

Proteinkinase C α im Zellkern:
Kernimport, Interaktionspartner und Substrate

Dissertation zur
Erlangung der Doktorwürde des Fachbereichs
Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von Ingo Lehmann

Berlin 2002

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Chemie, Biochemie des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. F. Hucho angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. F. Hucho

2. Gutachter: PD Dr. M. Ziegler

Datum und Ort der Disputation: Berlin, den 29. Oktober 2002

1. Einleitung	5
1.1. Signaltransduktion zum Zellkern	5
1.2. Der Zellkern	8
1.2.1. Die Kernmembran	8
1.2.2. Der Kernporenkomplex	11
1.2.3. Kernimport und Export	13
1.3. PKC im Zellkern	17
1.4. Substrate der PKC im Zellkern	19
1.5. Spleißen	21
1.6. Der PTB-assoziierte splicing Faktor (PSF)	22
1.7. Zielsetzung der Arbeit	24
2. Ergebnisse	26
2.1. Suche nach dem NLS der PKC α	26
2.1.1. Die pHM Δ PKC α -Konstrukte	26
2.1.2. Die pHM Δ PKC α DiGFP-Konstrukte	31
2.2. PSF als PKC α -bindendes Protein im Zellkern	37
2.2.1. Charakterisierung der verwendeten Antikörper	37
2.2.2. Untersuchung zum PTB-assoziierten Spleißfaktor (PSF)	38
2.3. Substrate der PKC α an der inneren Kernmembran	41
2.3.1. Phosphorylierung der Kernmembran	41
2.3.2. Phosphorylierung der Triton X-100-resistenten Fraktion der Kernmembran ..	44
3. Diskussion.....	46
3.1. Das Kernlokalisierungssignal der PKC α	46
3.2. Physiologische Bedeutung der PSF-Bindung	51
3.3. Nucleäre Substrate der PKC α	54
3.4. Zusammenfassung.....	62
3.5. Ausblick.....	63
3.6. Summary.....	64
4. Material und Methoden.....	65
4.1. Analytik von Proteinen.....	65
4.1.1. Proteinbestimmung nach Bradford	65
4.1.2. Eindimensionale diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli	65
4.1.3. BAC-SDS-PAGE.....	66
4.1.4. Blotting von Proteinen nach dem „Semidry“-Verfahren	68
4.1.5. Ponceaufärbung von Proteinen auf der Nitrozellulosemembran	68
4.1.6. SYPRO-Färbung von Proteinen auf der Nitrozellulosemembran	68
4.1.7. Nachweis von Proteinen durch Immunoblotting (<i>Western-Blotting</i>)	69
4.1.8. “Strippen” der Blotmembran.....	70
4.1.9. Immunpräzipitation.....	70

4.1.10. Bindungstest („Pull down assay“)	71
4.1.11. Phosphorylierung von Proteinen (<i>in vitro</i>)	71
4.1.12. In Gel-Verdau mit Trypsin	72
4.2. Molekularbiologische Methoden	74
4.2.1. Anzucht von Bakterien	74
4.2.2. Herstellung kompetenter E. coli	74
4.2.3. Transformation kompetenter E. coli	75
4.2.4. Mini/Midi-Präparation von Plasmid-DNA	75
4.2.5. Ethanol-fällung von DNA	76
4.2.6. Konzentrationsbestimmung von DNA	76
4.2.7. DNA-Spaltung mit Restriktionsenzymen	77
4.2.8. DNA-Ligation	77
4.2.9. Sequenzierung von DNA:	77
4.2.10. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Arnheim und Ehrlich (1992)	78
4.2.11. Agarose-Gelelektrophorese	78
4.2.12. DNA-Elution aus Agarosegelen	79
4.2.13. Herstellung der Vektoren	79
4.3. Zellkultur	84
4.3.1. Sf9-Zellen	84
4.3.2. Transfektion von Sf9-Zellen	84
4.3.3. Bestimmung des Virustiters	85
4.3.4. Amplifikationsschritte und Expression des Fusionsproteins	86
4.3.5. Isolierung und Aufreinigung des GST-Fusionsproteins	87
4.3.6. Säugerzellen	88
4.3.7. Transfektion von Säugerzellen	88
4.3.8. Fluoreszenzmikroskopie	89
4.3.9. Subzelluläre Fraktionierung: Kernpräparation	89
4.3.10. Präparation von Kernmembranen und Nucleoplasma	90
4.3.11. Tritonextraktion von Kernmembranen	91
5. Literatur	92
6. Anhang	103
6.1. Abkürzungen	103
6.2. Publikationen	104
6.3. Danksagungen	105