Role of Protein Kinase D in Neurotensin Secretion Mediated by Protein Kinase C-alpha/delta and Rho/Rho Kinase  
*The Journal of Biological Chemistry*. 279:28466-28474, 2004
46. **Li** J, Chen LA, Townsend CM Jr, Evers BM.  
PKD1, PKD2, and their substrate Kidins220 regulate neurotensin secretion in the BON human endocrine cell line.  
*The Journal of Biological Chemistry*. 283:2614-2621, 2008
47. **Liljedahl** M, Maeda Y, Colnzi A, Ayala I, Van Lint J, Malhotra V.  
Protein Kinase D regulates the Fission of Cell Surface Destined Transport Carriers from the Trans-Golgi Network  
*Cell*. 104:409-420, 2001
48. **Limper** AH, Carpenter PC, Scheithauer B, Staats BA.  
The Cushing syndrome induced by bronchial carcinoid tumors.  
*Annals of Internal Medicine*. 117:209-214, 1992
49. **Maeda** Y, Beznoussenko GV, Van Lint J, Mironov AA, Malhotra V.  
Recruitment of protein kinase D to the trans Golgi network via the first cysteine-rich domain-  
*The Embo Journal*. 20:5982-5990, 2001
50. **Maggard** MA, O'Connell JB, Ko CY.  
Updated population-based review of carcinoid tumors.  
*Annals of Surgery*. 240:117-122, 2004
51. **Manning** G, Whyte DB, Martinez R, Hunter T, Sudarsanam S.  
The Protein Kinase Complement of the Human Genome  
*Science*. 298:1912-1934, 2002

52. **Matlin** KS, Simons K.  
Reduced temperature prevents transfer of a membrane glycoprotein to the cell surface but does not prevent terminal glycosylation.  
*Cell*. 34:233-243, 1983
53. **Maton** PN.  
Use of octreotide acetate for control of symptoms in patients with islet cell tumors.  
*World Journal of Surgery*. 17:504-510, 1993
54. **Matthews** SA, Dayalu R, Thompson LJ, Scharenberg AM.  
Regulation of protein kinase C $\alpha$  by the B-cell antigen receptor  
*The Journal of Biological Chemistry*. 278:9086-9091, 2003
55. **Matthews** SA, Iglesias T, Rozengurt E, Cantrell D.  
Spatial and temporal regulation of protein kinase D (PKD).  
*The EMBO Journal*. 19:2935-2945, 2000
56. **Mihailovic** T, Marx M, Auer A, Van Lint J, Schmid M, Weber C, Seufferlein T.  
Protein kinase D2 mediates activation of nuclear factor kappaB by Bcr-Abl in Bcr-Abl+ human myeloid leukemia cells.  
*Cancer Research*. 64:8939-8944, 2004
57. **Modlin** IM, Sandor A.  
An analysis of 8305 cases of carcinoid tumors.  
*Cancer*. 79:813-829, 1997
58. **Moore** ED, Ring M, Scriven DR, Smith VC, Meloche RM, Buchan AM.  
The role of protein kinase C isozymes in bombesin-stimulated gastrin release from human antral gastrin cells.  
*The Journal of Biological Chemistry*. 274:22493-22501, 1999
59. **Nishikawa**, K, Toker A, Wong K, Marignani PA, Johannes FJ, Cantley LC.  
Association of protein kinase C $\alpha$  with type II phosphatidylinositol 4-kinase and type I phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase.  
*The Journal of Biological Chemistry*. 273:23126-23133, 1998
60. **Oancea** E, Bezzerides VJ, Greka, Clapham DE.  
Mechanism of persistent protein kinase D1 translocation and activation.  
*Developmental Cell*. 4:561-574, 2003
61. **Oberg** K.  
Chemotherapy and biotherapy in the treatment of neuroendocrine tumours.  
*Annals of Oncology*. 12:111-114, 2001
62. **Oberg** K.  
Carcinoid tumors: molecular genetics, tumor biology, and update of diagnosis and treatment.  
*Current Opinion in Oncology*. 14:38-45, 2002
63. **Oberg** K.  
Management of neuroendocrine tumours.



*Annals of Oncology. 15:293-298, 2004*

64. **Onaitis** MW, Kirshbom PM, Hayward TZ, Quayle FJ, Feldman JM, Seigler HF, Tyler DS.  
Gastrointestinal carcinoids: characterization by site of origin and hormone production.  
*Annals of Surgery. 232:549-556, 2000*
65. **O'Toole** D, Ducreux M, Bommelaer G, Wemeau JL, Bouché O, Catus F, Blumberg J, Ruzniewski P.  
Treatment of carcinoid syndrome: a prospective crossover evaluation of lanreotide versus octreotide in terms of efficacy, patient acceptability, and tolerance.  
*Cancer. 88:770-776, 2000*
66. **Pirker** RA, Pont J, Pöhl R, Schütz W, Griesmacher A, Müller MM.  
Usefulness of chromogranin A as a marker for detection of relapses of carcinoid tumours.  
*Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. 36:837-840, 1998*
67. **Prestle** J, Pfizenmaier K, Brenner J, Johannes FJ.  
Protein kinase C mu is located at the Golgi compartment.  
*The Journal of Cell Biology. 134:1401-1410, 1996*
68. **Rey** O, Reeve JR, Zhukova, Sinnott-Simth J, Rozengurt E.  
G protein-coupled receptor-mediated phosphorylation of the activation loop of protein kinase D.  
*The Journal of Biological Chemistry. 279:34361-34372, 2004*
69. **Rey** O, Yuan J, Rozengurt E.  
Intracellular redistribution of protein kinase D2 in response to G-protein-coupled receptor agonists.  
*Biochemical and Biophysical Research Communications. 302:817-824, 2003*
70. **Rindi** G, Villanacci V, Ubiali A.  
Biological and molecular aspects of gastropancreatic neuroendocrine tumors.  
*Digestion. 62:19-26, 2000*
71. **Rindi** G, Villanacci V, Ubiali A, Scarpa A.  
Endocrine tumors of the digestive tract and pancreas: histogenesis, diagnosis and molecular basis.  
*Expert Review of Molecular Diagnostics. 1:323-333, 2001*
72. **Rougier** P, Mitry E.  
Chemotherapy in the treatment of neuroendocrine malignant tumors.  
*Digestion. 62:73-78, 2000*
73. **Rozengurt** E, Rey O, Waldron RT.  
Protein Kinase D Signaling  
*The Journal of Biological Chemistry. 280:13205-13208, 2005*

74. **Ryck** A, De Kimpe L, Mikhalap S, Vantus T, Seufferlein T, Vandenhede JR, Van Lint J.  
Protein Kinase D -a family affair  
*FEBS Letters. 546:81-86, 2003*
75. **Schmidt** A, Wolde M, Thiele C, Fest W, Kratzin H, Podtelejnikov AV, Witke W, Huttner WB, Söling HD.  
Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid.  
*Nature. 401:133-141, 1999*
76. **Schmitz** F, Wallis KT, Rho M, Drenckhahn D, Murphy DB.  
Intracellular distribution of kinesin in chromaffin cells.  
*European Journal of Cell Biology. 63:77-83, 1994*
77. **Schroer** TA, Sheetz MP.  
Two activators of microtubule-based vesicle transport.  
*The Journal of Cell Biology. 115:1309-1318, 1991*
78. **Sidorenko** SP, Law CL, Klaus SJ, Chandran KA, Takata M, Kurosaki T, Clark EA.  
Protein kinase C mu (PKC mu) associates with the B cell antigen receptor complex and regulates lymphocyte signaling.  
*Immunity. 5:353-363, 1996*
79. **Sinnott-Smith** J, Zhukova E, Hsieh N, Jiang X, Rozengurt E.  
Protein kinase D potentiates DNA synthesis induced by Gq-coupled receptors by increasing the duration of ERK signaling in swiss 3T3 cells.  
*The Journal of Biological Chemistry. 279:16883-16893, 2004*
80. **Sinnott-Smith** J, Zhukova E, Rey O, Rozengurt E.  
Protein kinase D2 potentiates MEK/ERK/RSK signaling, c-Fos accumulation and DNA synthesis induced by bombesin in Swiss 3T3 cells.  
*Journal of Cellular Physiology. 211:781-790, 2007*
81. **Soga** J, Yakuwa Y, Osaka M.  
Carcinoid syndrome: a statistical evaluation of 748 reported cases.  
*Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 18:133-141, 1999*
82. **Solcia** E, Kloppel G, Sobin LH.  
Histological typing of endocrine tumours.  
*2<sup>nd</sup> ed Heidelberg: World Health Organisation. 2000*
83. **Storz** P, Hausser A, Link G, Dedio J, Ghebrehiwet B, Pfizenmaier K, Johannes FJ.  
Protein kinase C [micro] is regulated by the multifunctional chaperon protein p32.  
*The Journal of Biological Chemistry. 275:24601-24607, 2000*
84. **Storz** P, Toker A.  
Protein kinase D mediates a stress-induced NF-kappaB activation and survival pathway.

*EMBO Journal. 22:109-120, 2003*

85. **Sturany S**, van Lint J, Gilchrist A, Vandenheede JR, Gress T, Adler G, Seufferlein T.  
Mechanism of Activation of Protein Kinase D2 by the CCK B /Gastrin Receptor.  
*The Journal of Biological Chemistry. 277:29431-29436, 2002*
86. **Sturany S**, van Lint J, Müller F, Wilda M, Hameister H, Hocker M, Brey A, Gern U, Vandenheede J, Gress T, Adler G, Seufferlein T.  
Molecular Cloning and Characterization of the Human Protein Kinase D2.  
*The Journal of Biological Chemistry. 276:3310-3318, 2001*
87. **Thyberg J**, Moskalewski S.  
Role of microtubules in the organization of the Golgi complex.  
*Experimental Cell Research. 246:263-279, 1999*
88. **Tiensuu Janson EM**, Oberg KE.  
Carcinoid tumours.  
*Baillière's Clinical Gastroenterology. 10:589-601, 1996*
89. **Tomassetti P**, Migliori M, Lalli S, Campana D, Tomassetti V, Corinaldesi R  
Epidemiology, clinical features and diagnosis of gastroenteropancreatic endocrine tumours.  
*Annals of Oncology. 12:95-99, 2001*
90. **Townsend CM Jr**, Ishizuka J, Thompson JC.  
Studies of growth regulation in a neuroendocrine cell line  
*Acta Oncologica. 32:125-130, 1993*
91. **Trendle MC**, Moertel CG, Kvols LK.  
Incidence and morbidity of cholelithiasis in patients receiving chronic octreotide for metastatic carcinoid and malignant islet cell tumors.  
*Cancer. 79:830-834, 1997*
92. **Valverde, A.M.**, Sinnett-Smith, J., Van Lint, J. und Rozengurt, E.  
Molecular cloning and characterization of protein kinase D: a distinct target for dacylglycerol and phorbol esters with a distinctive catalytic domain.  
*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 91:8572-8576, 1994*
93. **Van Lint J**, Rykx A, Maeda Y, Vantus T, Sturany S, Malhotra V, Vandenheede JR, Seufferlein T.  
Protein kinase D: an intracellular traffic regulator on the move.  
*Trends in Cell Biology. 12:193-200, 2002*
94. **Vertommen D**, Rider M, Ni Y, Waelkens E, Merlevede W, Vandenheede JR, Van Lint J.  
Regulation of protein kinase D by multisite phosphorylation. Identification of phosphorylation sites by mass spectrometry and characterization by site-directed mutagenesis.  
*The Journal of Biological Chemistry. 275:19567-19576, 2000*

95. **Vinik** AI, McLeod MK, Fig LM, Shapiro B, Lloyd RV, Cho K.  
Clinical features, diagnosis, and localization of carcinoid tumors and their management.  
*Gastroenterology Clinics of North America*. 18:865-896, 1989
96. **von Blume** J, Knippschild U, Dequiedt F, Giamas G, Beck A, Auer A, Van Lint J, Adler G, Seufferlein T.  
Phosphorylation at Ser244 by CK1 determines nuclear localization and substrate targeting of PKD2.  
*EMBO Journal*. 26:4619-4633, 2007
97. **von Wichert** G, Jehle PM, Hoeflich A, Koschnick S, Dralle H, Wolf E, Wiedemann B, Boehm BO, Adler G, Seufferlein T  
Insulin-like growth factor-I is an autocrine regulator of chromogranin A secretion and growth in human neuroendocrine tumor cells  
*Cancer Research*. 60:4573-4581, 2000
98. **Waldron** RT, Rey O, Iglesias T, Tugal T, Cantrell D, Rozengurt E.  
Activation loop Ser744 and Ser748 in protein kinase D are transphosphorylated in vivo.  
*The Journal of Biological Chemistry*. 276:32606-32615, 2001
99. **Waldron** RT, Rozengurt E.  
Protein Kinase C phosphorylates Protein Kinase D activation loop Ser 744 and Ser 748 and releases autoinhibition by the Pleckstrin Homology Domain.  
*The Journal of Biological Chemistry*. 278:154-163, 2003
100. **Wand** GS, Takiyuddin M, O'Connor DT, Levine MA.  
A proposed role for chromogranin A as a glucocorticoid-responsive autocrine inhibitor of proopiomelanocortin secretion.  
*Endocrinology*. 128:1345-1351, 1991
101. **Williams** ED, Sandler M.  
The classification of carcinoid tumours.  
*Lancet*. 1:238-239, 1963
102. **Wynick** D, Bloom SR.  
The use of the long-acting somatostatin analog octreotide in the treatment of gut neuroendocrine tumors.  
*The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 73:1-3, 1991
103. **Yao** JC, Phan A, Hoff PM, Chen HX, Charnsangavej C, Yeung SC, Hess K, Ng C, Abbruzzese JL, Ajani JA.  
Targeting vascular endothelial growth factor in advanced carcinoid tumor: a random assignment phase II study of depot octreotide with bevacizumab and pegylated interferon alpha-2b.  
*Journal of Clinical Oncology*. 26:1316-1323, 2008
104. **Yeaman** C, Ayala MI, Wright JR, Bard F, Bossard C, Ang A, Maeda Y, Seufferlein T, Mellman I, Nelson WJ, Malhotra V.

Protein kinase D regulates basolateral membrane protein exit from trans-Golgi network

*Nature Cell Biology. 6:106-112, 2004*

105. **Zhang** T, Townsens CM, Jr., Udipi V, Yanaihara N, Rajaraman S, Beauchamp RD, Ishizuka J, Evers BM, Gomez G, Thomson JC, Greeley GH, Jr.  
Phorbol Ester –Induced Alteration in the Pattern of Secretion and Storage of Chromogranin A and Neurotensin in a Human Pancreatic Carcinoid Cell Line.  
*Endocrinology. 136:2252-2261, 1995*
106. **Zhang** W, Zheng S, Storz P, Min W. Protein kinase D specifically mediates apoptosis signal-regulating kinase 1-JNK signaling induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> but not tumor necrosis factor.  
*The Journal of Biological Chemistry. 280:19036-19044, 2005*
107. **Zhuang** Z, Vortmeyer AO, Pack S, Huang S, Pham TA, Wang C, Park WS, Agarwal SK, Debelenko LV, Kester M, Guru SC, Manickam P, Olufemi SE, Yu F, Heppner C, Crabtree JS, Skaruli MC, Venzon DJ, Emmert-Buck MR, Chandrasekharappa SC, Collins FS, Burns AL, Marx SJ, Lubensky IA.  
Somatic mutations of the Men1 tumor suppressor gene in sporadic gastrinomas and insulinomas.  
*Cancer Research. 57:4682-4686, 1997*
108. **Zhukova** E, Sinnett-Smith J, Rozengurt E.  
Protein kinase D potentiates DNA synthesis and cell proliferation induced by bombesin, vasopressin, or phorbol esters in Swiss 3T3 cells.  
*The Journal of Biological Chemistry. 276:40298-40305, 2001*
109. **Zugaza** JL, Sinnett-Smith J, Van Lint J, Rozengurt E.  
Protein kinase D (PKD) activation in intact cells through a protein kinase C-dependent signal transduction pathway.  
*EMBO Journal. 15:6220-6230, 1996*

## 7. Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie Herrn PD Dr. med Götz von Wichert, der mich auf dem gesamten Weg zu meiner Promotion jederzeit tatkräftig unterstützte, mir stets motivierend, hilfsbereit und ideenreich zur Seite stand und immer Zeit und ein offenes Ohr für alle meine Probleme und Fragen hatte. Auch danke ich ihm für die Ermöglichung dieser Arbeit durch die Überlassung des Themas und das Bereitstellen der notwendigen Räumlichkeiten, Geräte und Materialien.

Bedanken möchte ich mich auch ganz besonders bei Jasmine Eismann, Denis Krndija und Heidrun Schmid für die immer wieder benötigte Unterstützung und Hilfe bei theoretischen und praktischen Fragen und die sehr gute Atmosphäre im Labor. Ihr wart der Grund für mich immer wieder gerne ins Labor zu kommen!

Des Weiteren möchte ich den Mitarbeitern unseres „Nachbarlabors“ für die nette Stimmung an der Steri-Bank und die immer wieder aufmunternden Worte und Hilfestellungen danken.

Auch danke ich Matthias dafür, dass er mich in den unmotiviertesten Stunden an entscheidenden Hürden dieser Arbeit durch viel Interesse, Geduld und sein gutes Vorbild dazu gebracht hat weiterzuschreiben.

Schließlich möchte ich mich ganz besonders bei meinen Eltern bedanken, die mir mein Studium und meinen gesamten Werdegang ermöglicht haben und mich auch während dieser Arbeit immer wieder aufmunternd unterstützt haben. Ein spezielles Dankeschön geht dabei an meinen Vater für das mühselige Korrekturlesen der Arbeit!

## 8. Lebenslauf

<b>Name:</b>		Teresa Edenfeld
<b>Geburtsdatum:</b>		02.01.1982
<b>Geburtsort:</b>		Rheda-Wiedenbrück
<b>Staatsangehörigkeit:</b>		deutsch
<b>Familienstand:</b>		ledig
<b>Hochschulbildung:</b>	10/2002 - 10/2004	Studium der Humanmedizin Otto-von Guericke- Universität Magdeburg
	Seit 10/2004 -	Fortsetzung des Studiums der Humanmedizin Univesität Ulm
<b>Schulbildung:</b>	1992 – 2001	Ratsgymnasium Rheda- Wiedenbrück
<b>Freiwilliges Soziales Jahr:</b>	09/2001-09/2002	Freiwilligendienst in San Carlos, Nicaragua
<b>Famulaturen:</b>	03/2005 – 04/2005	Vinzenzkrankenhaus Wiedenbrück Abteilung für Innere Medizin
	09/2005 – 10/2005	Bundeswehrkrankenhaus Ulm Abteilung für Anästhesiologie und Intensivmedizin
	08/2006 - 10/2006	Hospital Amistad Japon Nicaragua Abteilung für Gynäkologie und Geburtshilfe Granada, Nicaragua
	03/2007 – 03/2007	Dres.med Wenner, Thiele, Ollerfs, Konrad Fachärzte für Kinder- und Jugendheilkunde Osnabrück
	03/2007 – 04/2007	Kinderhospital Osnabrück Ambulanz

## Lebenslauf

---

<b>Studentische Mitarbeit in der Lehre</b>	10/2005 – 04/2008	Institut für Pharmakologie und Toxikologie Universität Ulm Problemorientiertes Lernen (POL) Seit 04/2006 Obertutor und Supervisor
<b>Tertiale im praktischen Jahr</b>	09//2008 – 12/2008	Innere Medizin: Hämatologie/Onkologie, Aufnahmestation Bundeswehrkrankenhaus Ulm
	12/2008 – 04/2009	Pädiatrie Universität Ulm
	04/2009 – 07/2009	Chirurgie: Unfallchirurgie, Kinderchirurgie Komfo Anokye Teaching Hospital Kumasi, Ghana
<b>Promotion:</b>		Charakterisierung der Funktion der Proteinkinase D2 als Regulator der Chromogranin A-Sekretion in humanen BON neuroendokrinen Tumorzellen