

2. Zielsetzung der Arbeit und experimenteller Ansatz

Es ist weitgehend unklar, ob vor allem an der inneren Kernmembran ähnlich wie an der Plasmamembran Komponenten vorkommen, die an Signaltransduktionsereignissen teilnehmen. Darüberhinaus sind erst sehr wenige Proteine der inneren Kernmembran bekannt. Die Hülle von Zellkernen wird in der Literatur bis auf wenige Ausnahmen im wesentlichen als weitgehend inerte Barriere zwischen dem Zytosol und dem Nukleoplasma interpretiert. Die einzigen gut untersuchten regulierten Prozesse an der Kernmembran sind der Protein-Import und-Export über die Kernporenkomplexe sowie die Deassemblierung und Reassemblierung der Kernhülle während des Zellzyklus.

Ziel meiner Doktorarbeit war die Analyse posttranslationaler Modifikationen bei Kernhüllenproteinen als Ausgangspunkt für die Entdeckung bisher unbekannter Signaltransduktionsprozesse an den Kernmembranen. Ein Schwerpunkt lag dabei auf der Identifizierung von tyrosinphosphorylierten Proteinen in der Kernhülle. Die Analyse sollte mit endogenen Kernhüllenproteinen auf proteinchemischer Ebene mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie erfolgen. Zielvorstellung war es, nach der Protein-Identifizierung und der Kartierung der Phosphorylierungsstellen den funktionalen Zusammenhang, in dem die identifizierten Modifikationen stehen, aufzuklären.

Die angewendete experimentelle Strategie ging von der immunchemischen Detektion tyrosinphosphorylierter Proteine in Kernhüllenpräparaten mit Hilfe von Anti-Phosphotyrosin-Antikörpern aus. Die Korrelation von Western Blot Signalen mit angefärbten Proteinspots im Gel und die Anreicherung tyrosinphosphorylierter Proteine durch Immunpräzipitation sollten genutzt werden, um die Kandidatenproteine nach proteolytischem Verdau in der MALDI-Massenspektrometrie zu identifizieren und die Peptide mit den *in vivo*-Phosphorylierungsstellen zu sequenzieren.

Dabei sollte auch eine Einschätzung von Möglichkeiten und Grenzen der Phosphopeptidanalytik mit der MALDI-Massenspektrometrie vorgenommen werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die *in vivo*-Phosphorylierungsstellen eines integralen Membranproteins der inneren Kernmembran, LAP 2 β , während der Interphase des Zellzyklus detailliert charakterisiert. Dies erfolgte in enger Kooperation mit Dr. Gitte Neubauer aus der Protein & Peptid-Gruppe am EMBL, Heidelberg.