

# **Analyse posttranslationaler Modifikationen von Kernhüllenproteinen**



**Inaugural-Dissertation**  
**zur Erlangung der Doktorwürde**  
**am Fachbereich Biologie Chemie Pharmazie**  
**der Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von**

**Mathias Dreger**

**Berlin, 1999**

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ferdinand Hucho (AG Neurochemie), Institut für Chemie, Biochemie des Fachbereichs Biologie, Chemie, Pharmazie der Freien Universität Berlin angefertigt.

- 1. Gutachter: Prof. Dr. Ferdinand Hucho**
- 2. Gutachter: Prof. Dr. Ralf Erdmann**

**Ort und Datum der Disputation: Berlin, 25.10.1999**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1 ZELLKERN-KOMPARTIMENTE</b>	<b>1</b>
<b>1.2 AUFBAU UND DYNAMIK DER ZELLKERNHÜLLE</b>	<b>2</b>
1.2.1 SUBKOMPARTIMENTE DER KERNHÜLLE	2
1.2.1.1 Kernporenkomplex und Porenmembran	4
1.2.1.2 Äußere Kernmembran	5
1.2.1.3 Perinuklearraum	5
1.2.1.4 Innere Kernmembran	5
1.2.1.5 Kernlamina	10
1.2.2 DYNAMISCHE STRUKTUR DER KERNHÜLLE	11
1.2.2.1 Zellzyklus	11
1.2.2.2 Deassemblierung und Reassemblierung der Kernhülle	12
<b>1.3 SIGNALTRANSDUKTION UND KERNMEMBRAN</b>	<b>14</b>
1.3.1. SIGNALTRANSDUKTION ZUM ZELLKERN	14
1.3.2 KOMPONENTEN VON SIGNALTRANSDUKTIONSWEGEN IN DER KERNHÜLLE	15
1.3.2.1 Lipid-Signale in der Kernhülle und in der Kernmatrix	16
1.3.2.2 Ca <sup>2+</sup> im Zellkern	17
1.3.3 NUKLEÄRE TYROSINKINASEN	18
<b>1.4 PROTEOM-UNTERSUCHUNGEN ZUR AUFKLÄRUNG FUNKTIONELLER ZUSAMMENHÄNGE IN ZELLEN AUF PROTEINEBENE</b>	<b>20</b>
<b>2. AUFGABENSTELLUNG UND EXPERIMENTELLER ANSATZ</b>	<b>22</b>
<b>3. ERGEBNISSE</b>	<b>23</b>
<b>3.1 EXPERIMENTE ZUR IDENTIFIZIERUNG TYROSINPHOSPHORYLIERTER KERNHÜLLENPROTEINE</b>	<b>23</b>
3.1.1 TYROSINKINASESUBSTRATE IN KERNHÜLLENPRÄPARATEN AUS NEUROBLASTOMA NEURO 2A-ZELLEN	24
3.1.1.1 Eindimensionale Auftrennung von Kernhüllenproteinen	24
3.1.1.2 Zweidimensionale Auftrennung	25
3.1.1.3 Immunpräzipitation mit anti-Phosphotyrosin-Antikörpern	27
3.1.1.4 Analyse der im IP-Puffer unlöslichen Fraktion	31
3.1.1.5 Zusammenfassung der Befunde zur Tyrosinphosphorylierung von Kernhüllenproteinen aus Neuro 2a-Zellen	32
3.1.2 ANALYSE DER TYROSINPHOSPHORYLIERUNG VON PROTEINEN IM KERNHÜLLENPRÄPARAT AUS RATTEN-PHEOCHROMOCYTOMA PC 12-ZELLEN	38
3.1.2.1 Charakterisierung des Kernhüllenpräparates	38
3.1.2.2 in vivo Tyrosinphosphorylierung von Proteinen im Kernhüllenpräparat von PC 12-Zellen	40
3.1.2.3 Dynamik der Tyrosinphosphorylierung von Kernhüllenproteinen nach Stimulierung der PC 12-Zellen mit Nervenwachstumsfaktor (NGF)	40
3.1.3 IMMUNZYTOCHEMISCHE ANALYSE DER TYROSINPHOSPHORYLIERUNG AM ZELLKERN	45
3.1.3.1 Konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Neuro 2A-Zellen	45
3.1.3.2 Konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie von 615-Zellen	46
<b>3.2 EIN NEUER METHODISCHER ANSATZ ZUR SPEZIFISCHEN DETEKTION VON PHOSPHOTYROSIN-HALTIGEN PEPTIDEN</b>	<b>49</b>
3.2.1 DIFFERENZABSORPTION TYROSIN VERSUS PHOSPHOTYROSIN	49

3.2.2 ANWENDUNG DER DREIWELLENLÄNGEN-DETEKTION AUF EIN PEPTIDGEMISCH NACH PROTEOLYTISCHER SPALTUNG IM GEL EINES TYROSINPHOSPHORYLIERTEN INTEGRALEN MEMBRANPROTEINS	50
3.2.3 ANWENDUNG DER METHODE AUF TYROSINKINASE-SUBSTRATE AUS DER KERNHÜLLE	52
<b>3.3 ANALYSE DES PHOSPHORYLIERUNGSSTATUS EINES INTEGRALEN MEMBRANPROTEINS DER KERNHÜLLE: LAP 2<math>\beta</math></b>	<b>52</b>
3.3.1 PROTEINPRÄPARATION, IDENTIFIZIERUNG DER SPLEIBVARIANTE LAP 2 $\epsilon$	53
3.3.2 IDENTIFIZIERUNG NATIVER PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN VON LAP 2 $\beta$	55
3.3.2.1 Detektion von Phosphopeptiden im Peptidgemisch	55
3.3.2.2 Lokalisierung der Phosphorylierungsstellen	56
3.3.3 DIE IDENTIFIZIERTEN PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN ALS SUBSTRATE ENDOGENER KINASEN	59
3.3.4 LAP 2 $\beta$ ALS <i>IN VITRO</i> -SUBSTRAT FÜR AKTIVIERTE PKC $\alpha$	62
3.3.5 WECHSELWIRKUNG VON LAP 2 $\beta$ MIT ANDEREN PROTEINEN	63
3.3.5.1 LAP 2 $\beta$ in der Blauen Nativen Elektrophorese	63
3.3.5.2 Koimmunpräzipitation von Laminen mit LAP 2 $\beta$	64
<b>4. DISKUSSION</b>	<b>65</b>
<hr/>	
<b>4.1 DISKUSSION DER BEFUNDE AUS DEN EXPERIMENTEN ZUR IDENTIFIZIERUNG TYROSINPHOSPHORYLICHTER KERNHÜLLENPROTEINE</b>	<b>65</b>
4.1.1 POTENTIAL DER BAC-GELELEKTROPHORESE FÜR DIE UNTERSUCHUNG DER ZELLKERNHÜLLE	65
4.1.2 TYROSINPHOSPHORYLIERTE PROTEINE DER KERNHÜLLE: NEURO 2A-ZELLEN	66
4.1.3 TYROSINKINASESUBSTRATE AUS KERNHÜLLEN VON PC12-ZELLEN	69
4.1.4 TYROSINPHOSPHORYLIERUNG AN ISOLIERTEN KERNEN IN DER INDIRECTEN IMMUNFLUORESCENZ	71
4.1.5 DETEKTION TYROSINPHOSPHORYLICHTER PEPTIDE ANHAND IHRER CHARAKTERISTISCHEN UV-ABSORPTION	72
<b>4.2 INTERPHASE-PHOSPHORYLIERUNGSSTELLEN IN LAP 2<math>\beta</math></b>	<b>74</b>
<b>4.3 PROTEIN-PROTEIN-INTERAKTIONEN VON LAP 2<math>\beta</math></b>	<b>78</b>
<b>4.4 ANALYTIK VON PHOSPHOPEPTIDEN MIT MASSENSPEKTROMETRISCHEN METHODEN:</b>	<b>79</b>
4.4.1 GRENZEN HERKÖMMLICHER STRATEGIEN DER PHOSPHOPEPTIDANALYTIK	79
4.4.2 POTENTIALE VON MALDI-TOF-MS UND NANOELEKTROSPRAY-TANDEM-MS IN DER PHOSPHOPEPTIDANALYTIK	80
4.4.3 METHODISCHE IMPLIKATIONEN DER PHOSPHOPEPTID-ANALYSE BEI LAP 2 $\beta$	81
<b>4.5 AUSBLICK AUF ZU UNTERSUCHENDE FRAGESTELLUNGEN</b>	<b>82</b>
<b>4.6. ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>84</b>
<b>5. MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>87</b>
<hr/>	
<b>5.1 ZELLKULTUR</b>	<b>87</b>
<b>5.2 PRÄPARATION VON ZELLKERNEN UND KERNHÜLLEN</b>	<b>87</b>
5.2.1 KERN- UND KERNHÜLLENPRÄPARATION AUS NEURO 2A-ZELLEN	87
5.2.2 KERN- UND KERNHÜLLENPRÄPARATION AUS PC12-ZELLEN	89
5.2.3 PROTEINBESTIMMUNG NACH BRADFORD	90
<b>5.3 ZELLSTIMULIERUNG UND <i>IN VITRO</i> PHOSPHORYLIERUNG</b>	<b>90</b>
5.3.1 STIMULIERUNG VON PC 12-ZELLEN UND 615-ZELLEN MIT NGF UND KULTIVIERUNG VON NEURO 2A-ZELLEN IN GEGENWART VON KALIUM-(2,2'-BIPYRIDIN)-OXOBISPEROXOVANADAT (V)	90
5.3.2 <i>IN VITRO</i> PHOSPHORYLIERUNG	91
<b>5.4 ANTIKÖRPER UND IMMUNCHEMISCHE METHODEN:</b>	<b>92</b>
5.4.1 ANTIKÖRPER R1	92
5.4.2 ANTIPHOSPHOTYROSIN-ANTI-KÖRPER	93
5.4.3 SONSTIGE VERWENDETE ANTIKÖRPER	94

5.4.4	VERSUCHSBEDINGUNGEN DER IMMUNPRÄZIPITATION	94
5.4.5	WESTERN BLOT	95
5.4.5.1	ANTIKÖRPER-INKUBATIONEN	95
5.4.5.2	Entwicklungsreaktionen	95
5.4.5.2.1	Detektionssystem alkalische Phosphatase	95
5.4.5.2.2	ECL-Blot	96
5.4.6	INDIREKTE IMMUNFLUORESZENZ	97
<b>5.5</b>	<b>TRENNMETHODEN FÜR PROTEINE UND PEPTIDE</b>	<b>98</b>
5.5.1	TRENNMETHODEN FÜR PROTEINE	98
5.5.1.1	Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (nach Laemmli, 1970)	98
5.5.1.2	BAC-Gel-Elektrophorese	100
5.5.1.3	Blaue Native Elektrophorese (Schägger und Jagow, 1991)	102
5.5.2	TRENNMETHODEN FÜR PEPTIDE	103
5.5.2.1	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)	103
5.5.2.2	Dünnschichtelektrophorese	104
<b>5.6</b>	<b>ELEKTROBLOTTING</b>	<b>106</b>
<b>5.7</b>	<b>FÄRBETECHNIKEN</b>	<b>107</b>
5.7.1	COOMASSIE-FÄRBUNG VON GELELEKTROPHORETISCH GETRENNTEN PROTEINEN	107
5.7.2	SILBERFÄRBUNG GELELEKTROPHORETISCH GETRENNTER PROTEINE NACH SHEVCHENKO ET AL. (1996)	107
5.7.3	PONCEAU-FÄRBUNG VON PROTEINEN AUF DER BLOTMEMBRAN	108
5.7.4	INDIA INK-FÄRBUNG VON PROTEINEN AUF DER BLOTMEMBRAN	108
<b>5.8</b>	<b>PROTEOLYTISCHE SPALTUNG VON PROTEINEN</b>	<b>109</b>
5.8.1	TRYPTISCHER VERDAU VON PROTEINEN IN POLYACRYLAMIDGELEN	109
5.8.2	VERDAU VON PROTEINEN AUF DER BLOTMEMBRAN	110
<b>5.9</b>	<b>MESSUNG VON <math>\beta</math>-STRAHLUNG</b>	<b>111</b>
<b>5.10</b>	<b>MASSENSPEKTROMETRISCHE METHODEN</b>	<b>112</b>
5.10.1	PRINZIPIEN DER MALDI-MS	112
5.10.2	PRINZIPIEN DER ESI-MS	114
5.10.3	KRITERIEN FÜR DIE MASSENSPEKTROMETRISCHE PROTEINIDENTIFIZIERUNG	117
5.10.4	PROBENVORBEREITUNG FÜR DIE MASSENSPEKTROMETRIE	121
5.10.4.1	Probenvorbereitung für die MALDI-MS	121
5.10.4.2	Probenvorbereitung für die Nanoelektrospray-Massenspektrometrie	121
5.10.5	DURCHFÜHRUNG DER MASSENSPEKTROMETRISCHEN MESSUNGEN	122
5.10.5.1	MALDI-MS	122
5.10.5.2	Nanoelektrospray-Massenspektrometrie	123
<b>5.11</b>	<b>MATERIALIEN-NACHWEIS</b>	<b>124</b>
5.11.1	ZELLKULTUR	124
5.11.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	124
5.11.3	CHEMIKALIEN	124
5.11.4	PROTEINE UND PEPTIDE	125
5.11.5	ANTIKÖRPER	125
5.11.6	RADIOAKTIVE SUBSTANZEN	126
5.11.7	GERÄTE	126
<b>6.</b>	<b>ABKÜRZUNGEN</b>	<b>128</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>131</b>
<b>8.</b>	<b>EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN</b>	<b>146</b>

