

## 3. Ergebnisse

### **3.1 Experimente zur Identifizierung tyrosinphosphorylierter Kernhüllenproteine**

Ausgangspunkt der Experimente für die vorliegende Arbeit war die Präparation von Kernhüllenproteinen aus Neuroblastoma Neuro 2a-Zellen der Maus. Da über eine Regulation von Kernhüllenproteinen durch Tyrosinphosphorylierung bislang nichts bekannt ist, wurde zunächst die konstitutive Tyrosinphosphorylierung von Proteinen im Kernhüllenpräparat aus Zellen unter Standard-Kulturbedingungen (s.Abschn. 5.1) untersucht. Als identifizierte Tyrosinkinasesubstrate konnten Proteine erst dann gelten, wenn eine direkte Sequenzierung eines phosphotyrosinhaltigen Peptids nach proteolytischer Spaltung gelang. Der experimentelle Ansatz dazu bestand aus folgenden Teilschritten:

1. Nachweis des Vorkommens tyrosinphosphorylierter Proteine in Kernhüllenpräparaten durch anti-Phosphotyrosin Western Blots (Abschn. 3.1.1),
2. Die Korrelation der Lage von Western Blot-Signalen auf der Blotmembran mit der angefärbten Proteinspots in Polyacrylamidgelen mit massenspektrometrischer Identifizierung dieser Proteine, wenn möglich bei gleichzeitiger Detektion von Phosphopeptiden (Abschn. 3.1.1.1, 3.1.1.2, 3.1.1.4),
3. Die Anreicherung tyrosinphosphorylierter Proteine aus den Kernhüllenpräparaten durch anti-Phosphotyrosin-Immunpräzipitation mit anschließender massenspektrometrischer Identifizierung der präzipitierten Proteine (Abschn. 3.1.1.3).

Aufgrund der sich im Verlauf der Experimente abzeichnenden Schwierigkeit einer direkten Phosphopeptiddetektion und -sequenzierung in der MALDI-MS nach proteolytischer Spaltung von Kandidatenproteinen wurde die experimentelle Strategie erweitert durch:

1. den Einsatz selektiver Proteintyrosinphosphatase-Inhibitoren in der Zellkultur und in *in vitro*-Phosphorylierungsreaktionen zur Steigerung des Phosphotyrosingehaltes der Proteine im Kernhüllenpräparat *in vitro* (Abschn. 3.1.1.3),

2. die Präparation von Kernhüllenproteinen aus Pheochromocytoma PC 12-Zellen der Ratte, da mit der Stimulierbarkeit der Zellen durch Nervenwachstumsfaktor (NGF) ein physiologisches Signal bekannt ist, das die intrazelluläre Tyrosinphosphorylierung moduliert (Abschn. 3.1.2),
3. die Darstellung der Existenz tyrosinphosphorylierter Kernhüllenproteine durch eine zweite unabhängige Methode, der indirekten Immunfluoreszenz und konfokaler Laserscanning-Mikroskopie (Abschn. 3.1.3),
4. den Versuch der Entwicklung einer neuen Methode zur selektiven Detektion tyrosinphosphorylierter Peptide während der Auftrennung von Peptidgemischen nach proteolytischer Spaltung mutmaßlich tyrosinphosphorylierter Proteine mittels hochauflösender Flüssigkeitschromatographie im Mikromaßstab (Mikro-HPLC) und massenspektrometrischer Phosphopeptidsequenzierung (Abschn. 3.2).

### **3.1.1 Tyrosinkinasesubstrate in Kernhüllenpräparaten aus Neuroblastoma neuro 2a-Zellen**

Mit Hilfe der eindimensionalen Auftrennung von Proteinen im Kernhüllenpräparat aus Neuro 2a-Zellen in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli (1970) oder der zweidimensionalen Auftrennung in der Benzyltrimethyl-Hexadecylammoniumchlorid (16-BAC) /SDS-PAGE nach Hartinger et al. (1996) und anti-Phosphotyrosin Western Blot nach Elektroblothing der Gele auf Nitrocellulose-Membranen wurde der Nachweis geführt, daß das Kernhüllenpräparat tyrosinphosphorylierte Proteine enthält. Verschiedene Kandidatenproteine wurden massenspektrometrisch identifiziert. Diese Befunde wurden verifiziert durch eine anti-Phosphotyrosin-Immunpräzipitation aus dem Kernhüllenpräparat. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in den folgenden Abschnitten dargestellt.

#### ***3.1.1.1 Eindimensionale Auftrennung von Kernhüllenproteinen***

Der Western Blot mit anti-Phosphotyrosin-Antikörpern zeigt ein komplexes Muster tyrosinphosphorylierter Proteine nach eindimensionaler Auftrennung der Proteine des Kernhüllenpräparates. Anhand der Korrelation von Western Blot-Signalen mit Banden im Gel nach Coomassiefärbung wurde zunächst versucht, durch massenspektrometrische Analyse von

Peptidgemischen aus dem in-Gel-Verdau von Proteinen komigrierend mit Signalen im Western Blot Kandidatenproteine für Tyrosinkinasesubstrate zu identifizieren. Einige Kandidatenproteine konnten identifiziert werden (Abb.1): Lamin C, ein Bestandteil der Kernlamina, NonO, ein RNA-bindendes Protein, LAP 2 $\beta$ , ein Protein der inneren Kernmembran und hnRNPU, ein weiteres RNA-bindendes Protein, sowie Aktin. Einige Banden enthielten eindeutig Proteingemische (z.B. Abb.1, Bande 2: LAP 2 $\beta$ /NonO). Phosphotyrosinhaltige Peptide konnten in den Verdauungsmischen jedoch nicht identifiziert werden.

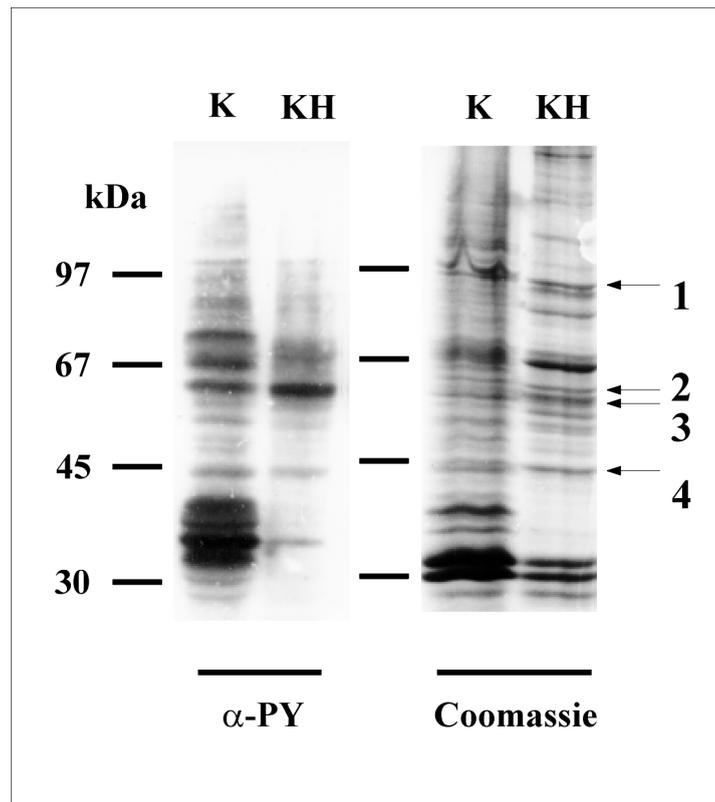


Abb.1: Aufgrund der Korrelation zwischen Coomassiefärbung und anti-Phosphotyrosin- (anti-PY-) Western Blot nach eindimensionaler gelelektrophoretischer Auftrennung ausgewählte und mittels MALDI-MS identifizierte Kandidatenproteine für Tyrosinkinasesubstrate aus Neuro 2a-Kernhüllen: 1: hnRNP U, 2: NonO/LAP 2 $\beta$ , 3: Lamin C, 4: Aktin. K: Gesamt-Kernprotein, KH: Gesamt-Kernhüllenprotein

### 3.1.1.2 Zweidimensionale Auftrennung

Die Analyse der in verschiedenen Proteinbanden nach der eindimensionalen Auftrennung des Kernhüllenpräparates enthaltenen Proteine hatte gezeigt, daß in einzelnen Banden Proteingemische vorlagen. Während nach der eindimensionalen Auftrennung im Molekulargewichtsbereich zwischen 55 und 65 kDa zwei bis drei anti-Phosphotyrosin-immunreaktive Banden im Western Blot erkennbar waren (s. Abb.1), konnte in der zweidimensionalen Auftrennung mit Hilfe der BAC-Gelelektrophorese eine Gruppe von vier bis

fünf Proteinen zwischen 55 und 65 kDa apparenten Molekulargewichts im anti-Phosphotyrosin-Western Blot aufgelöst werden (Abb.2). Die Positionen dieser Western Blot-Signale wurden wiederum mit den Positionen Coomassie-gefärbter Proteinspots in BAC-Gelen korreliert. Die Kandidatenproteine wurden nach proteolytischer Spaltung im Gel mittels MALDI-MS identifiziert. Abbildung 2 zeigt das Ergebnis eines dieser Experimente. Für das gezeigte Experiment, bei dem für die spätere Proteinidentifizierung korrespondierende Proteinspots aus mehreren BAC-Gelen vereinigt wurden, führte Dr Henning Otto aus unserem Labor die Gelelektrophorese und den anti-Phosphotyrosin Western Blot durch.

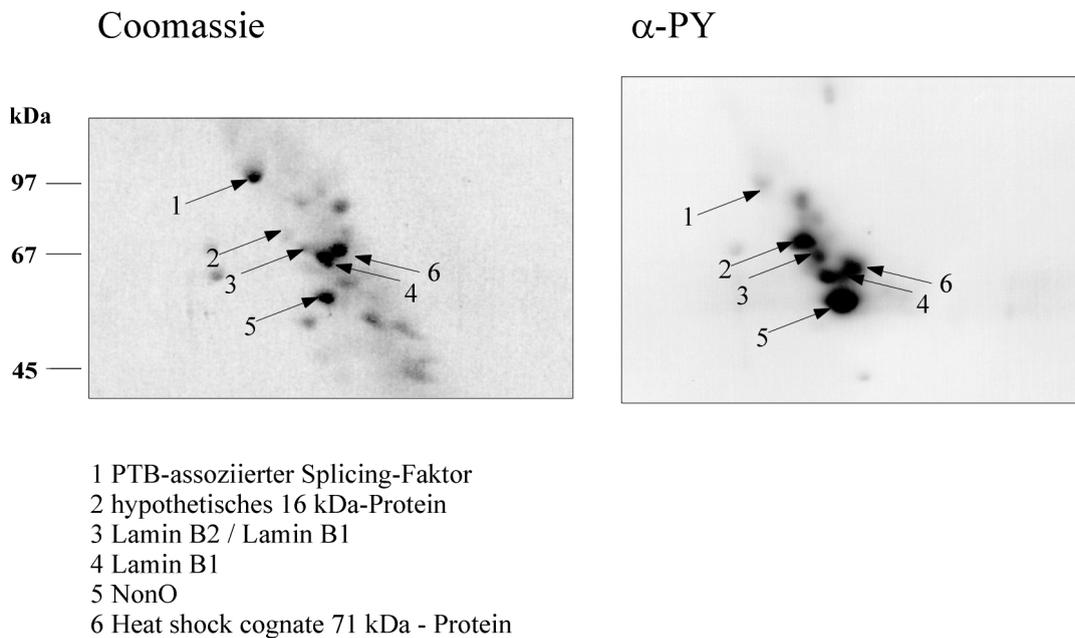


Abb.2: Korrelation zwischen Coomassie-Färbung und anti-Phosphotyrosin Western Blot nach BAC-gelelektrophoretischer Auftrennung von Neuro 2a-Kernhüllenproteinen. Die mittels MALDI-MS identifizierten Kandidatenproteine für Tyrosinkinasesubstrate sind gekennzeichnet (vgl. Tab. 1). Gel und Blot entstammen einem Experiment von Dr. Henning Otto.

Tab.1 faßt die Daten zur Identifizierung der Kandidatenproteine aus dem gezeigten Experiment zusammen.

**PTB-assoziiertes Splicing Faktor (PSF)**, (SwissProt Eintrag P23246 für die Sequenz aus *H. sapiens*, kein Eintrag für *M. musculus*). Das Protein (76 kDa) spielt eine regulatorische Rolle beim mRNA-Spleißen.

**16 kDa Protein**, (NCBI Nr. Acc. #110073), die Identifizierung bedeutet den Erstdnachweis des Proteins. Ein Homolog aus *H. sapiens* wurde als SYT-bindendes Protein bezeichnet. SYT ist ein mutmaßlicher Transkriptionsrepressor, der in "nuclear speckles" vorkommt. Literatur über das Bindeprotein ist nicht vorhanden.

**HSC 71** (NCBI Inr Acc. #347019, aus *Rattus norvegicus*, heat shock protein 70-Familie). Proteine der Hitzeschock-Protein 70 kDa-Familie spielen als Faltungshilfsproteine in diversen zellulären Kompartimenten eine Rolle. Am Zellkern ist Hsc 70 aus *M. musculus* beim Import karyophiler Proteine notwendig (Okuna et al., 1993).

**Non POU domain octamer binding protein** (NonO, ein RNA-bindendes Protein, NCBI Inr Acc. #1083440). NonO bindet Octamer-Motive der DNA, aber auch einzelsträngige DNA und RNA (Yang et al., 1993). Das Protein reguliert offenbar auch die Bindungsaktivität anderer DNA-bindender Proteine (Yang et al., 1997).

**Lamin B1** (NCBI Inr Acc. #110630), ein Protein der Kernlamina, das über eine Farnesylierung mit der inneren Kernmembran interagiert. In der indirekten Immunfluoreszenz zeigt das Protein eine ringartige Verteilung an der inneren Kernmembran. Das Protein wird zur Mitose hin Ser/Thre phosphoryliert. Diese Phosphorylierung ist ein Schritt zur Depolymerisation der Kernlamina (Peter et al., 1990, Collas et al., 1997, Collas, 1999). Eine Tyrosinphosphorylierung ist nicht beschrieben.

**Lamin B2** wurde ebenfalls als mögliches Tyrosinkinase-Substrat identifiziert. Im Massenspektrum des Peptidgemisches nach proteolytischer Spaltung im Gel wurden allerdings auch Peptide von Lamin B1 detektiert.

Phosphopeptide wurden in den Peptidgemischen jedoch nicht detektiert.

### **3.1.1.3 Immunpräzipitation mit anti-Phosphotyrosin-Antikörpern**

Um tyrosinphosphorylierte Proteine selektiv aus dem Kernhüllenpräparat anzureichern, wurden Immunpräzipitations-Experimente unter Verwendung von anti-Phosphotyrosin-Antikörpern durchgeführt. Die Kontrolle der Spezifität der Immunpräzipitation erfolgte in allen hier gezeigten Experimenten durch parallel aufgearbeitete Ansätze, bei denen der Immunpräzipitationspuffer 10 mM Phenylphosphat zur Konkurrenz der Bindung der Antikörper an Phosphotyrosin enthielt.

Die spezifisch präzipitierten Proteine wurden in der SDS-PAGE nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Parallel aufgearbeitete Proben wurden mit Hilfe eines anti-Phosphotyrosin Western Blots analysiert und die korrespondierenden Proteine in der MALDI-MS identifiziert. In Experimenten, für die die Kernhüllenproteine aus Zellen, die in Standard-Kulturmedium kultiviert worden waren, präpariert wurden, lieferte die Immunpräzipitation je nach Stringenz der

Präzipitationsbedingungen entweder sehr geringe, einer proteinchemischen Analyse nicht zugängliche Proteinausbeuten, oder komplexe Proteingemische, so daß eine Kopräzipitation nicht-phosphorylierter Proteine mit Tyrosinkinasesubstraten nicht ausgeschlossen werden konnte (Abb.3a). Daher wurde in weiteren Experimenten versucht, den Phosphotyrosingehalt mutmaßlicher Tyrosinkinasesubstrate in der Kernhülle durch *in vitro*-Phosphorylierung und den Einsatz von Peroxovanadiumverbindungen als selektive Proteintyrosinphosphatase-Inhibitoren zu steigern, bevor eine Immunpräzipitation durchgeführt wurde. Peroxovanadiumverbindungen oxidieren für die katalytische Aktivität essentielle Cysteinreste in den aktiven Zentren von Proteintyrosinphosphatasen und hemmen sie dadurch "quasi-irreversibel" (zusammengefaßt bei Morinville et al., 1998).

Immunpräzipitationsexperimente mit anti-Phosphotyrosin-Antikörpern wurden mit folgenden Präparaten durchgeführt:

- a) mit Kernhüllenpräparaten in nativem Phosphorylierungszustand,
- b) mit Kernmembranpräparaten aus Zellkernen nach *in vitro*-Phosphorylierung durch endogene Proteinkinasen in Gegenwart des Tyrosinphosphatase-Inhibitors Pervanadat (generiert aus  $\text{Na}_3\text{VO}_4$  in Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Posner et al., 1994),
- c) mit Kernmembranpräparaten aus Zellen, die für 20 min mit 100  $\mu\text{M}$  des Tyrosinphosphatase-Inhibitors Kalium-(2,2'-Bipyridin)-oxobisperoxovanadat (V) (BiPy) behandelt worden waren. BiPy, erstmals präpariert von Vuletic und Djordjevic (1973), wurde synthetisiert nach Posner et al. (1994). Die Substanz wurde der Generierung von Pervanadat im Phosphorylierungsansatz oder im Zellkulturmedium in Gegenwart von  $\text{H}_2\text{O}_2$  vorgezogen, stand allerdings erst gegen Ende der Experimentierphase zur Verfügung.

Die Immunpräzipitationsexperimente wurden zunächst mit dem rekombinanten anti-Phosphotyrosin-Antikörper RC 20 durchgeführt. Da mit dem anti-Phosphotyrosin-Antikörper PY99 jedoch wesentlich besser reproduzierbare Ergebnisse in Western Blot-Experimenten, Immunpräzipitationen und in der indirekten Immunfluoreszenz (s.unten) erzielt wurden, wurden alle Experimente seit der Markteinführung von PY 99 (Anfang 1998) ausschließlich mit diesem Antikörper durchgeführt.

Beide Prozeduren zur Inhibition von Tyrosinphosphatasen führten zu einem Anstieg der Tyrosinphosphorylierung in den untersuchten Präparaten.

Ohne künstliche Steigerung der Tyrosinphosphorylierung ließen sich unter stringenten IP-Bedingungen (150 mM NaCl) mit beiden verwendeten anti-Phosphotyrosin-Antikörpern kaum

detektierbare Mengen tyrosinphosphorylierter Kernhüllenproteine präzipitieren. In IP-Experimenten mit dem Antikörper RC 20 unter weniger stringenten Salzbedingungen (50 mM NaCl) kam es zu einer Präzipitation von Proteinkomplexen, die Lamin B1 als Hauptkomponente enthielten (Abb.3A). Da die Komplexität des Proteinmusters im IP-Pellet jedoch die Komplexität des anti-Phosphotyrosin-Signalmusters im Western Blot übertraf, wurde von einer Kopräzipitation nicht-tyrosinphosphorylierter Proteine im Komplex mit Tyrosinkinasesubstraten ausgegangen.

Bei der Immunpräzipitation aus dem Kernhüllenpräparat wie unter b) mit dem anti-Phosphotyrosin-Antikörper RC 20 wurde Lamin B1 angereichert (Abb.3B). Weitere proteinchemisch identifizierbare Proteinbanden im Immunpräzipitat waren das heterogene Ribonukleoprotein (hnRNP) U sowie p160 Myb-binding protein und Histon H3. Keines dieser Proteine ist ein integrales Membranprotein: Lamin B1 ist ein Bestandteil der Kernlamina und interagiert über Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie über eine C-terminal Farnesylierung mit der inneren Kernmembran (im Überblick bei Nigg, 1992, Foisner und Gerace, 1993), hnRNP U ist Kernmatrix-assoziiert und p160 Myb-binding protein ist überwiegend mit den Nukleoli assoziiert (Tavner et al., 1998). Darüberhinaus waren weitere spezifisch präzipitierte Proteine im IP-Pellet erkennbar, deren Identifizierung jedoch nicht gelang.

In der Immunpräzipitation aus dem Kernhüllenpräparat wie unter c) mit dem anti-Phosphotyrosin-Antikörper PY 99 wurden zahlreiche Proteine spezifisch präzipitiert (Abb.3C). Identifiziert wurde davon aber nur ein einziges Protein, nämlich Cortactin. Lamin B1, Lamin A/C und LAP 2 $\beta$  wurden im IP-Pellet nicht detektiert, nur in den IP-Überständen (Daten nicht gezeigt). Der überwiegende Teil der Literatur über Cortactin beschreibt das Protein als Zytoskelett- und Focal-Adhesion-assoziiert, das Protein ist jedoch, wie in der Veröffentlichung von Thomas et al. (1995) zu erkennen, auch in Zellkernen lokalisiert. In keinem der Experimente wurden phosphotyrosinhaltige Peptide in den Verdauungsmischen gefunden.

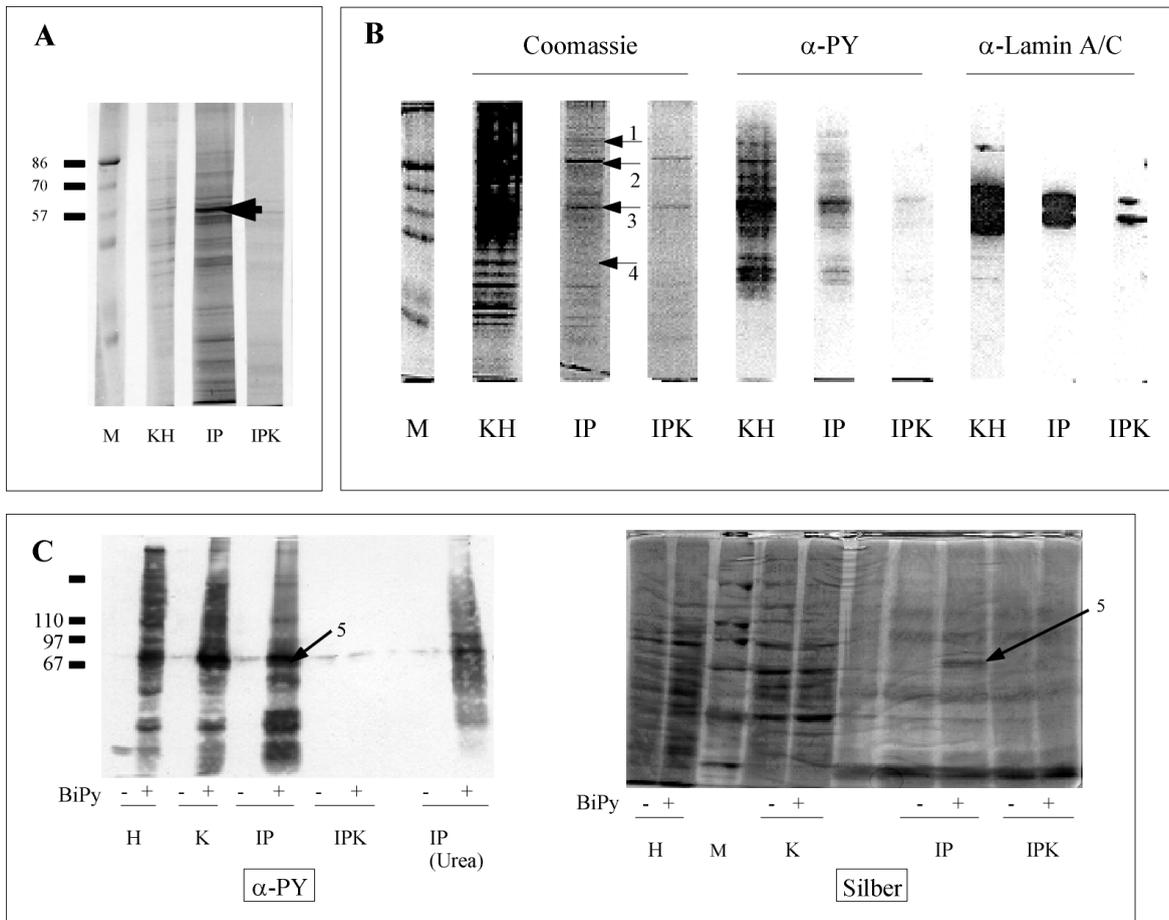


Abb.3: Immunpräzipitation (IP) mit anti-Phosphotyrosin-Antikörpern aus solubilisierten Neuro-2a-Kernhüllen, **A: IP mit dem Antikörper RC 20 aus nativen Kernhüllen (Coomassiefärbung)**. Das Proteinmuster im IP-Pellet erscheint als mit Phenylphosphat kompetierbar, aber äußerst komplex. Die IP-Bedingungen waren wenig stringent. Der Pfeil indiziert Lamin B1 als Hauptkomponente. M, Marker, KH, Gesamt-Kernhülle, IP, Pellet der Immunpräzipitation, IPK, Pellet der Immunpräzipitation bei Anwesenheit von 10 mM Phenylphosphat im IP-Puffer.

**B: IP mit dem gleichen Antikörper aus Neuro 2a-Kernmembranen nach in vitro-Phosphorylierung intakter Kerne in Gegenwart von Pervanadat [anti-Phosphotyrosin (anti-PY) Western Blot und Coomassiefärbung eines Gels]**. Die indizierten Komponenten des IP-Pellets wurden mit MALDI-MS (s. Tab. 2) identifiziert. (1) p160 Myb-binding protein, (2) hnRNP U, (3) Lamin B, (4) Histon H3.

**C: anti-PY – Western Blot und Silberfärbung eines Gels mit Proben aus der IP mit dem Antikörper PY99 aus Kernhüllen, die aus BiPy-stimulierten Zellen (+BiPy) oder aus unstimulierten Kontrollzellen (-BiPy) präpariert worden waren.** Die Silberfärbung wurde nach der Proteolyse- und Massenspektrometrie-kompatiblen Methode von Shevchenko et al. (1996) durchgeführt (s. Abschn. 5.7.2). Die Position von Cortactin (5), das mit MALDI-MS identifiziert wurde (s.Tab. 2) ist gekennzeichnet. M, Marker, KH, Gesamt-Kernhülle, IP, Pellet der Immunpräzipitation, IP-Urea: IP aus einem Harnstoffextrakt des unter den für die anderen IPs benutzten Solubilisierungsbedingungen (Triton/Hochsalz/SDS) unlöslichen Kernhüllenanteils.

### 3.1.1.4 Analyse der im IP-Puffer unlöslichen Fraktion

Nach Tritonextraktion des Kernhüllenpräparates (Solubilisierungsbedingungen wie für die Immunpräzipitation, s. Abschn. 5.4.4) blieb ein signifikanter Anteil des Gesamtproteins unlöslich und wurde daher vor der eigentlichen Immunpräzipitation durch Zentrifugation abgetrennt. Das Tyrosinphosphorylungsmuster in dieser unlöslichen Fraktion wurde nach Auftrennung der Pellet-Proteine (unlöslich unter diesen Solubilisierungsbedingungen) untersucht. Das Signalmuster im Western Blot mit dem Antikörper PY 99 ähnelte dem Muster in Western Blots mit Gesamtkernhüllenproben (Abb.4). Die massenspektrometrisch Analyse von Proteinen in den korrespondierenden Gelstücken (Tab.3) zeigte, daß einige der zuvor identifizierten Kandidatenproteine nur partiell solubilisiert worden waren und auch im Pellet als prominente Proteinspots auftraten. Zwei Proteine (LAP 2 $\alpha$  und Nup 98) wurden in dieser Pellet-Fraktion erstmals als Kandidaten für Tyrosinkinasesubstrate identifiziert. Dies kann auf die geringere Komplexität des Präparats im Vergleich zum Gesamt-Kernhüllenpräparat zurückzuführen sein, aufgrund welcher an den Positionen der Proteine im BAC-Gel keine Proteingemische mehr vorliegen.

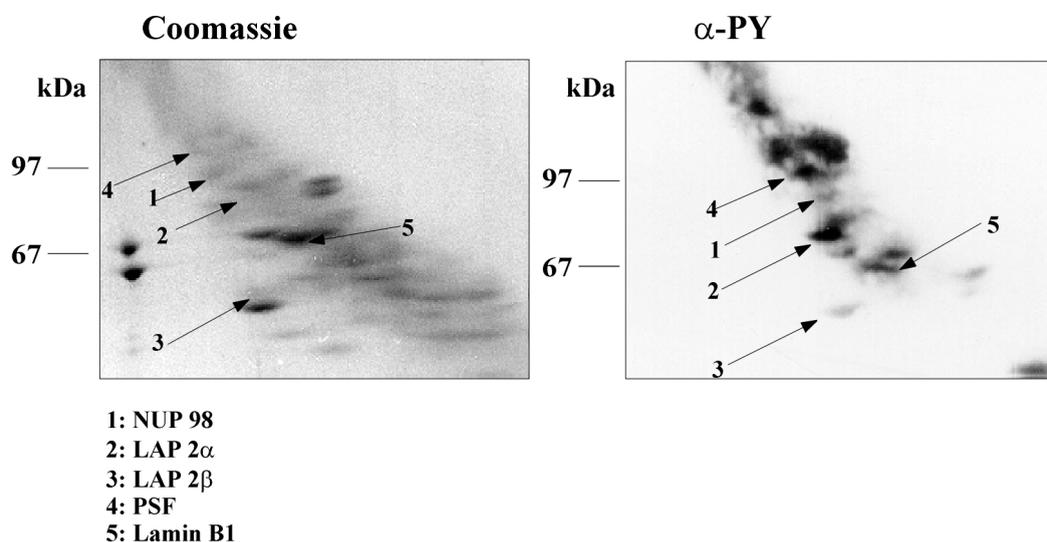


Abb.4: Korrelation zwischen anti-PY Western Blot-Signalen und Coomassiefärbung nach BAC-gelelektrophoretischer Auftrennung der unter IP-Puffer-Bedingungen unlöslichen Kernhüllenfraktion. Die Positionen der identifizierten Proteine sind indiziert (Daten dazu in Tab. 3). Die Proben stammen aus Kernmembranen nach *in vitro*-Phosphorylierung in Gegenwart von Pervanadat.

**NUP 98** ist ein Protein aus dem Kernporenkomplex und ist vermutlich mit dessen nukleoplasmatischer Korbstruktur assoziiert (Sukegawa et al., 1993),

**LAP 2 $\alpha$**  ist ein Kernlamina-assoziiertes Protein, das mit Lamin A/C und B-Typ-Laminen interagieren kann (Dechat et al., 1998; s. Abschn.1.2.1.4).

Zudem wurden einige weitere Proteine identifiziert, die auch schon im Gesamtpräparat gefunden wurden, z. B. LAP 2 $\beta$  und Lamin B1. Phosphotyrosinhaltige Peptide wurden in den Verdauungsmischen allerdings nicht identifiziert.

Das Auftreten dieser Proteine in der unlöslichen Fraktion nach Detergenz-Extraktion der Kernhüllen ist ein deutliches Indiz dafür, daß die Interaktionen zwischen Kernhülle und Lamina so stark sind, daß signifikante Mengen integraler Membranproteine nicht unter mit einer Immunpräzipitation kompatiblen Bedingungen quantitativ solubilisierbar sind.

### ***3.1.1.5 Zusammenfassung der Befunde zur Tyrosinphosphorylierung von Kernhüllenproteinen aus Neuro 2a-Zellen***

Eine Detektion und Sequenzierung von tyrosinphosphorylierten Peptiden gelang in keinem der Experimente mit Kernhüllenpräparaten. Die Befunde der Immunpräzipitationsexperimente mit anti-Phosphotyrosinantikörpern unter stringenten Bedingungen nach Steigerung des Phosphotyrosingehalts der Kernhüllenproteine *in vitro* stellen aufgrund der Spezifität des experimentellen Ansatzes die beste Evidenz für die Identifizierung von Proteinen aus dem Kernhüllenpräparat als mutmaßliche Tyrosinkinase-Substrate dar. Keines der hier identifizierten Proteine ist ein integrales Membranprotein.

Trotz uneinheitlicher Ergebnisse aus verschiedenen experimentellen Ansätzen besteht die vergleichsweise stärkste Evidenz für Lamin B1 als ein Tyrosinkinasesubstrat der Kernhülle. Die Implikationen einer möglichen Tyrosinphosphorylierung der in den verschiedenen Experimenten identifizierten Kandidatenproteine werden in Abschnitt 4 diskutiert. Diese Aussagen stehen aber unter dem grundsätzlichen Vorbehalt, daß andere Proteine auf den Positionen der Kandidatenproteine komigrieren und die anti-Phosphotyrosin-Immunreaktivität hervorrufen könnten.

Spot	Protein (MW in Da)	Peptidmassen in Da (theoretische Massen in Da)	abgedeckte Aminosäure-Reste	Peptidmassen in Da (theoretische Massen in Da)	abgedeckte Aminosäure-Reste	PSD-Sequenzen	totale Sequenz- abdeckung
1	<b>PTB-assoziiertes Splicing-Faktor</b> (76,1 kDa)  (NCBI Acc. #1709851, H. sapiens)	1036,5 (1036,2) 3148,0 (3147,4) 1649,3 (1649,9) 785,8 (785,9) 1807,5 (1808,2) 1964,1 (1964,2) 1251,6 (1252,4) 1143,0 (1143,3) 2639,8 (2639,9) 885,6 (886,0) 1099,2 (1099,3) 1245,1 (1245,5) 1479,8 (1480,7)	200-211 243-271 272-286 280-286 299-314 299-315 320-330 366-376 377-399 400-407 400-409 414-425 431-443	3598,9 (3598,1) 2135,4 (2135,4) 1762,2 (1762,9) 1576,9 (1577,8) 830,3 (829,9)  846,3 (845,9) 1054,2 (1054,1) 869,0 (869,0) 1341,1 (1341,5) 2444,5 (2443,7)	431-462 444-462 480-493 494-505 542-547 543-548 567-572 592-599 600-609 667-681 667-693	FTHAALISVR (366-376)	36%
2	<b>hypothetisches 16 kDa- Protein</b> (58,7 kDa)  (NCBI Acc. #110073)	1712,6 (1712,9)* 1672,7 (1671,8) 888,0 (887,0) 1142,8 (1142,3) 1455,5 (1454,7) 959,3 (959,0) 1245,4 (1244,4)	2-18 22-34 35-41 35-43 44-55 83-90 83-92 149-159 95-111 115-126 129-136 137-159 160-173 360-371	807,4 (807,9) 1047,9 (1047,2) 1609,9 (1609,9) 1206,6 (1206,3) 1220,0 (1220,4) 1246,2 (1246,4)	96-101 203-211 223-237 250-261 238-249 274-285	ASYVAPLTAQPATYR (223-237)	≥11%
3	<b>Lamin B2</b> (67,4 kDa)  NCBI Acc. #228591	1955,2 (1954,3) 1344,1 (1344,5) 1016,4 (1016,1) 2461,5 (2460,7) 1408,8 (1408,6/ 1408,7)	149-159 95-111 115-126 129-136 137-159 160-173 360-371	994,6 (995,1) 1046,1 (1046,2) 2051,5 (2051,3) 2009,8 (2009,2) 974,7 (974,0/ 975,0) 1642,0 (1641,9) 1591,5 (1590,7) 1193,0 (1193,4) 1216,9 (1216,4) 3078,5 (3079,0)	202-209 234-242 264-282 269-286 372-379 471-478 380-394 417-430 461-470 471-480 562-587	ASLPHPHAGPATPLSPTR (2-18)*  KREGELTVAQGR (115-126)  SVFEEEVV (202-209)	48%

4	<b>Lamin B1</b> (66 kDa)  NCBInr Acc. #110630	1142,1 (1142,3)* 1541,2 (1539,7) 1167,9 (1168,3) 1672,6 (1671,8) 1076,8 (1076,3) 2333,1 (2331,5) 2545,4 (2544,8)  2049,8 (2049,3) 1251,7 (1251,4) 1408,4 (1407,6) 1045,5 (1046,1) 1273,5 (1274,6) 1117,5 (1118,2/ 1117,1)	1-11 12-27 16-27 31-43 44-52 53-72 53-74 159-182 75-92 81-91 81-92 93-101 102-112 159-168 534-543	1572,9 (1572,8) 1884,1 (1883,2) 1398,0 (1397,5)  874,0 (874,0) 1827,7 (1828,0) 972,8 (972,1) 1084,9 (1085,3) <sup>f</sup> 1691,2 (1690,9) 909,9 (910,0) <sup>f</sup> 1734,7 (1734,0) 1819,5 (1819,1) 1343,4 (1343,5) 1216,2 (1216,4) 3664,2 (3664,9) 940,4 (941,0)	169-183 183-198 199-209 224-235 228-235 228-242 236-242 243-251 260-272 292-298 299-313 317-331 380-390 381-390 419-453 572-579	ATATPPVQQQR (1-11)*  LAQALHEMR (243-251) <sup>f</sup>  FKAEHDQLLNYAK (260-272)  EELMESR (292-298)*  FHQQGAPR (572-579)	56%
5	<b>Non-POU domain</b> <b>Octamer binding</b> <b>protein</b> <b>(NonO)</b> (54 kDa)  NCBInr Acc. #1083440	1248,7 (1248,4)  899,8 (900,1) 938,6 (939,1) 1086,5 (1086,3/ 1086,2) 2669,6 (2669,0) 886,1 (886,0) 1469,2 (1468,7) 1417,2 (1418,6/ 1418,7) 1231,5 (1231,4)	99-109 145-155 102-109 110-117 129-137 246-253 156-178 179-186 179-192 187-200 374-385 193-204	1829,7 (1831,0) 830,0 (830,0)  985,8 (986,1) 1457,9 (1457,6) 1330,0 (1329,4) 1485,9 (1485,6) 1637,5 (1637,8) 1480,9 (1480,6) 3242,7 (3243,7)	275-289 321-326 322-327 321-327 340-350 341-350 341-351 367-380 368-380 437-469	GIVEFSGKPAAR (193-204)	35%
6	<b>heat shock cognate 71</b> <b>kDa</b> (73 kDa)  NCBInr Acc. #347019, Rattus norvegicus	1228,2 (1228,3) 1487,9 (1487,6) 764,9 (764,9) 1179,4 (1180,3) 1982,9 (1982,2) 1199,5 (1199,4) 1692,5 (1691,7) 1392,6 (1391,7) 988,8 (989,1)	26-36 37-49 103-108 103-112 138-155 160-171 221-236 237-247 231-258 510-517	1480,8 (1480,7/ 1481,7) 1838,4 (1838,1) 1081,6 (1081,2) 1566,5 (1565,8) 2775,9 (2775,0) 1017,6 (1017,2) 1805,2 (1805,0)	562-569 300-311 329-342 326-342 349-357 349-361 424-447 501-509 510-524	MQEAEKYEADKQR (518-533)	36%

Tab.1: Kandidatenproteine für Tyrosinkinase substrate in der Kernhülle I: Korrelation zwischen Western Blot und Coomassiefärbung im Total-Kernhüllpräparat (vgl. Abb. 2), Die Aminosäuresequenzen wurden nach Fragmentierung der Peptide durch Post Source Decay (PSD) in der MALDI-MS ermittelt.  
\* azetylierter N-Terminus, <sup>f</sup> oxidiertes Methionin

Spot/Bande	Protein	Peptidmasse in Da (theoretisch)	AS - Reste	% Treffer aller Peptide	PSD-Sequenz	totale Sequenz - abdeckung
1	P 160 Myb-binding protein 150 kDa sptrembl 035851	805,4 (804,9) 806,5 (807,0) 885,9 (886,1) 988,0 (988,1) 1129,8 (1130,2) 1200,7 (1200,3) 1236,5 (1236,5) 1262,3 (1262,4) 1359,6 (1359,6) 1435,8 (1435,6) 1488,9 (1489,8) 1467,5 (1467,7) 1519,0 (1518,8) 1538,0 (1537,8) 1553,5 (1553,8) 1646,7 (1647,0) 1699,7 (1700,0) 1711,3 (1711,0) 1742,4 (1741,9) 1777,3 (1777,9) 1826,7 (1826,2) 1890,3 (1890,2) 2158,7 (2158,4)	1150-1156 55-60 75-83 803-810 466-475 431-441 51-60 497-506 1132-1141 556-568 816-826 972-984 259-271 943-555 61-73 258-271 985-999 163-177 1116-1151 528-542 875-888 330-345 32-48	92 %	QHFSFPLDDR (497-506)  LYDLYWQAMR (1132-1141)	19 %
2	hnRNP U 90 kDa SwissProt P 00839 (H. sapiens)	820,3 (820,0) 998,2 (998,2) 1649,5 (1648,8) 1699,5 (1698,9) 1716,6 (1715,9) 1984,1 (1984,3) 2033,1 (2032,3) 2729,7 (2731,0) 2918,6 (2921,3) 2937,2 (2935,4) 2984,8 (2987,3) 3663,7 (3660,9)	547-553 313-320 557-571 237-249 187-204 656-673 287-305 11-28 492-517 664-688 226-249 778-806	87 %	NFILDQTNVSAQAQR (557-571)  GYFEYIEENKYSR (237-249)	28 %
3	Lamin B# 68 kDa	941,1 (941,1) 1181,6 (1181,4) 1253,1 (1252,4) 1391,4 (1392,6) 1441,6 (1440,6) 1820,7 (1821,0) 2122,9 (2121,4) 2334,6 (2332,5) 2546,3 (2545,8)	571-578 291-299 80-90 398-410 571-582 331-344 456-473 52-71 158-181	50 %		21 %
4	Histon H3 SwissProt P16106 15 kDa	788,8 (789,0) 871,9 (872,0) 1033,2 (1033,2) 1336,3 (1336,5) 1811,4 (1811,2)	65-70 124-130 42-50 74-84 118-132		EIAQDFKTDLR (74-84)	30 %

5	Cortactin SwissProt Q60598	873,8 (874,0) 962,6 (962,0) 1032,1 (1031,2) 1107,1 (1106,2) 1174,6 (1174,3) 1195,4 (1194,3) 1254,4 (1253,4) 1269,9 (1269,4) 1332,2 (1331,4) 1443,5 (1442,7) 1503,0 (1502,6) 1571,4 (1570,8) 1642,6 (1642,9) 1686,7 (1686,9) 1709,1 (1707,8) 1898,4 (1898,1) 2007,2 (2006,1) 2263,0 (2262,5) 2279,2 (2278,5) <sup>§</sup> 2307,1 (2306,5) 2533,0 (2533,7) 2559,7 (2559,8) 2621,7 (2620,9) 2637,7 (2636,9) <sup>§</sup> 2655,2 (2655,9) 2706,4 (2706,0) 3264,7 (3262,5) 3765,4 (3763,8) 3795,9 (3796,0)	390-396 369-366 71-79 98-107 382-390 236-245 88-97 231-242 380-389 534-545 280-292 534-546 58-70 305-319 153-168 320-336 352-367 125-144 125-144 273-292 172-193 209-230 125-147 125-147 58-79 347-368 347-373 4-38 1-35	85 %	YGLFPANYVELRQ (534-546)	53 %
---	-------------------------------	---	--	------	----------------------------	------

**Tab.2:** Kandidatenproteine für Tyrosinkinasesubstrate in der Kernhülle II: Proteine, die nach der anti-Phosphotyrosin-Immunpräzipitation identifiziert wurden (vgl. Abb.3)

<sup>§</sup> oxidiertes Methionin

<sup>#</sup> diese Zuordnung wurde trotz der nicht völlig eindeutigen Auswertung des Massenspektrums aufgenommen, da der Vergleich mit den Spektren von Lamin B1 - Verdauungsmischen eine deutliche Übereinstimmung mit den charakteristischen Peptidsignalen bestand.

Spot	Protein	Peptidmasse in Da (theoretisch)	AS-Reste	Peptidmasse in Da (theoretisch)	AS-Reste	Peptidmasse in Da (theoretisch)	AS-Reste	PSD-Sequenz	totale Sequenz-Abdeckung
1	NUP 98	806,4 (806,0)	898-904	1499,7 (1499,7)	864-875	1499,7 (1499,7)	864-875	EYRPETGSWVFK (864-875)	14 %
	98 kDa (SwissProt Acc. P25823, Rattus norvegicus)	911,6 (912,1) 1009,8 (1009,1) 1051,6 (1051,1) 1323,8 (1324,5) 1495,9 (1496,7)*	551-558 204-211 842-850 163-174 757-769	1642,7 (1641,8) 1737,7 (1736,9) 1866,1 (1865,1) 2243,4 (2242,5)	185-197 198-211 198-212 797-816			EVIVYVDDNQKPPVGEGLNR (797-816)	
2	LAP 2α	1019,2 (1018,2)	665-673	1723,5 (1724,1)*	651-664	1723,5 (1724,1)*	651-664	YGVNPTTVGTTR (126-138)	27 %
	NCBI nr U39078 75 kDa	1185,8 (1185,4) 1331,9 (1331,5) 1380,9 (1380,6) 1431,9 (1431,5) 1663,6 (1662,8) 1699,2 (1698,9)	302-313 126-138 364-376 500-510 535-549 18-33	1782,3 (1781,9) 1967,2 (1968,1) 2454,5 (2544,7) 2643,8 (2643,1)	410-425 620-636 61-85 511-534			VVEEEWQQIDR (500-510)	
3	LAP 2β	744,8 (744,4)	97-102	1698,5 (1697,9)	18-33	1698,5 (1697,9)	18-33	VETSQHFR (261-268)	70 %
	NCBI nr U39074 50 kDa	806,6 (806,3) 858,1 (858,5) 876,6 (876,5) 944,3 (944,4) 1003,8 (1003,7) 1014,5 (1014,6) 1075,9 (1075,6) 1147,9 (1147,6) 1196,2 (1195,7) 1235,3 (1235,5) 1287,8 (1287,7) 1331,0 (1330,7) 1388,8 (1388,7) 1431,9 (1431,9) 1634,0 (1633,8)	150-156 339-345 401-407 381-388 261-268 338-345 148-156 286-296 49-60 61-71 259-268 126-138 368-380 139-149 157-172	1744,1 (1743,9) 1787,2 (1786,9) 1826,2 (1826,1) 2003,1 (2003,9) 2543,9 (2544,4) 2701,9 (2701,3) 2928,7 (2929,6) 3380,1 (3380,6) 3538,5 (3536,7) 3708,8 (3706,0) 3798,7 (3797,0)	269-285 303-318 86-102 346-363 61-85 103-125 297-322 216-247 215-247 140-172 1-34			KRVETSQHFR (259-268) YVNPGLVGTTR (126-138) GAAGRPLESDFR (368-380) SSTPLPVSSSAENR (157-172) SELVANNVTLPAGEQR (18-33) HASSILPITEFSDIIR (303-318) GPPDFSSDEEREPTPLVLSGAS VGR (61-85)	

Tab.3: Kandidatenproteine für Tyrosinkinasesubstrate in der Kernhülle III: Korrelation zwischen anti-Phosphotyrosin-Western Blot und Coomassiefärbung im Gel für die Triton-unlösliche Fraktion (vgl. Abb.4)

### **3.1.2 Analyse der Tyrosinphosphorylierung von Proteinen im Kernhüllenpräparat aus Ratten-Pheochromocytoma PC 12-Zellen**

Die PC12-Zellen wurden in die experimentelle Strategie zur Identifizierung tyrosinphosphorylierter Kernhüllenproteine einbezogen, da für diese Zellen im Gegensatz zu den Neuro 2a-Zellen mit der Stimulierbarkeit durch NGF ein Tyrosinkinase-Signalweg über die Rezeptortyrosinkinase TrkA bekannt ist. Dies bot die Möglichkeit, zu untersuchen, ob Kernhüllenproteine an diesem Signalweg beteiligt sind und möglicherweise nukleäre Effektoren des Signal darstellen.

#### ***3.1.2.1 Charakterisierung des Kernhüllenpräparates***

Die Kernhüllenpräparation aus PC 12-Zellen wurde mit Hilfe von Western Blots für die Verteilung der Markerproteine auf die verschiedenen Subfraktionen im Laufe der Präparation Lamin A/C (Kernlamina) und Ribophorin (endoplasmatisches Retikulum) und durch die massenspektrometrische Identifizierung einiger Proteine nach BAC-Gelelektrophorese und in-Gel-Verdau charakterisiert (Abb.5, Tab.4). Aufgrund der Präparationsbedingungen (insbesondere des Einsatzes von Detergenz) war eine Kontamination des Präparates durch Plasmamembranproteine unwahrscheinlich.

Bei der Charakterisierung der Kernhüllenpräparation zeigte sich im Western Blot verschiedener Fraktionen der Präparation, daß die Hauptmenge an Ribophorin, einem Markerprotein für ER-Membranen, nicht mit der Kernhüllenfraktion angereichert wurde, sondern in einer distinkten Mikrosomenfraktion. Dies deutet darauf hin, daß die Hauptmenge an ER-Proteinen abgetrennt werden konnte, auch wenn kleinere Mengen an Ribophorin aufgrund der Lokalisation in der äußeren Kernmembran in der proteinchemischen Analyse des Kernhüllenpräparates erwartet und auch detektiert wurden. Das Gesamt-Kernhüllenpräparat enthielt aber größere Mengen von Proteinen, die der Kernmatrix zuzuordnen sind, als die vergleichbare Präparation aus Neuroblastoma Neuro 2a-Zellen. Vor allem wurden Proteine aus der Familie der heterogenen Ribonukleoproteine (hnRNPs) in größeren Mengen als in den Kernhüllenpräparaten aus Neuro 2a-Zellen gefunden.

Darüberhinaus enthielt die Kernhüllenpräparation der Proteinbestimmung nach Bradford (1976) zufolge reproduzierbar noch ca. 30% des Gesamtproteins der Kernpräparationen, ein deutlich

höherer Anteil als bei Neuro 2a-Zellen (zur Diskussion s. Abschn.4). Im Triton X-100-Extrakt waren integrale Membranproteine deutlich angereichert. Überwiegend waren dies Proteine des Endoplasmatischen Retikulums (ER), mitochondriale Membranproteine sowie Proteine der Kernmembran und der Kernlamina. Die Proteinzusammensetzung des Triton-Extraktes, soweit massenspektrometrisch identifiziert, ähnelte damit stark dem vergleichbaren Präparat aus Neuro 2a-Zellen. LAP 2 $\beta$  erscheint als weniger prominenter Proteinspot im Vergleich zum Präparat aus den Neuro-2a-Zellen.

Nach NGF-Stimulation wurde das NGF-induzierbare Protein VGF gefunden. Dies stellte eine interne Kontrolle dafür dar, daß die Zellen auf NGF reagiert hatten. VGF ist ein sekretorisches Protein, daß in large dense core vesicles lokalisiert und aus diesen exozytotisch ausgeschüttet wird (Possenti et al., 1989). Jedoch zeigt sich nach der zitierten Veröffentlichung auch eine perinukleäre Färbung in immunzytochemischen Experimenten mit anti-VGF-Antikörpern, eventuell durch neu synthetisiertes Protein, das sich noch im ER befindet.

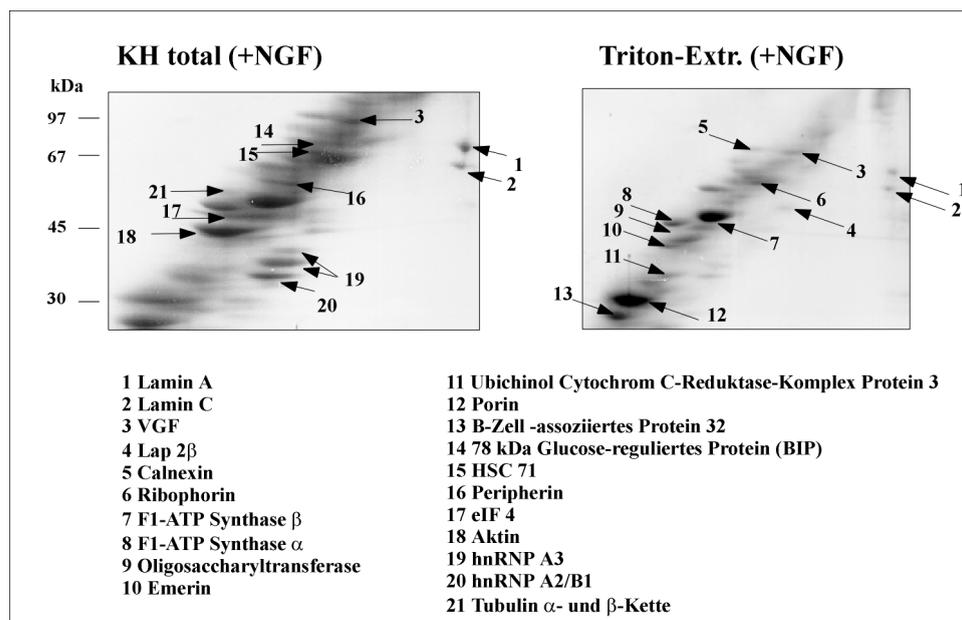


Abb. 5: Identifizierung von Proteinen im Kernhüllenpräparat von Pheochromocytoma PC 12-Zellen: Coomassiefärbung BAC-gelelektrophoretisch aufgetrennter Proteine im Gesamt-Kernhüllenpräparat (KH total) und in der Triton X-100-extrahierbaren Fraktion nach Hochsalz-Waschen (1M NaCl) des Gesamt-Kernhüllenpräparats (Triton-Extr.). Die nach tryptischer Spaltung im Gel und MALDI-MS-Analyse der Peptidgemische identifizierten Proteine sind aufgeführt (s. auch Tab.4). Beide dargestellten Gele enthalten Proben aus NGF-stimulierten Zellen. Ein Indikator für die Stimulierung ist die Anwesenheit des NGF-induzierten Proteins VGF (Spot 3, s.auch Abb.6).

### **3.1.2.2 *in vivo* Tyrosinphosphorylierung von Proteinen im Kernhüllenpräparat von PC 12-Zellen**

Die Tyrosinphosphorylierung von Proteinen im Kernhüllenpräparat und im Detergenz-/Salzextrakt wurde durch anti-Phosphotyrosin Western Blots nach BAC-gelelektrophoretischer Auftrennung der Proteine nachgewiesen. Die Identifizierung von Proteinen als *in vivo* tyrosinphosphoryliert anhand des Vergleichs der Position von Western Blot-Signalen mit Coomassie-gefärbten Proteinspots war aufgrund der scheinbar größeren Komplexität des Präparates aus PC 12-Zellen im Vergleich zu dem aus Neuro 2a-Zellen unsicher.

### **3.1.2.3 *Dynamik der Tyrosinphosphorylierung von Kernhüllenproteinen nach Stimulierung der PC 12-Zellen mit Nervenwachstumsfaktor (NGF)***

Zur Stimulierung der PC12-Zellen wurde rekombinanter Nervenwachstumsfaktor verwendet. Die Zellen reagierten aus nicht bekannten Gründen nicht in jedem Experiment auf die Anwesenheit von NGF im Kulturmedium. Die in diesem Abschnitt gezeigten Daten stammen aus einem Experiment, bei dem die stimulierten Zellen eindeutige morphologische Unterschiede (Neuriten-ähnliche Ausläufer) gegenüber den Kontrollzellen aufwiesen. In Experimenten, bei denen die Ausbildung dieser Unterschiede ausblieb, war weder in der indirekten Immunfluoreszenz noch im anti-Phosphotyrosin-Western Blot ein Unterschied in der Protein-Tyrosinphosphorylierung nachweisbar.

Die Stimulierung der Zellen durch NGF im gezeigten Experiment ließ sich im Kernmembranpräparat selbst durch die selektive Präsenz des NGF-induzierten Proteins VGF, das nur in Präparaten aus stimulierten Zellen identifizierbar war, nachweisen.

In Western Blots mit dem anti-Phosphotyrosinantikörper RC 20 zeigte sich im Total-Kernhüllenpräparat ein Anstieg der Tyrosinphosphorylierung nach NGF-Stimulierung vor allem bei einer Dreiergruppe von Proteinen (Abb.6). Die Proteine in den korrespondierenden Gelstücken wurden mittels MALDI-MS nach in-Gel-Verdau als heterogene Ribonukleoproteine (hnRNP) A2/B1 (GenPept Acc. #3329498 für das Homolog aus *Mus musculus*, kein Eintrag für *Rattus norvegicus*) und A3 (#1710627 für das Homolog aus *Homo sapiens*, kein Eintrag für *R. norvegicus*) identifiziert. Im Tritonextrakt der Kernhülle wurde ein korrespondierendes Western Blot Signal für eines der Proteine nach NGF-Stimulierung gefunden. Mittels MALDI-MS wie

oben wurde das Protein als hnRNP A2/B1 (s. Tab.4) identifiziert. Dieses Protein ist ein bekanntes Tyrosinkinase-Substrat, für das *in vitro* eine Änderung der RNA-Bindungsspezifität nach Tyrosinphosphorylierung gefunden wurde (Pype et al., 1994). Die Tyrosinphosphorylierung dieser Proteine infolge der NGF-Stimulierung der PC12-Zellen könnte mit der Regulation alternativen mRNA-Spleißens vermittelt durch das NGF-Signal (Prentice et al., 1987; Smith et al., 1997) in Zusammenhang stehen.

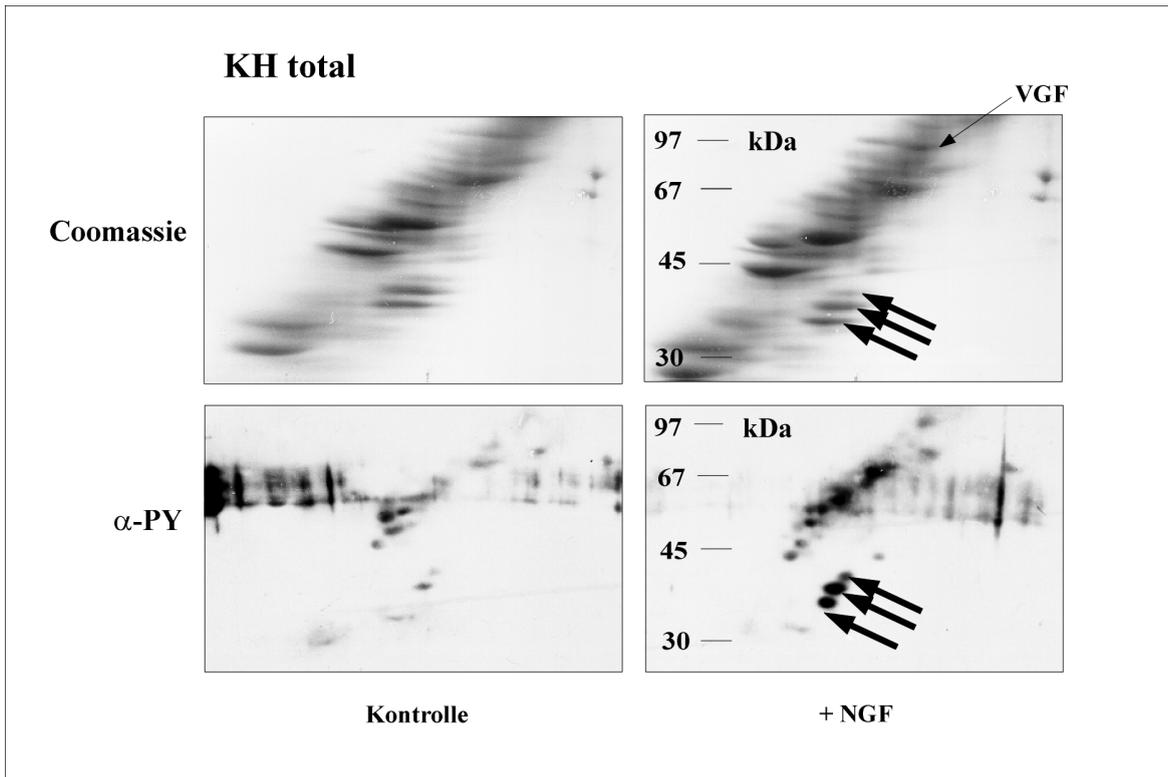


Abb.6: Dynamik der Tyrosinphosphorylierung im Kernhüllenpräparat aus PC 12-Zellen im Vergleich des Präparates aus unstimulierten Zellen vs. NGF-stimulierten Zellen. Die Induktion von VGF ist gekennzeichnet. Im anti-PY Western Blot sind zahlreiche Unterschiede zwischen Kontrollzustand und stimulierter Situation erkennbar. Die drei Pfeile in der Abbildung der anti-Phosphotyrosin- (anti-PY-) Western Blots indizieren hnRNP A2/B1 und hnRNP A3, (vgl. Abb. 5 und Tab. 4 zur Identifizierung), deren Tyrosinphosphorylierung stark angestiegen ist. Die übrigen Differenzsignale ließen sich wegen der Komplexität des Präparates nicht sicher zuordnen.

**Tab. 4:** Proteine im KH-Präparat aus PC 12 - Zellen (vgl. Abb. 5)

Spot/Protein	Peptidmasse gemessen (theoretisch) in Da	AS-Reste	% aller Peptide der Suche	PSD-sequenz	% der Protein-Sequenz
<b>3</b>  <b>VEGF</b>  SwissProt P20156 68 kDa	902,5 (902,4) 919,6 (919,5) 1011,0 (1010,5) 1051,7 (1051,5) 1088,9 (1088,5) 1097,7 (1097,6) 1173,5 (1173,6) 1208,6 (1208,6) 1303,8 (1303,6) 1335,2 (1334,6) 1383,4 (1382,7) 1408,7 (1408,7) 1495,3 (1494,8) 1548,3 (1547,7) 1565,7 (1564,8) 1916,8 (1915,9) 2035,1 (2035,1) 2193,1 (2192,0) 2708,0 (2707,1) 2864,0 (2863,2) 2301,1 (2300,3) <sup>FS</sup>	319-326 500-508 423-431 211-219 353-361 198-207 577-586 271-281 587-597 180-191 299-311 285-298 565-576 362-373 284-298 65-81 466-483 403-422 375-400 374-400 1-19	<b>95 %</b>	LLQQGLAQVEAGR (299-311)	<b>40 %</b>
<b>4</b>  <b>Lamina-associated protein 2β<sup>S</sup></b>  SwissProt Q62733 50 kDa innere Kernmembran (integral)	912,2 (912,5) 1000,1 (999,5) 1045,1 (1045,5) 1155,3 (1155,6) 1195,8 (1195,7) 1330,1 (1330,7) 1389,0 (1388,7) 1554,3 (1553,9) 1634,1 (1633,8) 1698,4 (1697,9) 1787,2 (1786,9) 2020,4 (2020,0) <sup>F</sup> 2543,6 (2543,2)	239-247 261-268 148-156 260-268 49-60 126-138 368-380 320-333 157-172 18-33 303-318 346-363 61-85	<b>73 %</b>		<b>38 %</b>
<b>5</b>  <b>Calnexin<sup>S</sup></b>  67 kDa SwissProt P35565 ER-Membran (integral)	791,2 (791,4) <sup>S</sup> 814,3 (814,4) 1088,3 (1088,5) 1299,8 (1299,6) 1508,8 (1507,8) 1568,3 (1569,8) 1771,0 (1770,8) 1864,4 (1863,9) 2235,0 (2236,2)	120-126 222-228 573-581 284-293 49-62 222-234 63-78 402-416 573-590	<b>62 %</b>		<b>15 %</b>
<b>6</b>  <b>Ribophorin I Precursor<sup>S</sup></b>  SwissProt P07153 68 kDa ER-Membran (integral)	873,1 (873,0) 964,0 (964,2) 1272,9 (1273,5) 1406,7 (1406,5) 1480,4 (1480,7) 1621,5 (1621,8) 1648,3 (1647,9) 1991,3 (1991,2) 2568,5 (2568,9)	591-597 79-87 523-534 378-389 280-292 47-63 64-78 353-369 390-411	<b>69 %</b>		<b>19 %</b>
<b>7</b>  <b>F1-ATP-Synthase β</b>  54 kDa SwissProt P10719 Mitochondrien-Membran (integral)	1038,4 (1938,6) 1262,5 (1262,6) 1385,2 (1385,7) 1406,2 (1406,7) 1439,0 (1439,8) 1458,0 (1457,8) 1601,4 (1601,8) 1618,2 (1617,8) <sup>S</sup> 1650,7 (1650,9) 1815,9 (1815,9) 1832,4 (1831,9) <sup>S</sup> 1922,0 (1922,0) 1987,7 (1988,0) 2060,7 (2061,0) 2266,3 (2266,1) 2298,6 (2298,1) <sup>S</sup> 2675,9 (2675,4) 2691,5 (2691,4) <sup>S</sup> 3026,9 (3026,6) 3353,1 (3352,6) <sup>S</sup> 3714,5 (3714,9) 3843,6 (3843,0)	134-143 110-121 144-155 226-239 282-294 213-225 265-279 265-279 95-109 407-422 407-422 295-310 388-406 242-259 325-345 325-345 433-456 433-456 162-188 490-519 352-387 351-387	<b>88%</b>		<b>59 %</b>

8	<b>ATP-Synthase <math>\alpha</math></b>  SwissProt P15999 58 kDa  Mitochondrien-Membran (integral)	723,1 (723,4) 815,4 (815,4) 860,3 (860,5) 892,3 (892,5) 1000,2 (1000,6) 1026,1 (1026,6) 1287,3 (1287,7) 1439,6 (1438,9) 1554,5 (1553,7) 1575,9 (1576,0) 1611,0 (1610,9) 1684,3 (1683,8) <sup>s</sup> 2309,8 (2310,3) 2339,0 (2338,2)	166-172 198-204 313-319 425-431 64-73 185-194 296-306 393-406 325-337 162-176 124-139 79-93 232-251 432-453	<b>88 %</b>		<b>31 %</b>
9	<b>Oligosaccharyltransferase<sup>s</sup></b>  49 kDa sprottremblnew D1024552 ( <i>M. musculus</i> ) ER-Membran (integral)	666,1 (666,3) 746,2 (746,2) 842,0 (841,5) 888,1 (888,5) 1022,3 (1022,5) 1046,3 (1046,6) 1169,9 (1169,7) 1269,9 (1269,8) 1671,7 (1671,8) 1836,5 (1835,9) 1960,4 (1960,0)	377-381 345-350 56-62 293-300 43-50 175-183 225-235 32-42 268-282 330-344 366-381	<b>85 %</b>		<b>24 %</b>
10	<b>Emerin</b>  30 kDa sptrreml Q63190 innere Kermembran (integral)	890,0 (890,5) 1213,7 (1213,6) 1342,5 (1342,6) 1947,3 (1946,8) 2051,4 (2051,0)	152-158 37-45 138-149 90-104 120-137	<b>45 %</b>	DYNDYYEESYLTR (90-104)  RPGTSLVDADDTFHHQV R (120-137)	<b>24 %</b>
11	<b>Ubichinol-Cytochrom C Reduktase Komplex Core Protein 2</b>  50 kDa SwissProt P32551 Mitochondrien-Membran- assoziiert	1000,4 (1000,6) 1131,7 (1131,6) 1218,3 (1218,7) 1567,4 (1566,7) 1743,4 (1742,9) 1928,5 (1927,1) 2180,4 (2179,1)	147-154 162-171 231-240 183-195 70-83 42-59 199-216	<b>78 %</b>	EVAEQFLNIR (231-240)	<b>20 %</b>
13	<b>Prohibitin (BAP-32)</b>  SwissProt P24142 ( <i>Mus musculus</i> ) 29 kDa  ER-Membran (integral)	720,2 (720,4) 1058,2 (1058,5) 1149,2 (1149,6) 1185,9 (1185,7) 1397,3 (1396,8) 1460,8 (1460,7) 1607,3 (1606,8) 1999,0 (1998,1)	36-41 187-195 134-143 84-93 94-105 106-117 240-253 220-239	<b>45 %</b>		<b>34 %</b>
14	<b>78 kDa glucose regulated protein<sup>s</sup> (BIP)</b>  78 kDa SwissProt P20029 ER-Membran (integral)	1191,4 (1191,6) 1460,4 (1460,8) 1566,2 (1566,8) 1889,1 (1888,0) 1934,0 (1934,0) 2148,9 (2149,0) 3162,8 (3163,6) <sup>s</sup>	465-474 354-367 61-74 165-181 475-492 307-324 533-558	<b>58 %</b>		<b>18 %</b>
15	<b>heat shock cognate 71 kDa</b>  71 kDa SwissProt P08109 divers, Nukleus-assoziert beschrieben	1199,2 (1199,7) 1254,2 (1254,6) 1278,3 (1277,6) 1391,6 (1391,7) 1481,4 (1481,8) 1692,1 (1691,7) 1804,6 (1804,9) 1982,8 (1982,0) 2514,9 (2514,3) 2774,9 (2774,3) 2889,2 (2889,4) 2911,9 (2911,5) 2998,0 (2997,5)	160-171 78-88 574-583 237-247 329-342 221-236 510-524 138-155 470-493 424-447 78-102 194-220 273-299	<b>57 %</b>		<b>35 %</b>

16	<b>Peripherin</b>  SwissProt P21807 u.a. nuklear, Kernmatrix	760,7 (760,8) 776,5 (776,8) 788,1 (787,9) 829,1 (830,0) 868,5 (869,0) 873,6 (874,0) 902,1 (902,0) 925,5 (926,0) 987,0 (986,2) 1004,8 (1005,2) 1053,5 (1054,2) 1060,7 (1061,1) 1095,9 (1096,1) 1119,5 (1119,2) 1145,1 (1145,2) 1189,9 (1189,35) 1311,7 (1311,4) 1343,2 (1343,5) 1627,7 (1627,8) 1679,8 (1679,8) 1972,8 (1973,2) <sup>#</sup> 2011,3 (2011,6)	124-130 180-185 209-214 151-157 105-111 328-335 160-166 228-234 150-157 364-371 227-234 178-185 288-297 45-56 96-104 114-123 286-297 188-198 186-198 418-432 75-91 339-357	<b>74 %</b>	FLEQQNAALR (114-123)  TTVPEVEPPQDSHSR (418-432)	<b>37 %</b>
17	<b>Eukaryotic Initiation Factor 4</b>  47 kDa SwissProt P38919 ( <i>H. Sapiens</i> ) Nukleoplasma	995,5 (996,2) 1085,2 (1086,2) 1160,1 (1160,4) 1191,2 (1191,3) 1256,8 (1257,5) 1598,5 (1598,8) 1828,6 (1829,1) 2141,5 (2141,5) 2419,4 (2419,6) <sup>§</sup> 2786,6 (2786,3) <sup>§</sup>	253-260 199-206 330-339 77-88 173-182 152-166 52-67 52-70 26-46 207-231	<b>46 %</b>	QFFVAVER (253-260)	<b>31 %</b>
18	<b>Actin</b>  Isoform nicht zuzuordnen diverse Lokalisation	795,4 (795,5) 976,2 (976,5) 1131,9 (1132,5) 1171,0 (1171,6) 1516,2 (1515,8) 1790,8 (1790,9) 1954,0 (1954,1) 2214,4 (2215,1) 2231,2 (2231,1) <sup>§</sup> 3183,8 (3183,6)	329-335 19-28 197-206 40-50 85-95 239-254 96-113 292-312 292-312 148-177	<b>59 %</b>		<b>36 %</b>
19	<b>hnRNP A3</b>  40 kDa SwissProt P51991 ( <i>H. sapiens</i> ) Nukleoplasma/Kernmatrix	1167,7 (1168,5) 1234,2 (1234,6) 1250,1 (1250,6) <sup>§</sup> 1380,4 (1380,8) 1713,6 (1713,9) <sup>§</sup> 1770,5 (1770,9) 1806,2 (1806,8) 1910,8 (1910,8)	135-143 152-161 152-161 114-126 201-216 37-52 21-35 356-377	<b>67 %</b>	LFIGGLSFETDSDLR (37-52)  SSGSPYGGGYGSGGGSGG YSR (356-377)	<b>27 %</b>
20	<b>hnRNP A2/B1</b>  33 kDa SwissProt P22626 ( <i>H. sapiens</i> ) Nukleoplasma/Kernmatrix	1013,4 (1014,0) 1050,8 (1051,1) 1087,5 (1088,2) 1165,9 (1166,2) 1188,9 (1189,4) 1340,2 (1339,5) 1412,6 (1411,5) 1696,6 (1696,8) 1799,7 (1800,0) 1928,1 (1928,2)	204-213 130-137 39-46 121-129 138-147 100-112 174-185 154-168 23-38 22-38	<b>69 %</b>		<b>33 %</b>
21	<b>Tubulin <math>\alpha</math></b>  50 kDa pir 223556  <b>Tubulin <math>\beta</math></b>  50 kDa SwissProt P05218 ( <i>M. musculus</i> )	1409,9 (1410,6) 1702,0 (1701,9) 1989,0 (1989,3) 2007,7 (2008,1) 2330,8 (2330,5) 1346,2 (2346,5) <sup>§</sup> 2409,7 (2409,7)	85-96 65-79 80-96 41-60 403-422 403-422 244-264	<b>total: 74 %</b>		<b>21 % (<math>\alpha</math>)  19 % (<math>\beta</math>)</b>

<sup>#</sup> acrylamidiertes Cystein, <sup>§</sup> oxidiertes Methionin

<sup>§</sup> Diese Treffer wurden aufgenommen, da trotz des Fehlen von Fragmentierungsdaten signifikante Treffer mit mehreren Suchprogrammen gemäß deren Kriterien erzielt wurden und.

### **3.1.3 Immunzytochemische Analyse der Tyrosinphosphorylierung am Zellkern**

Die proteinchemischen Experimente, die in den vorangegangenen Abschnitten dargestellt wurden, lieferten starke Hinweise auf die Existenz tyrosinphosphorylierter Proteine in der Zellkernhülle. Etliche der als Kandidaten für Tyrosinphosphorylierung identifizierten Proteine wie NonO, PSF, hnRNP A2/B1 und andere mehr sind aber keine integralen Membranproteine, sondern vermutlich Kernmatrix-assoziiert. Daher wurde mit der indirekten Immunfluoreszenz an isolierten Zellkernen unter Verwendung eines anti-Phosphotyrosin-Antikörpers ein weitgehend von den vorangegangenen Experimenten unabhängiger Nachweis dafür geführt, daß in der Kernmembran selbst tyrosinphosphorylierte Proteine vorkommen. Dabei wurde die indirekte Immunfluoreszenz unter Verwendung des anti-LAP 2 $\beta$ -Antikörper R1 als Markersignal für die innere Kernmembran genutzt. Die Experimente wurden an Neuro 2a-Zellen, die für 20 min. in Gegenwart des Tyrosinphosphatase Inhibitors Kalium-(2,2'-Bipyridin)-oxobisperoxovanadat (V) (BiPy) kultiviert worden waren, und daraus isolierten Kernen durchgeführt, außerdem an 615-Zellen (stabil mit dem NGF-Rezeptor TrkA transfizierte PC12-Zellen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. B. Hempstead, New York) und daraus isolierten Kernen in Abhängigkeit der Stimulierung der Zellen mit NGF. Diese Zellen wurden hier untransfizierten PC12-Zellen vorgezogen, da sie sich auf den Objektträgern im Vergleich zu den untransfizierten Zellen besser kultivieren und reproduzierbarer durch NGF stimulieren ließen. Die Bedienung des konfokalen Laserscanning-Mikroskops erfolgte durch Dr. Torsten Schöneberg, Institut für Pharmakologie, FU Berlin.

#### ***3.1.3.1 Konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie von Neuro 2A-Zellen***

An Neuro 2A-Zellen wurde immunzytochemisch mit indirekter Immunfluoreszenz versucht, Hinweise auf Tyrosinphosphorylierung im Zellkern zu finden. Dabei wurde der primäre Antikörper PY 99 eingesetzt.

Die indirekte Immunfluoreszenz an unstimulierten Zellen ergab aufgrund geringer Signalintensität kein auswertbares Markierungsmuster. Durch Zusatz von 10-100  $\mu$ M des Tyrosinphosphataseinhibitors BiPy zum Zellkulturmedium (20 min. Inkubation) wurde der Phosphotyrosin-Gehalt in Proteinen von Neuro 2a-Zellen dramatisch gesteigert, vor allem

kolokalisiert mit Zytosol und Plasmamembran, aber auch mit den Zellkernen. Die Tyrosinphosphorylierung am Zellkern ließ sich visualisieren, wenn die Immunfluoreszenz an isolierten Kernen durchgeführt wurde (Abb.7). In den Kernen aus BiPy-stimulierten Zellen war die Tyrosinphosphorylierung drastisch gegenüber dem Kontrollzustand erhöht. Markiert war vor allem das Nukleoplasma, ausgespart waren aber die Nukleoli. In der Doppelmarkierung anti-PY/anti-LAP 2 $\beta$  (anti-PY: Texas red-Markierung, rot, Anregung bei  $\lambda=595$  nm, Emission bei  $\lambda=615$  nm; anti-LAP 2 $\beta$ : Cy<sup>2</sup>-Markierung, grün, Anregung bei  $\lambda=494$  nm, Emission bei  $\lambda=518$  nm; Überlappung der Markierungen: gelb) zeigte sich eine partielle Überlappung der Signale. Das heißt, daß Proteine der inneren Kernmembran eine anti-Phosphotyrosin-Immunreaktivität zeigen.

### ***3.1.3.2 Konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie von 615-Zellen***

An Trk A-überexprimierenden PC 12-Zellen (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. B. Hempstead, New York) wurde unter Kontrollbedingungen und nach NGF-Stimulierung die Tyrosinphosphorylierung immunzytochemisch mit dem anti-Phosphotyrosin-Antikörper PY 99 untersucht. Diese Zell-Linie wurde gewählt, da die Zellen im Gegensatz zu Wildtyp-PC12-Zellen problemlos auf Poly-L-Lysin-beschichteten Objektträgern kultiviert werden konnten und darüberhinaus reproduzierbar unter dramatischen morphologischen Veränderungen auf den NGF-Stimulus reagierten.

Die Stimulierung der Zellen durch NGF führte zum Auswachsen Neuriten-ähnlicher Strukturen. Die Aktivierung des NGF-Rezeptors ließ eine Steigerung der Tyrosinphosphorylierung zellulärer Proteine erwarten.

Dieser Effekt wurde auch gefunden: in fixierten Gesamtzellen am auffälligsten an der Plasmamembran und in den Ausläufern der Zellen, jeweils in einer Cluster-artigen Verteilung (Abb.8). Bei der Immunfluoreszenz mit isolierten Kernen zeigte sich bei Kernen aus stimulierten Zellen gegenüber denen aus Kontrollzellen eine Steigerung des Tyrosinphosphorylierungs-Signals vor allem an diskreten Strukturen, evtl. assoziiert mit der äußeren Kernmembran oder mit Resten des Endoplasmatischen Retikulums. Die anti-Phosphotyrosin-Immunfluoreszenz war jeweils in Gegenwart von 10 mM Phenylphosphat während der Inkubation mit dem primären Antikörper bis auf das Hintergrundsignal des sekundären Antikörpers verdrängbar.

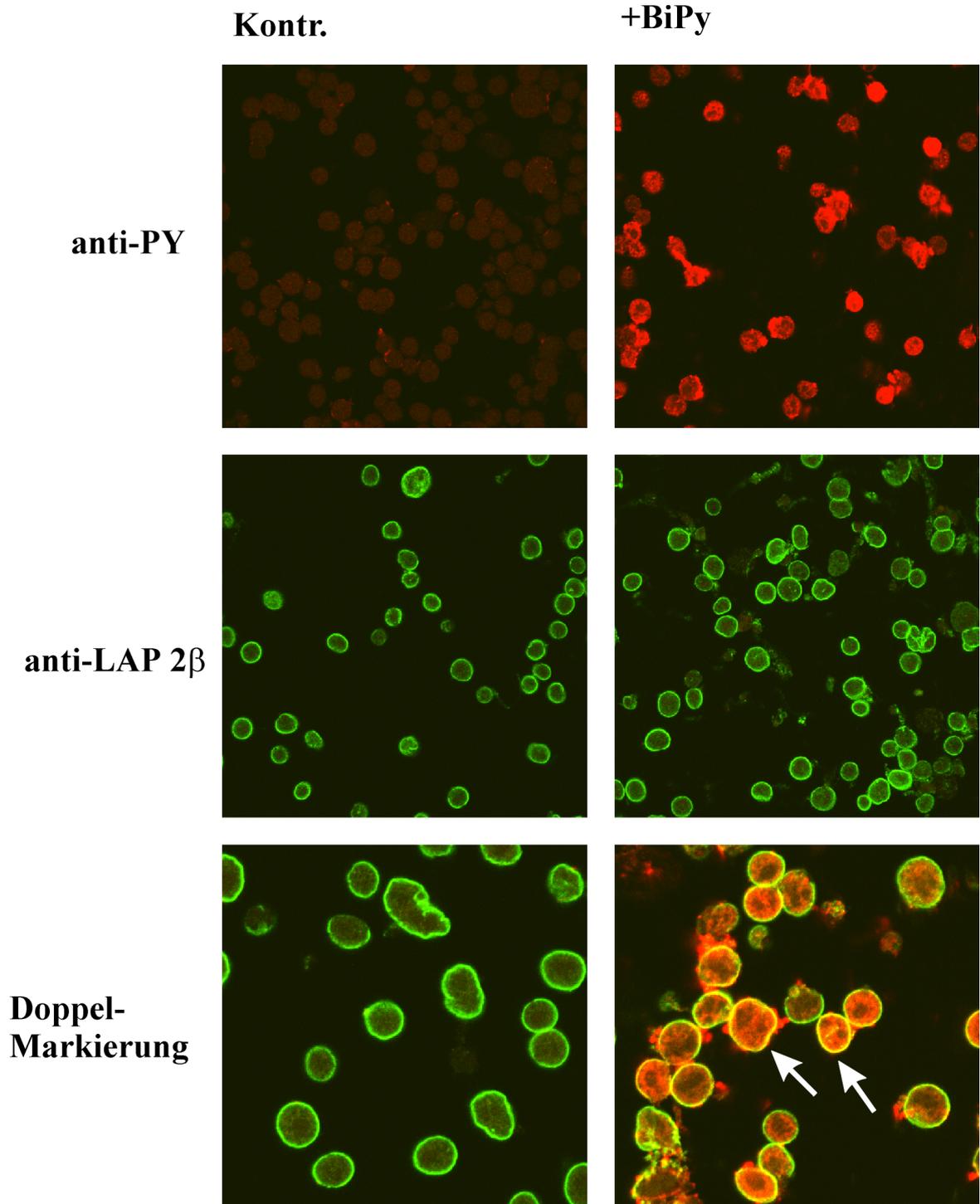


Abb.7: konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit den Antikörpern anti-Phosphotyrosin (anti-PY, Rotfärbung) und anti-LAP 2β/ε (Grünfärbung) an isolierten Zellkernen aus Neuro 2a-Zellen im Kontrollzustand (Kontr.) oder nach Stimulation der Zellen mit BiPy. 63fache Vergrößerung, die Abbildung der Doppelmarkierung ist zoomt dargestellt. Regionen, in denen die anti-PY-Immunreaktivität und die anti-LAP 2β/ε-Immunreaktivität überlappen, sind an der Gelbfärbung erkennbar (Pfeil).

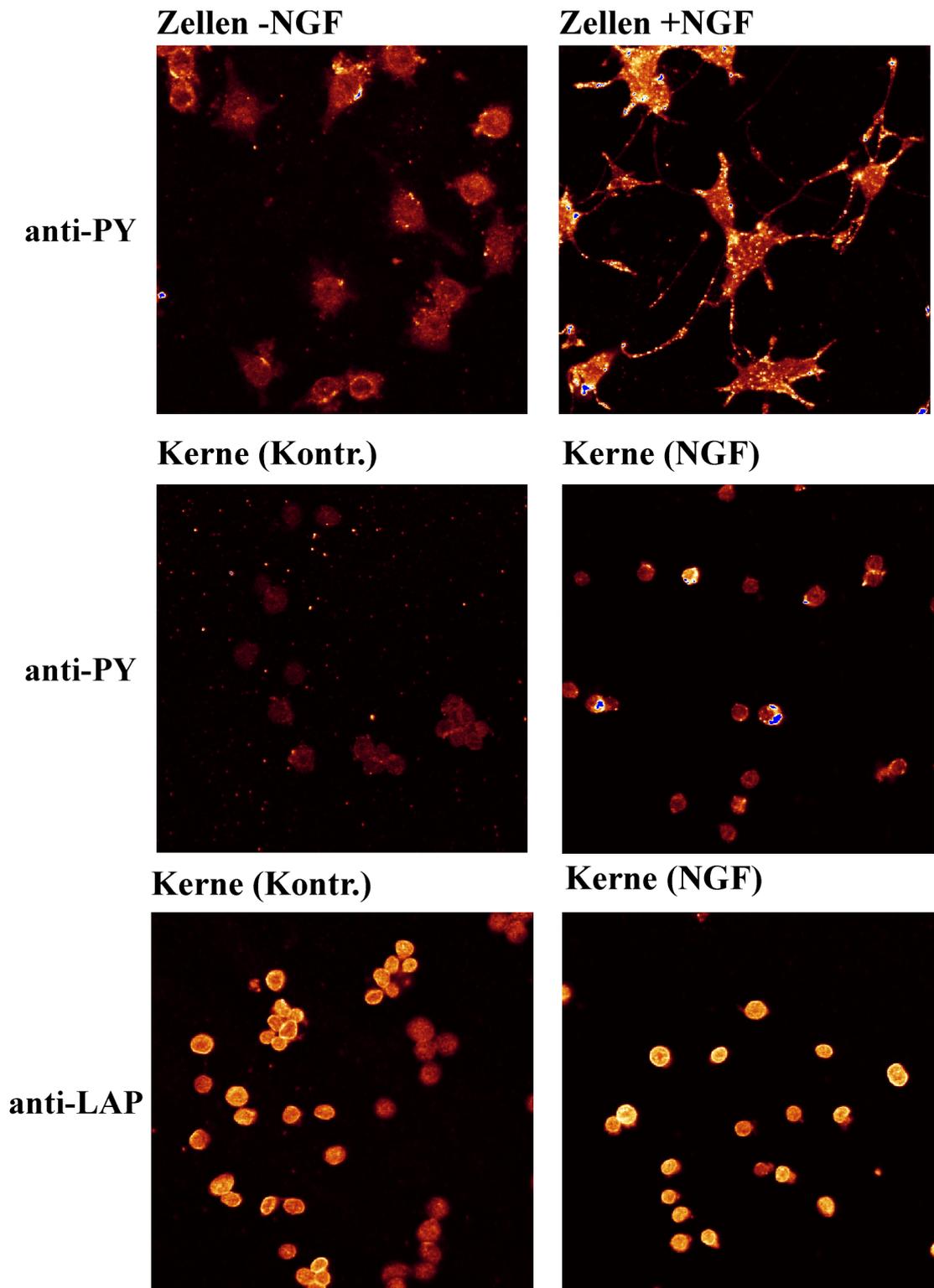


Abb.8 Konfokale Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit 615-Zellen unter Verwendung der Antikörper anti-Phosphotyrosin (anti-PY) für Zellen und isolierte Kerne und R1 [anti-LAP 2 $\beta$ / $\epsilon$  (anti-LAP)] an isolierten Kernen. Das anti-Phosphotyrosin-Signal nach NGF-Stimulus erscheint clusterartig über die gesamte Zelle einschließlich der entstandenen Ausläufer verteilt. Bei den isolierten Kernen taucht in der Präparation aus NGF-stimulierten Zellen vor allem an der Kernperipherie konzentrierte Immunfluoreszenz auf. Der R1-Antikörper (anti-LAP 2 $\beta$ / $\epsilon$ ) "färbt" die innere Kernmembran, es ist aber auch Immunreaktivität im Kerninneren zu sehen. 63fache Vergrößerung.

## 3.2 Ein neuer methodischer Ansatz zur spezifischen Detektion von Phosphotyrosin-haltigen Peptiden

Aufgrund der fehlgeschlagenen Detektion von tyrosinphosphorylierten Peptiden in den Verdauungsmischen nach proteolytischer Spaltung der Tyrosinkinasesubstrat-Kandidatenproteine wurde nach alternativen Methoden gesucht, die mutmaßlich in den Gemischen enthaltenen tyrosinphosphorylierten Proteine spezifisch zu detektieren. Es wurde eine Methode entwickelt, um diese Peptide spezifisch anhand ihrer charakteristischen UV-Absorption während der Trennung über ein Mikro-HPLC zu finden.

### 3.2.1 Differenzabsorption Tyrosin versus Phosphotyrosin

In einem Vorversuch zeigte sich, daß sich das Absorptionsmaximum im UV-Bereich von Phosphotyrosin im Vergleich zu dem des Tyrosins (unter HPLC-Puffer-Bedingungen) von  $\lambda=280$  nm nach  $\lambda=270$  nm verschiebt. Bei der Trennung synthetischer tyrosinphosphorylierter und nicht-phosphorylierter Peptide mittels Mikro-HPLC unter Detektion der UV-Absorption bei drei Wellenlängen ( $\lambda=215$  nm, 270 nm, 280 nm) äußerte sich diese Verschiebung des Absorptionsmaximums in einer für das tyrosinphosphorylierte Peptid charakteristischen positiven Absorptionsdifferenz  $\Delta=A_{\lambda=270 \text{ nm}}-A_{\lambda=280 \text{ nm}}$  (Abb 9):

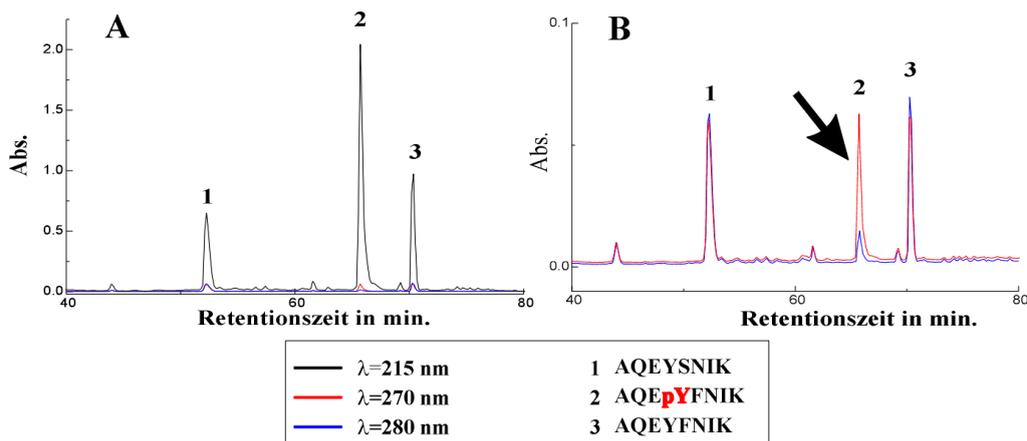


Abb.9: Mikro-HPLC-Trennung eines Gemisches der synthetischen Peptide (1) AQEYSNIK, (2) AQE<sup>p</sup>YFNIK und (3) AQEYFNIK unter paralleler Detektion der UV-Absorption bei  $\lambda=215$ , 270 und 280 nm. **A:** Vergleich der Absorption bei allen drei Wellenlängen, die Differenzen in der Absorption bei  $\lambda=215$  nm zwischen den Peptiden beruhen auf etwas unterschiedlichen Peptidmengen **B:** Vergleich der Absorption bei  $\lambda=270$  nm und  $\lambda=280$  nm. Beim tyrosinphosphorylierten Peptid (Pfeil) ist deutlich die charakteristische positive Absorptionsdifferenz  $\Delta=A_{\lambda=270 \text{ nm}}-A_{\lambda=280 \text{ nm}}$  erkennbar.

### **3.2.2 Anwendung der Dreiwellenlängen-Detektion auf ein Peptidgemisch nach proteolytischer Spaltung im Gel eines tyrosinphosphorylierten integralen Membranproteins**

Als Untersuchungsgegenstand in einem weiteren Testversuch zur Einschätzung des möglichen Nutzens des Effektes für die spezifische Detektion tyrosinphosphorylierter Peptide in einem komplexen wurde die  $\beta$ -Untereinheit des nikotinischen Azetylcholinrezeptors aus *Torpedo californica* gewählt. Analysiert wurden Proben nach *in vitro*-Tyrosinphosphorylierung oder Dephosphorylierung rezeptorreicher Membranen oder im nativen Zustand nach einfacher SDS-PAGE nach Laemmli, tryptischem in-Gel-Verdau und Mikro-HPLC mit dem SMART-System. Die geschätzte Ausgangs-Proteinmenge (nach Coomassie-Färbung) betrug 10  $\mu\text{g}$  ( $\cong$  200 picomol) Untereinheit. Die  $\beta$ -Untereinheit des Rezeptors trägt eine einzige Tyrosinphosphorylierungsstelle, Y 355 (Wagner et al., 1991). Diese Phosphorylierungsstelle ist beim "nativen" Rezeptor nach der Präparation rezeptorreicher Membranen etwa zu 50 % besetzt, der Phosphorylierungsgrad kann durch *in vitro*-Phosphorylierung nach Hopfield et al., 1988, auf 100 % gesteigert werden (Hopfield et al., 1988; Dreger et al., 1997) oder durch Dephosphorylierung *in vitro* durch eine Protein-Tyrosin-Phosphatase auf ca. 10 % gesenkt werden.

Bei der Detektion der Absorptionen bei  $\lambda=270$  nm versus  $\lambda=280$  nm wurde bei der Trennung der tryptischen Peptide aus der phosphorylierten Untereinheit ein Peptidsignal bei einer Retentionszeit von etwa 62 min. gefunden, das dem geforderten Kriterium einer positiven Differenz aus der Absorption bei 270 nm gegenüber der bei 280 nm entsprach (Abb.10.). Dieses Peptidsignal fehlte in der HPLC-Trennung der Peptide aus der dephosphorylierten Untereinheit, wie aus dem Vergleich der Differenzspektren nach  $\Delta=A_{\lambda=270 \text{ nm}}-A_{\lambda=280 \text{ nm}}$  für die phosphorylierte bzw. dephosphorylierte Untereinheit hervorgeht (Abb.10).

Die Absorptionsdifferenz war auch in der nativen Untereinheit deutlich detektierbar (Daten nicht gezeigt). Mittels MALDI-MS der korrespondierenden HPLC-Fraktion aus der phosphorylierten Untereinheit konnte das Phosphopeptid A351NDEpYFIR358 detektiert und sequenziert werden (Abb.10).

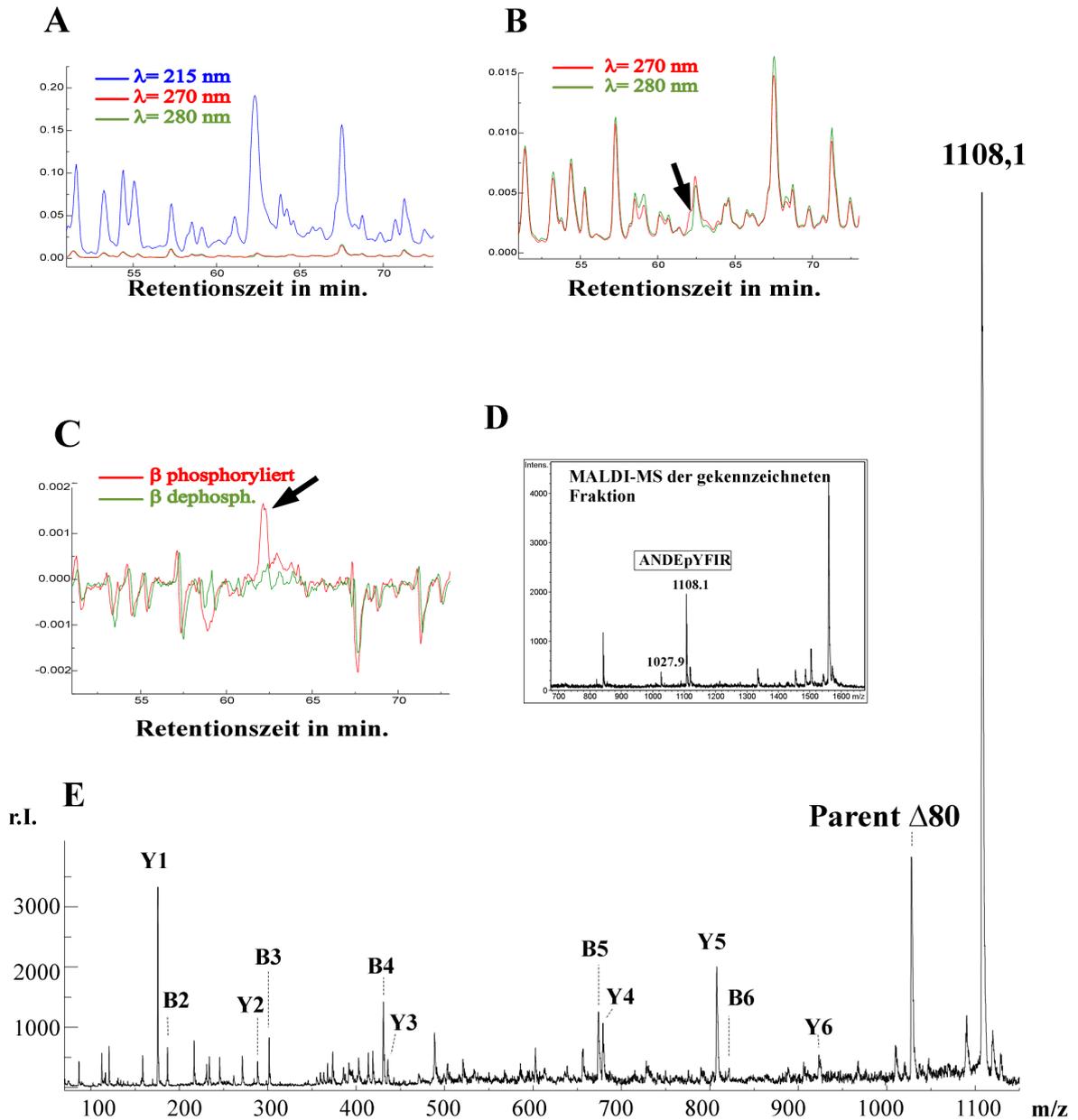


Abb.10: Anwendung der Dreiwellenlängen-Detektion zur Identifizierung eines tyrosinphosphorylierten Peptids aus der  $\beta$ -Untereinheit des nAChR aus *T. californica* nach in-Gel-Verdau nach Auftrennung rezeptorreicher Membranen durch SDS-PAGE. **A:** Chromatogramm bei Detektion aller drei Wellenlängen, **B:** Vergleich der Absorption bei 270 bzw 280 nm, **C:** Vergleich der Substraktionspektren gemäß  $\Delta = A_{\lambda=270 \text{ nm}} - A_{\lambda=280 \text{ nm}}$  für Peptide aus der phosphorylierten bzw. durch *Yersinia*-Tyrosinphosphatase dephosphorylierten Untereinheit. Die Kandidatenfraktion ist jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet. **D:** MALDI-Massenspektrum der gekennzeichneten Fraktion im Reflektormodus. Deutlich ist die Abspaltung von  $\text{PO}_3^-$ , die charakteristisch für Phosphopeptide ist, erkennbar. Das Peptid wurde durch Post source decay fragmentiert und sequenziert. Die Sequenz lautet ANDEpYFIR, **E:** Fragmentationenspektrum, Y – Ionen entstammen dem C – Terminus, B – Ionen dem N – Terminus.

### **3.2.3 Anwendung der Methode auf Tyrosinkinase-Substrate aus der Kernhülle**

Bei der Auftrennung von tryptischen Peptidgemischen aus in-Gel-verdauten Kernhüllenproteinen aus Neuro 2a-Zellen wurden keine Phosphotyrosin-spezifischen Absorptionssignale gefunden. Aufgrund der geringen Menge aufgetrennten Materials lag allerdings die Intensität der Absorption bei 270 bzw. 280 nm nahe am Grundrauschen des Detektors, so daß das Scheitern der Detektion möglicher diagnostischer Signale auch apparative Gründe gehabt haben könnte. Kritische Faktoren für die Anwendbarkeit der Methode sind vermutlich die Menge an Ausgangsmaterial, die Stöchiometrie einer möglichen Phosphorylierung und die mögliche Koelution weiterer Peptide mit dem Phosphopeptid.

### **3.3 Analyse des Phosphorylierungsstatus eines integralen Membranproteins der Kernhülle: LAP 2 $\beta$**

Da in verschiedenen Experimenten Hinweise auf die Anwesenheit Serin-/Threonin-phosphorylierter Peptide in Verdaugemischen von LAP 2 $\beta$  gefunden worden waren, wurde unabhängig von einer möglichen Tyrosinphosphorylierung des Proteins versucht, den allgemeinen Phosphorylierungsstatus des Proteins zu charakterisieren. LAP 2 $\beta$  ist ein bekanntes Protein der inneren Kernmembran, das phosphorylierungsabhängig mit Laminen und Chromatin interagiert (Foisner und Gerace, 1993; s. Abschn. 1.2.1.4). Jedoch war noch keine Phosphorylierungsstelle des Proteins identifiziert worden.

Die Experimente wurden in Kooperation mit Dr. G. Neubauer, Protein & Peptidgruppe, EMBL Heidelberg, durchgeführt. Durch die Kooperation stand eine weitere massenspektrometrische Analysemethode, die Nanoelektrospray-MS auf einem Tripelquadrupol-Massenspektrometer, zur Verfügung. Diese Methode ermöglicht eine spezifische Detektion von Phosphopeptiden aus komplexen Peptidgemischen heraus (Carr et al., 1993, Wilm et al., 1996, Neubauer und Mann, 1999). Alle Nanoelektrospray-Messungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden von Dr. G. Neubauer durchgeführt.

### **3.3.1 Proteinpräparation, Identifizierung der Spleißvariante LAP 2ε**

Der Phosphorylierungsstatus von LAP 2β in der Interphase wurde mit massenspektrometrischen Methoden untersucht. LAP 2β wurde nach Kernhüllenpräparation aus Neuro 2a-Zellkernen (damit *per definitionem* zur Interphase) als deutlich separierter Proteinspot nach BAC-gelelektrophoretischer Trennung der Kernhüllenproteine identifiziert (Abb.11). Der R1-Antikörper, der gegen den C-Terminus der membranständigen LAP 2-Proteine gerichtet war, erkannte LAP 2β und LAP 2ε. Dies wurde abgesichert durch MALDI-MS-Identifizierung der korrespondierenden Proteinspots (Abb.11). LAP 2ε wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals auf Proteinebene identifiziert. Obwohl die Aufnahme eines Fragmentationenspektrums nicht gelang, lassen sich im Vergleich der Peptidmassenspektren von LAP 2β und LAP 2ε charakteristische Unterschiede erkennen:

1. Bei LAP 2ε fehlen die Peptide der Masse 1003,7 Da (AS-Reste 261-268 von LAP 2β) und 3380,6 Da (AS-Reste 216-247, siehe auch Tab. 3). Das ist konsistent mit der Sequenz von LAP 2ε, der die AS-Reste 221-260 von LAP 2β fehlen (Berger et al., 1996).

2. Als eines der prominentesten Peptidsignale im Spektrum von LAP 2ε erscheint das Peptid der Masse 1613,4 Da korrespondierend zu den AS-Resten 216-228. Diese Peptid stellt praktisch den "fusionierten" Teil der LAP 2β-Sequenz unter Deletion der Aminosäuren 221-260 von LAP 2β dar: Die Aminosäuren 216-220 von LAP 2ε sind identisch mit 216-220 von LAP 2β, 221-228 von LAP 2ε sind identisch mit 261-268 von LAP 2β.

Keine einzige Phosphorylierungsstelle von LAP 2β war zuvor identifiziert worden, obwohl eine Regulation durch Phosphorylierung zumindest zur Mitose hin nachgewiesen worden war (Foisner und Gerace, 1993). Über eine Interphase-Phosphorylierung des Proteins war bislang nichts bekannt. Im weiteren Verlaufe der Experimente zur vorliegenden Arbeit wurde daher der Phosphorylierungsstatus von LAP 2β detailliert untersucht.

Mit Hilfe der BAC-Gelelektrophorese konnten etwa 5-10 µg LAP 2β (nach Coomassie-Färbung im Gel) aus 500 µg Total-Kernmembranprotein isoliert werden. Für zweidimensionale Phosphopeptidkartierungs-Experimente wurden die BAC-Gele auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen geblottet.

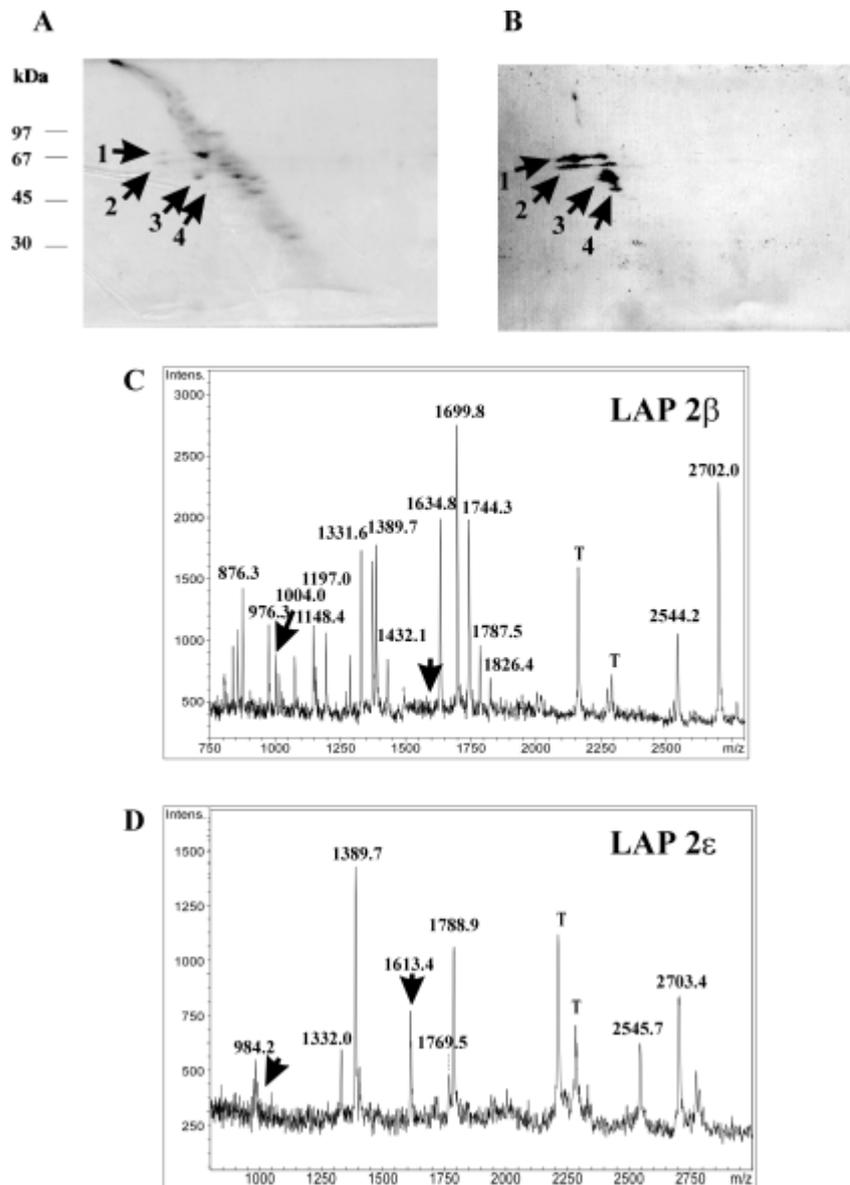


Abb. 11: Identifizierung der Proteine, die durch den R1-Antikörper erkannt werden, als LAP 2 $\beta$  und LAP 2 $\epsilon$ . **A:** Coomassie-gefärbtes BAC-Gel, **B:** Western Blot sequentiell mit dem Antikörper R1 und  $\alpha$ -Lamin A/C. Spot 1: Lamin A, Spot 2: Lamin C, Spot 3: LAP 2 $\beta$ , Spot 4: LAP 2 $\epsilon$ . **C:** Peptidmassenspektrum in der MALDI-MS nach in Gel-Verdau des Proteins in Spot 3, **D:** Peptidmassenspektrum nach in Gel-Verdau des Proteins in Spot 4. Peptidsignale, die für die Diskriminierung zwischen den beiden LAP 2-Spleißvarianten wichtig sind, wurden durch Pfeile markiert.

### 3.3.2 Identifizierung nativer Phosphorylierungsstellen von LAP 2β

#### *3.3.2.1 Detektion von Phosphopeptiden im Peptidgemisch*

Nach proteolytischer Spaltung im Gel und massenspektrometrischer Identifizierung von LAP 2β wurde das unfraktionierte Peptidgemisch mit Hilfe des Parent ion scans spezifisch für das generierte  $\text{PO}_3^-$  Fragment auf Phosphopeptide hin untersucht (Abb.12). Die detektierten Phosphopeptidmassen konnten mit den vorhergesagten Massen dreier tryptischer Peptide aus LAP 2β: 1713,4 Da ( $(\text{M}-2\text{H})^2=855,8$  Da) korreliert werden: korrespondierend zu den Aminosäureresten (AS) 157-172 mit einer Phosphoaminosäure, 2610,5 Da ( $(\text{M}-4\text{H})^4=651,6$  Da,  $(\text{M}-3\text{H})^3=869,3$  Da) korrespondierend zu AS 173-194 (monophosphoryliert), 2689,7 Da ( $(\text{M}-4\text{H})^4=671,4$  Da,  $(\text{M}-3\text{H})^3=895,6$  Da) korrespondierend zu AS 173-194 (diphosphoryliert), 2592,8 Da ( $(\text{M}-4\text{H})^4=647,2$  Da,  $(\text{M}-3\text{H})^3=863,2$  Da) korrespondierend zu 173-194 (monophosphoryliert, mit N-terminalem Pyro-Glutamatrest anstelle von Glutamin), 2673,1 Da ( $(\text{M}-4\text{H})^4=667,3$  Da,  $(\text{M}-3\text{H})^3=890,0$  Da) korrespondierend zu AS 173-194 (diphosphoryliert, mit N-terminalem Pyro-Glutamat), 2624,4 Da ( $(\text{M}-3\text{H})^3=873,4$  Da) korrespondierend zu AS 61-85 (monophosphoryliert), 2704,6 Da ( $(\text{M}-5\text{H})^5=540,0$  Da,  $(\text{M}-4\text{H})^4=675,0$  Da) korrespondierend zu AS 61-85 (diphosphoryliert).

Im Fall des Peptids 61-85 stimmte die ermittelte Sequenz nicht mit dem Datenbankeintrag für LAP 2β (GenBank U39074) von *Mus musculus* überein, sondern war identisch mit dem Datenbankeintrag für LAP 2β von *Rattus norvegicus*. Dieser Sequenzkonflikt deutet auf einen fehlerhaften Datenbankeintrag aufgrund eines Sequenzierungsfehlers in der cDNA-Sequenzierung bei der ursprünglichen Identifizierung des Proteins (Berger et al., 1996) hin.

In Experimenten mit mehr Ausgangsmaterial wurden Signale größerer Phosphopeptide beobachtet, deren Massen zu Phosphopeptiden korrespondierten, die die Sequenzen der anderen beobachteten Peptide mit einer überlesenen tryptischen Schnittstelle enthielten: 4226,3 Da ( $(\text{M}-7\text{H})^7=603,0$  Da,  $(\text{M}-6\text{H})^6=703,0$  Da) korrespondierend zu AS 157-194 (monophosphoryliert), 4306,3 Da ( $(\text{M}-7\text{H})^7=614,0$  Da) korrespondierend zu AS 157-194 (diphosphoryliert). Dies bedeutet, daß die beobachteten Phosphorylierungsstellen zumindest teilweise gemeinsam in phosphoryliertem Zustand vorliegen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt.

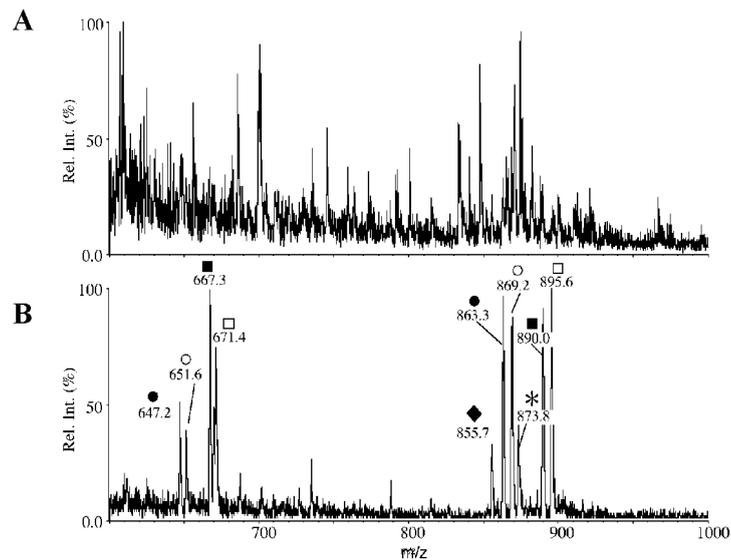


Abb.12: Phosphopeptid-spezifischer Parent ion scan. **A:** "Q1-Scan" des unfraktionierten Peptidgemisches nach in-Gel-Verdau von LAP 2 $\beta$  im Negativionen-Modus, **B:** Parent ion scan-Spektrum. Im Spektrum erscheinen die Peptide (Elternionen, "Parents"), die nach kollisionsinduzierter Dissoziation (CID) das 79 Da-Fragmentation ( $\text{PO}_3^-$ ) generieren. Die Molekülmassen sind 2624 Da (\*; AS 61-85, monophosphoryliert), 1713 Da ( $\blacklozenge$ ; AS 157-172, monophosphoryliert), 2610 Da ( $\blacksquare$ ; AS 173-197; monophosphoryliert), 2690 Da ( $\square$ ; AS 173-197; diphosphoryliert), 2593 Da ( $\bullet$ ; AS 172-197 Da; monophosphoryliert mit N-terminalem Pyroglutamat), 2673 Da ( $\circ$ ; AS 172-197 Da; diphosphoryliert mit N-terminalem Pyroglutamat). Vgl. auch Tab. 5 für die Ladungszustände.

### 3.3.2.2 Lokalisierung der Phosphorylierungsstellen

Nach Mikrofraktionierung des Peptidgemisches wurden die detektierten Phosphopeptide durch Kollisions-induzierte Dissoziation (CID) fragmentiert und identifiziert. Die Lokalisierung der Phosphorylierungsstellen gelang (Abb.13, siehe auch Tabelle 5). Als phosphoryliert wurden gefunden: Threonin (Thr) 74 im Peptid G61PPDFSSDEEREPTPVLGSGASVGR85 (der inkorrekte Datenbankeintrag für GenBank-Eintrag U39074 lautet G61PPDFSSDEERDATPVLGSGASVGR85, Thr 159 im Peptid S157STPLPVSSAENTR172, Serin (Ser) 176 und Ser 179 im Peptid Q173NGSNDSDRYSDNDEDKIELK. Die identifizierten Phosphorylierungsstellen liegen alle im Bereich der Aminosäuren 1-187 des Proteins. Dieser Bereich ist allen LAP 2-Spleißvarianten gemein (Harris et al., 1994, 1995, Berger et al., 1996). Die weiteren Implikationen dieser Befunde werden in Abschn.4 diskutiert.

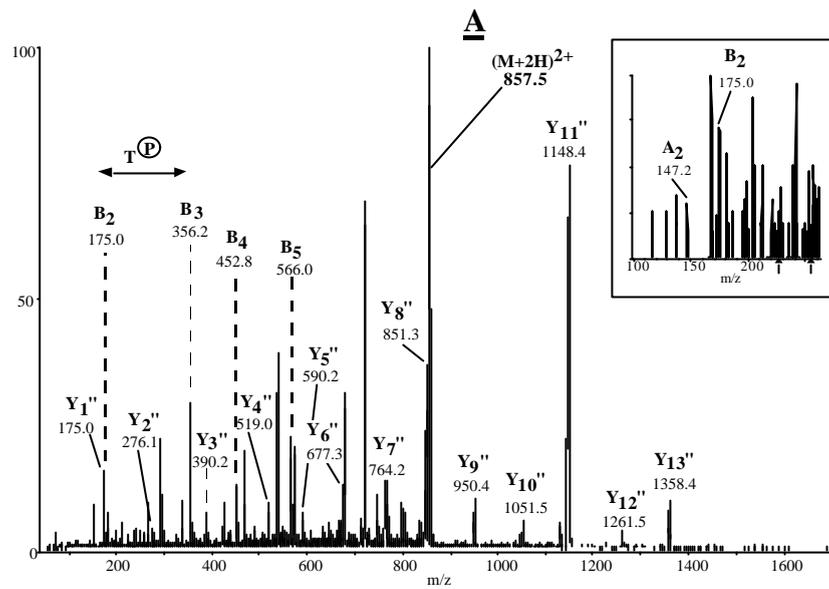


Abb.13A: CID – Fragmentationenspektrum des Phosphopeptids  $(M+2H)^{2+}=857,5$  Da (korrespondierend zu 1713 Da, AS-Reste 157-172, SSTPLPTVSSAENTR). Das vom C – Terminus abgeleitete  $Y''_{13}$  – Ion hat die erwartete Masse des nicht – phosphorylierten Fragmentes, die Phosphatgruppe muß innerhalb der drei N – terminalen Aminosäurereste lokalisiert sein. Die N – terminalen Ionen  $A_2$  und  $B_2$  liegen nicht – phosphoryliert vor,  $B_3$  phosphoryliert. Thr 159 ist die Phosphoaminosäure.

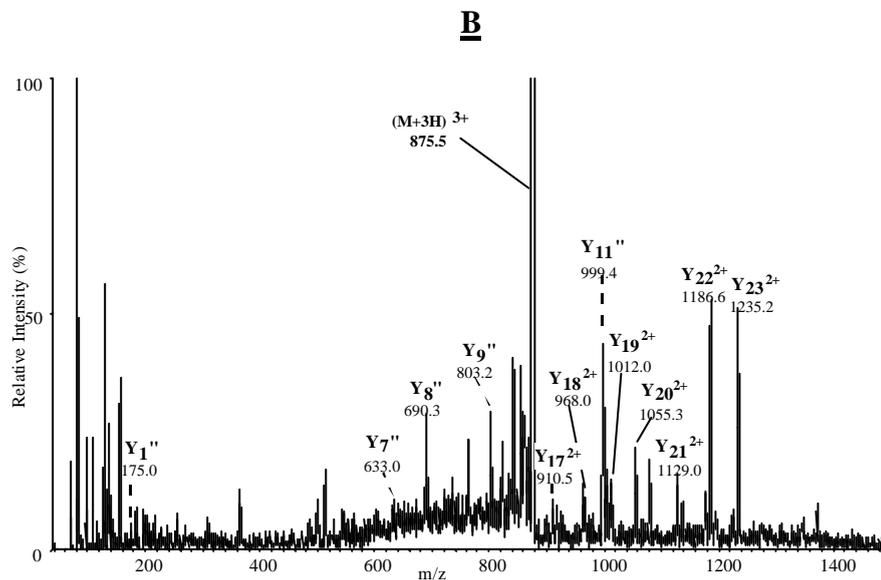


Abb. 13B: CID – Fragmentationenspektrum des Phosphopeptids  $(M+3H)^{3+}=875,5$  Da (korrespondierend zu 2624 Da, AS – Reste 61-85, GPPDFSSEEREPTVVGSGASVGR). Das C – terminal  $Y''_{11}$  – Fragmention liegt nicht – phosphoryliert vor, das (doppelt geladene)  $Y''_{17}$  – Ion im phosphorylierten Zustand. Die Phosphoaminosäure muß im Bereich von Glu 69 bis Thr 74 liegen. Thr ist innerhalb dieses Bereichs der einzige phosphorylierbare Aminosäurerest.

Peptid m/z	Peptidmasse unphosphoryliert in Da	Phosphopeptid- masse in Da	Sequenz/AS-Reste	Phosphoamino-säure
(M-2H) <sup>2-</sup> =855.8	1632,8	1713,4 (1P)	SSTPLPTVSSSAENR (157-172)	Thr 159
(M-4H) <sup>4-</sup> =651.6 (M-3H) <sup>3-</sup> =869.3	2529,5	2610,5 (1P)	QNGSNDSDRYSDNDEDSKIELK (173-194)	Ser 179
(M-4H) <sup>4-</sup> =671.4 (M-3H) <sup>3-</sup> =895.6	2529,5	2689,7 (2P)	QNGSNDSDRYSDNDEDSKIELK (173-194)	Ser 179, Ser 176
(M-4H) <sup>4-</sup> =647.2 (M-3H) <sup>3-</sup> =863.2	2512,6	2592,8 (1P)	pyENGNSDSDRYSDNDEDSKIELK (173-194)	Ser 179
(M-4H) <sup>4-</sup> =667.3 (M-3H) <sup>3-</sup> =890.0	2512,6	2673,1 (2P)	pyENGNSDSDRYSDNDEDSKIELK (173-194)	Ser 179, Ser 176
(M-3H) <sup>3-</sup> =873.4	2543,7	2624,4 (1P)	GPPDFSSDEEREPTPLVLSGASVGR (61-85)	Thr 74
(M-5H) <sup>5-</sup> =540.0 (M-4H) <sup>4-</sup> =675	2543,7	2704,6 (2P)	GPPDFSSDEEREPTPLVLSGASVGR (61-85)	Thr 74, zweite Phosphatgruppe unbekannt Kombination aus 1713,4 + 2610,5 mit überlesener Schnittstelle
(M-7H) <sup>7-</sup> =603.0 (M-6H) <sup>6-</sup> =703.0	4146,3	4226,3 (1P)	SSTPLPTVSSSAENRQNGSNDSDRYSDNDEDSKIELK (157-194)	Kombination aus 1713,4 + 2610,5 mit überlesener Schnittstelle
(M-7H) <sup>7-</sup> =614.0	4146,3	4306,3 (2P)	SSTPLPTVSSSAENRQNGSNDSDRYSDNDEDSKIELK (157-194)	

**Tab. 5:** Phosphopeptide von LAP 2 $\beta$  zur Interphase, detektiert im parent ion scan (vgl. Abb. 12) und sequenziert durch CID – Fragmentierung mit Nanoelektrospray-MS (gemessen von Dr. G. Neubauer, vgl. Abb. 13) oder sequenziert mit MALDI – Post source decay (vgl. Abb. 15). Phosphoamino-säuren sind fett gedruckt. pyE: Pyroglutamat.

### **3.3.3 Die identifizierten Phosphorylierungsstellen als Substrate endogener Kinasen**

Nach *in vitro*-Phosphorylierung des Kernhüllenpräparates mit endogenen Kinasen wurde der Phosphorylierungszustand von LAP 2 $\beta$  mit Hilfe zweidimensionaler Phosphopeptidkartierung untersucht. Bei dieser Strategie wurde zudem versucht, eine Kopplung der Methode mit MALDI-massenspektrometrischer Analyse der separierten Peptide zu ermöglichen. Die Phosphorylierungsreaktion wurde unter Bedingungen durchgeführt, die gleichzeitig für Serin-/Threonin- als auch für Tyrosinkinase geeignet waren. Die Autoradiographie der Dünnschichtplatte nach zweidimensionaler Peptidauftrennung zeigte ein komplexes Phosphopeptidmuster. Jedoch ist nicht davon auszugehen, daß jede Markierung einer eigenen Phosphorylierungsstelle zuzuordnen ist, da aufgrund des Auslassens potentieller Schnittstellen beim proteolytischen Verdau die gleiche Phosphorylierungsstelle in Peptiden unterschiedlicher Länge auftreten kann. Nach Rückgewinnung des Plattenmaterials an den mit einer  $^{32}\text{P}$ -Markierung korrelierenden Stelle und Elution der Peptide wurden in der MALDI-MS und der Nanoelektrospray-MS Phosphopeptide identifiziert (Abb.14). Durch MALDI-Sequenzierung wurde im Peptid von 2624 Da der Aminosäurerest Thr 74 als phosphoryliert gefunden und im Peptid von 2592 Da Ser 179 ebenso wie die vermutlich artifizielle Modifizierung des N-terminalen Glutamin zu Pyr-Glutamat (für 2624 Da, s. Abb.15). Die Lokalisierung der Phosphoamino Säuren mit Hilfe der MALDI-MS gelang aufgrund der geringen Signalintensität in den Fragmentationsspektren nur durch den direkten Vergleich solcher Spektren von Phosphopeptiden mit denen der korrespondierenden nicht-phosphorylierten Peptiden.

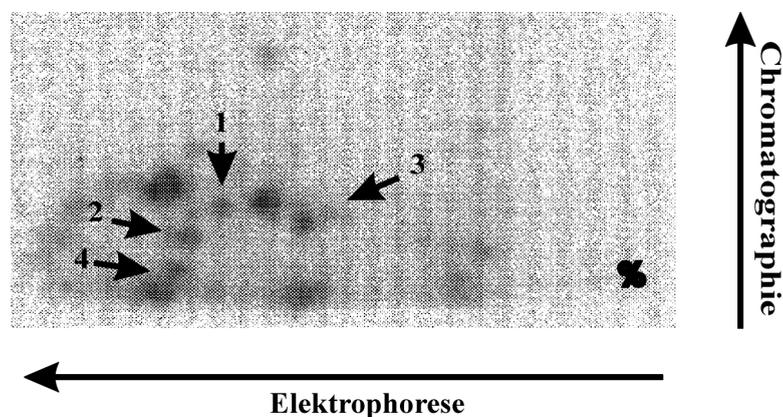
Mit Hilfe der Nanoelektrospray-Massenspektrometrie wurde nach zweidimensionaler Phosphopeptid-Kartierung nach *in vitro*-Phosphorylierung auch erneut das Phosphopeptid mit der Phosphoamino Säure Thr 159 identifiziert. Dieses Peptid ließ sich in MALDI-MS-Messungen nicht nachweisen.

Alle gefundenen Peptide stimmten aber mit solchen überein, die auch im endogenen Protein nativ identifiziert worden waren.

Die Phosphopeptiddetektion korrelierte darüberhinaus nicht mit der Intensität der  $^{32}\text{P}$ -Markierung. Der aufgrund der spezifischen Aktivität des für die *in vitro*-Phosphorylierung eingesetzten  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP berechnete Einbau von Phosphat betrug auf die totale Menge an LAP 2 $\beta$

etwa 100 fmol, pro Peptidspot maximal 10 fmol. Daraus können zwei wesentliche Schlüsse gezogen werden: 1. funktionell: alle nativ gefundenen Phosphorylierungsstellen sind Substrate für Kinasen, die endogen im Kernhüllenpräparat enthalten sind. 2. methodisch: Die Stöchiometrie der Phosphorylierung wurde durch die *in vitro*-Reaktion nur unwesentlich verändert, so daß die Radioaktivität nicht die massenspektrometrische Identifizierung *de novo*-phosphorylierter Aminosäurereste erlaubte, sondern der Markierung der Position nativ bereits vorliegender Phosphopeptide diente. Dies kann zwar nicht von vornherein vorausgesetzt werden. Dennoch wurde hier durch die Integration der Massenspektrometrie in die etablierte Strategie der zweidimensionalen Phosphopeptidkartierung deren analytisches Potential signifikant ausgeweitet.

A



B

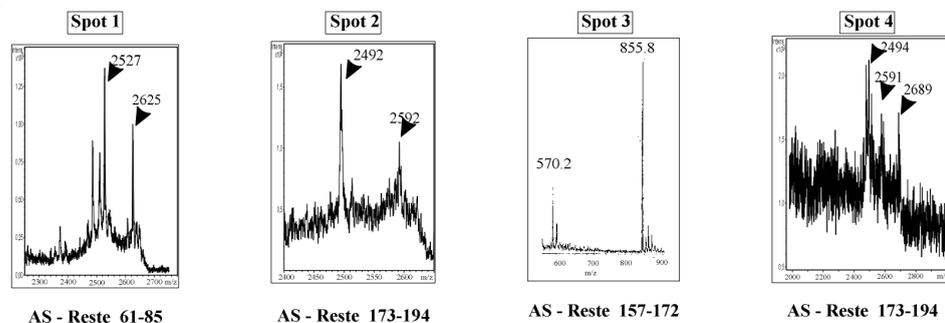
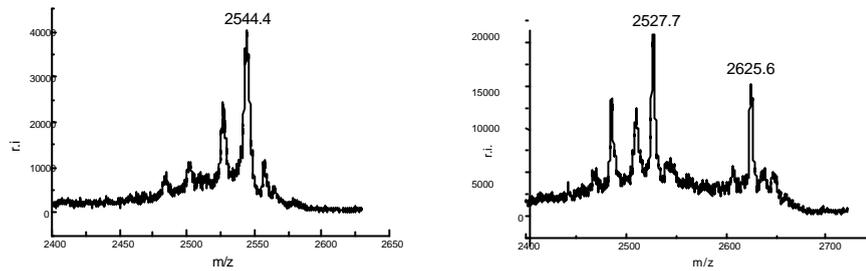


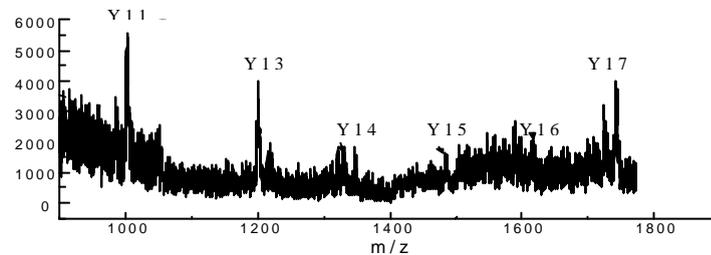
Abb. 14: **A:** Autoradiographie nach zweidimensionaler Auftrennung des Peptidgemisches aus dem Verdau auf der Blotmembran von LAP 2 $\beta$ . Erste Dimension: Dünnschichtelektrophorese, zweite Dimension: Dünnschichtchromatographie. Die Spots, die in der MALDI-MS erfolgreich analysiert werden konnten (1,2,4) bzw. in der Nanoelektrospray-MS (3), sind indiziert. Die korrespondierenden Aminosäurereste sind aufgeführt.

## A: Elternionen unphosphoryliert (2544 Da) vs. phosphoryliert (2625 Da)



## B: Vergleich der PSD - Spektren

### GPPDFSSDEEREPTVLGSGASVGR



### GPPDFSSDEERE<sub>p</sub>TPVLGSGASVGR

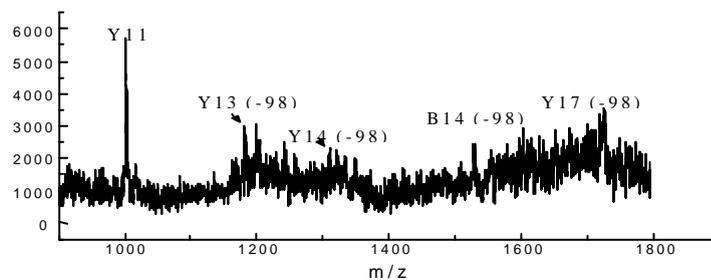


Abb. 15: Identifizierung der Phosphorylierungsstelle im Peptid 61-85 mittels MALDI-MS. Der Vergleich zwischen den Fragmentationsspektren der phosphorylierten Peptidspezies und der nichtphosphorylierten Spezies war für die eindeutige Identifizierung von Thr 74 als Phosphoaminosäure erforderlich. **A:** Elternionen im Reflektormodus; deutlich ist beim Phosphopeptid die Abspaltung von Phosphorsäure erkennbar ( $\Delta$  98 Da). **B:** Ausschnitt aus den Fragmentationsspektren: Das vom C-Terminus abgeleitete Y<sub>11</sub>-Ion ist in beiden Spektren prominent, die Phosphatgruppe ist also nicht innerhalb der 11 C-terminalen Aminosäurereste lokalisiert. Das Y<sub>12</sub>-Ion, das erstmals Thr 74 enthält, fehlt in beiden Spektren. Das Y<sub>13</sub>-Ion ist im Spektrum des unphosphorylierten Peptids wieder deutlich zu sehen. Eine signifikante Wasser- oder Ammoniumabspaltung (resultierend in einem Masseverlust des Fragments von 18 bzw. 17 Da) ist nicht erkennbar. Im Spektrum des Phosphopeptids erscheint ein prominentes Signal bei der Masse des Y<sub>13</sub>-Ions vermindert um 18 Da. Dies ist erklärbar durch die Anwesenheit der Phosphatgruppe an Thr 74, die zur Phosphorsäure-Abspaltung führt ( $\Delta$  98 Da.). Diese Abspaltung ist so intensiv, daß das Y<sub>13</sub>-Ion mit intakter Phosphatgruppe praktisch nicht mehr erkennbar ist. Dennoch ist hier die Identifizierung von Thr 74 als Phosphoaminosäure eindeutig. r.I.: relative Intensität

### 3.3.4 LAP 2 $\beta$ als *in vitro*-Substrat für aktivierte PKC $\alpha$

Da PKC  $\alpha$  in Kernen von Neuro 2A-Zellen vorkommt (Buchner et al., 1997), legten die Befunde aus der Identifizierung der nativen Phosphorylierungsstellen aus nativem LAP 2 $\beta$  die Fragestellung nahe, ob eine Funktion dieser Kernlokalisation die Phosphorylierung von LAP 2 $\beta$  sein könnte, zumal noch kein nukleäres Substrat für die Kinase im untersuchten System identifiziert worden ist. Ein mit LAP 2 $\beta$  in der BAC-Gelelektrophorese komigrierendes Protein erschien in der  $^{32}\text{P}$ -Autoradiographie als eines der Hauptsubstrate für rekombinante PKC  $\alpha$  (zu Verfügung gestellt von S. Wagner) im Kernhüllenpräparat aus Neuro 2A-Zellen (Abb.16A). Dieses Protein wurde nach Immunpräzipitation mit dem R1-Antikörper als LAP 2 $\beta$  identifiziert (Abb.16B). Rekombinante aktivierte PKC  $\alpha$  war auch in der Lage, rekombinantes LAP 2 $\beta$  (zur Verfügung gestellt von Dr. H. Otto) zu phosphorylieren (Abb.16C).

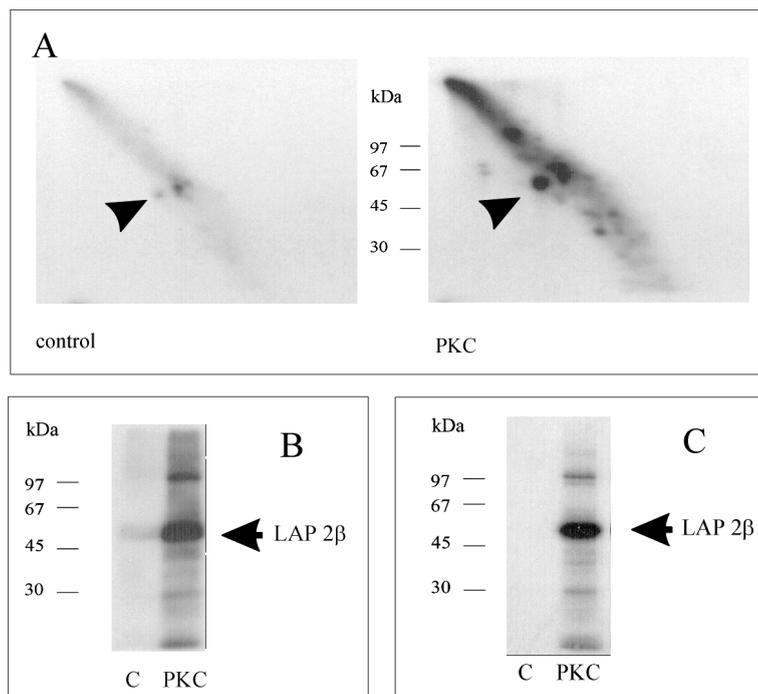


Abb. 16: *in vitro*-Phosphorylierung von LAP 2 $\beta$  durch aktivierte rekombinante PKC  $\alpha$ . **A:** Autoradiographie von BAC-Gelen nach *in vitro*-Phosphorylierung des Kernhüllenpräparates in Abwesenheit (Kontrolle) oder in Gegenwart (PKC) von PKC  $\alpha$ , **B:** Autoradiographie nach anti-LAP 2 $\beta$ -Immunpräzipitation aus dem Kernhüllenpräparat nach *in vitro*-Phosphorylierung in Abwesenheit (K) oder in Gegenwart (PKC) von PKC  $\alpha$ , **C:** *in vitro*-Phosphorylierung von gereinigtem rekombinanten LAP 2 $\beta$  in Abwesenheit (K) oder in Gegenwart von PKC  $\alpha$ . Rekombinantes LAP 2 $\beta$  wurde freundlicherweise von Dr. Henning Otto zur Verfügung gestellt, rekombinante PKC  $\alpha$  von Stefan Wagner, beide AG Prof. Hucho.

### 3.3.5 Wechselwirkung von LAP 2 $\beta$ mit anderen Proteinen

Auf die Identifizierung der Phosphorylierungsstellen von LAP 2 $\beta$  zur Interphase sollten Experimente zur funktionellen Charakterisierung der Phosphorylierungsstellen folgen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es aber nur noch möglich, erste Experimente zu den Interaktionen von LAP 2 $\beta$  in Kernhüllen aus Neuro 2a-Zellen durchzuführen.

#### 3.3.5.1 LAP 2 $\beta$ in der Blauen Native Elektrophorese

In einem ersten Versuch zur Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen unter Beteiligung von LAP 2 $\beta$  wurde die Blaue Native Elektrophorese eingesetzt, um LAP-Immunreaktivität in größeren Proteinkomplexen zu testen. Im Western Blot mit dem R1-Antikörper zeigte sich neben der mutmaßlichen Monomer-Bande von LAP 2 $\beta$  eine immunreaktive Bande bei 200-240 kDa (abgeschätzt am Molekulargewichtsmarker: Gemisch mehrerer Oligomere vernetzter Glutamat-Dehydrogenase). Die Bande koinzidierte mit einer A-Typ Lamin-Immunreaktivität (Abb.17).

A: Blaue Native Elektrophorese

B: IP  $\alpha$ -LAP 2 $\beta/\epsilon$

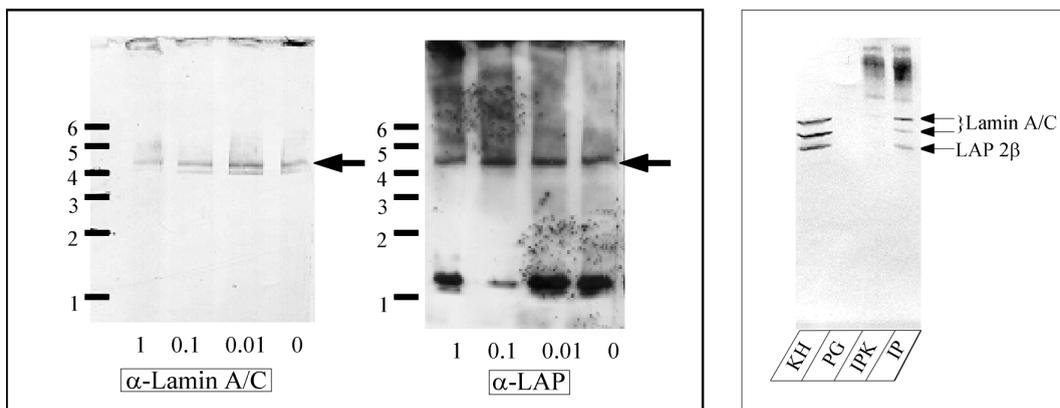


Abb17.: **A:** Koinzidenz von A/C-Typ-Lamin-und R1-Immunreaktivität in einem Proteinkomplex in der Blauen Native Elektrophorese. 0, 0.01, 0.1 und 1 bedeuten % (w/v) Natrium-Dodecylsulfat (SDS) im Probenpuffer. Als Molekulargewichtsmarker wurde vernetzte Glutamat-hydrogenase verwendet, Die als Monomer (1) bis Hexamer (6) im Gel erkennbar war. **B:** Ko-Immunpräzipitation von Lamin A/C mit LAP 2 $\beta/\epsilon$  in der Immunpräzipitation mit R1-Protein G-Sepharose. IP: IP-Pellet, IPK: IP in Gegenwart des Immunisierungspeptids, PG: unspezifische Bindung an Protein G-Sepharose. Die Immunreaktivität im hohen Molekulargewichtsbereich der Spuren IP und IPK ist vermutlich auf die Bindung des im Western Blot verwendeten Antikörpers mit hochmolekularen Antikörpereggregaten aus der Immunpräzipitation hervorgerufen.

### **3.3.5.2 Koimmunpräzipitation von Laminen mit LAP 2**β****

In Immunpräzipitationsexperimenten mit dem R1-Antikörper zeigte sich anhand von Western Blot-Analysen, daß A-Typ-Lamine spezifisch mit LAP 2**β** kopräzipitiert wurden (Abb. 17). Bei der Analyse von Gelbanden nach Auftrennung des Immunpräzipitats wurden mittels MALDI-MS A- und B-Typ Lamine identifiziert.