

4. Diskussion

4.1 Diskussion der Befunde aus den Experimenten zur Identifizierung tyrosinphosphorylierter Kernhüllenproteine

4.1.1 Potential der BAC-Gelelektrophorese für die Untersuchung der Zellkernhülle

Die BAC-Gelelektrophorese zur Auftrennung von Kernhüllenproteinen (Hartinger et al., 1996), die von Dr. Henning Otto in unserem Labor etabliert worden ist, ist in Bezug auf ihre Separationskapazität der gebräuchlichen zweidimensionalen (2D-) Gelelektrophorese aus isoelektrischer Fokussierung und nachfolgender SDS-PAGE deutlich unterlegen, bietet aber eine stark verbesserte Auflösung als eine einfache SDS-PAGE nach Laemmli (1970). Die herkömmliche 2D-Elektrophorese ist jedoch andererseits bei Durchführung nach O'Farrell (1975)/Klose (1975) nicht für die Trennung von Kernhüllenproteinen geeignet (z.B. Emig, 1995), da viele Membranproteine nicht in das Gel der ersten Dimension gelangen. Die BAC-Gelelektrophorese ermöglicht durch den Einsatz ionischer Detergentien in beiden Dimensionen die Auftrennung gerade von schwer zu solubilisierenden Membranproteinen. Dies wurde u.a. daran deutlich, daß bei der Auftrennung des Kernhüllenproteins aus Neuro 2a-Zellen ein integrales Membranprotein der inneren Kernmembran, das sowohl mit der Kernlamina als auch mit Chromatin interagiert (Foisner und Gerace, 1993), nämlich LAP 2 β , ein Hauptprotein in den Gelen ist. Darüberhinaus konnte erstmals der *in vivo*-Phosphorylierungsstatus dieses Proteins während der Interphase des Zellzyklus detailliert untersucht werden. Es gelang auch der proteinchemische Nachweis eines integralen Membranproteins aus dem Kernporenkomplex, NUP 98. Zwei Proteine, nämlich das 16 kDa-Protein und LAP 2 ϵ , wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals auf Proteinebene beschrieben. Im Tritonextrakt des Kernhüllenpräparates aus PC 12-Zellen, das im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals untersucht wurde, wurden als Haupt-Proteinkomponenten ausschließlich integrale Membranproteine identifiziert, darunter die integralen

Membranproteine der inneren Kernmembran LAP 2 β und Emerin. Daher stellt der Einsatz des BAC-Gelsystems einen methodischen Durchbruch für die Analyse der Zellkernhülle dar. Eine systematische Subfraktionierung des Kernhüllenpräparates würde es zudem ermöglichen, Proteine, die in kleinerer Kopienzahl pro Zelle vorkommen und möglicherweise innerhalb der Kernhülle an distinkten Substrukturen angereichert vorliegen, zu identifizieren.

Sowohl im Kernhüllenpräparat aus Neuro 2a-Kernen als auch aus PC 12-Kernen wurden signifikante Mengen bestimmter mitochondrialer Proteine (vor allem α - und β -Untereinheit der F₁-ATP-Synthase) gefunden. Diese wurden ebenfalls von Emig trotz der Abwesenheit der Aktivität mitochondrialer Markerenzyme gefunden (Emig, 1995). Möglicherweise handelt es sich bei den verbliebenen mitochondrialen Proteinen (von denen übrigens alle Kern-kodiert waren) um neu synthetisierte Proteine, die eventuell Chaperon-assoziiert an der Membran des Endoplasmatischen Retikulums vorliegen.

4.1.2 Tyrosinphosphorylierte Proteine der Kernhülle: Neuro 2a-Zellen

Die Identifizierung potentieller Tyrosinkinasesubstrate im Kernhüllenpräparat blieb in den meisten Experimenten auf der Ebene einer Korrelationsanalyse zwischen Anti-Phosphotyrosin-Western-Blot-Signalen und Coomassie-gefärbten Proteinspots stehen. Ein wesentlicher Grund dafür ist die schwierige Detektion von Phosphopeptiden (die direkte Sequenzierung eines tyrosinphosphorylierten Peptids war das gesetzte Kriterium, um ein Protein als identifiziertes Tyrosinkinasesubstrat einzustufen). Das Potential der MALDI-Massenspektrometrie für die Phosphopeptidanalytik mit unfraktionierten Peptidgemischen nach in-Gel-Verdau von Proteinen wurde zu Beginn der Arbeit zu optimistisch eingeschätzt (es gab kaum vergleichbare Arbeiten in der Literatur). Die Anwendung des Phosphopeptid-spezifischen Parent ion scans mit der Nanoelektrospray-Massenspektrometrie erwies sich im Laufe der Arbeit als die Methode der Wahl, konnte aber aus apparativen Gründen ausschließlich in Kooperation mit Dr. Gitte Neubauer aus der Protein & Peptidgruppe am EMBL in Heidelberg durchgeführt werden. Dies geschah aus Kapazitätsgründen nur für das Protein LAP 2 β , in dem allerdings ausschließlich Ser/Thr-Phosphorylierungsstellen identifiziert wurden (s. unten).

In den meisten Fällen blieb die Zuordnung zwischen Western Blot-Signalen und Proteinfärbung im Gel unsicher, da an der Position detektierter Signale aus dem anti-Phosphotyrosin-Western Blot weitere Proteine außer den an den entsprechenden Positionen identifizierten komigrieren könnten.

Es ist daher denkbar, daß komigrierende Proteine (die eventuell gegenüber den identifizierten Proteinen in geringerer Menge vorliegen) die Western Blot-Signale hervorrufen, auch wenn sie sich dem proteinchemischen Nachweis entziehen. Für die Aussagekraft der vorliegenden Befunde spricht, daß sich unter den identifizierten Proteinen auch bekannte Tyrosinkinase-Substrate wie Hsc 71 (Egerton et al., 1996) hnRNP A2/B1 (Pype et al., 1994) befinden, so daß von einer korrekten Korrelation zwischen den Western Blot-Signalen und Coomassie-angefärbten Proteinspots (in der BAC-Gelelektrophorese) ausgegangen werden kann.

Als Kandidaten für Tyrosinkinasesubstrate wurden in verschiedenen Experimenten gefunden: PTB-assoziiertes Spleißfaktor (PSF), 16 kDa-Protein, NonO (Non-POU domain octamer binding protein), Lamine B1 und B2, LAP 2 α und β (bei letzterem wurde jedoch im Parent ion scan mit Nanoelektrospray-Massenspektrometrie kein tyrosinphosphoryliertes Peptid gefunden, s. Abschn. 3.3), Hsc 70/71, NUP 98 (diese Proteine aufgrund der Korrelationsanalyse), p160 Myb-binding Protein, Aktin, Cortactin (aufgrund der anti-Phosphotyrosin-Immunpräzipitation).

Die Einsatzmöglichkeit der Immunpräzipitation, die eigentlich die Methode der Wahl gewesen wäre, war dadurch eingeschränkt, daß keine Bedingungen gefunden werden konnten, unter denen die Kernhüllenproteine vollständig solubilisierbar und die zugleich mit einer anti-Phosphotyrosin-Immunpräzipitation kompatibel gewesen wären. Außerdem zeigten verschiedene anti-Phosphotyrosin-Antikörper unterschiedliche Bindungsspezifität.

Funktionelle Rolle der potentiellen Tyrosinkinasesubstrate anhand der Literatur:

Die **B-Typ-Lamine** sind Bestandteile der nukleären Lamina (s. Abschnitt 1.2.1.5). **PSF**, **NonO** und das **16 kDa-Protein** sind RNA-bindende Proteine deren Funktion entweder nicht bekannt ist (16 kDa-Protein, das Protein wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals auf Proteinebene beschrieben) oder die eine regulatorische Funktion beim RNA-Spleißen haben. Die Lokalisation von Spleißfaktoren ist nukleoplasmatisch, dabei allerdings vielfach Kernmatrix-assoziiert. **Hsc 70** (Hsc 71 bei *R. norvegicus*) spielt möglicherweise eine Rolle beim Kerntransport von Proteinen, die genaue Funktion ist unklar.

NUP 98 ist ein Protein des Kernporenkomplexes, es ist darin eher peripher auf der nukleoplasmatischen Seite lokalisiert und könnte ein Bestandteil der Korbstruktur des Kernporenkomplexes sein (Sukegawa et al., 1993). Das Protein spielt eine Rolle beim Kernexport von RNA und Proteinen (Radu et al., 1995, Powers et al., 1997). Eine Subpopulation von NUP 98 ist (bei Überexpression) im Nukleolus gefunden worden, was

bedeuten könnte, daß das Protein zwischen Kernporenkomplex und Nukleoli (wo möglicherweise Exportsubstrate "gelagert" werden, z.B. bei Yang et al., 1997, im Überblick bei Lamond und Earnshaw, 1998) hin- und herwandern kann (Powers et al., 1995). Eine Beteiligung des Proteins an Ereignissen, die von Protein-Tyrosinphosphorylierung reguliert werden können, ist denkbar: Im Falle des Kernexportes von Glucocorticoidrezeptoren wurde gezeigt, daß der Export abhängig von einer Tyrosinkinaseaktivität erfolgt (Yang et al., 1997).

LAP 2 α und β sind Spleißvarianten desselben Gens. LAP 2 α (s. auch Abschn. 1.2.1.4) ist ein mit der Kernlamina assoziiertes (vermutlich peripheres) Protein der inneren Kernmembran und bindet sowohl an Lamine als auch an Chromatin (Foisner und Gerace, 1993). LAP 2 β ist ein integrales Protein der inneren Kernmembran und bindet B-Typ Lamine und Chromatin (Foisner und Gerace, 1993). Zusätzlich bindet LAP 2 β an das Chromatin-assoziierte Protein BAF (barrier of autointegration factor, BAF, Furukawa et al., 1999). Der Phosphorylierungsstatus von LAP 2 β wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit detailliert untersucht, es wurde allerdings keine Tyrosinphosphorylierung gefunden. Dies könnte bedeuten, daß das Signal im anti-Phosphotyrosin-Western Blot von einem in der BAC-Gelelektrophorese komigrierenden Protein hervorgerufen wird (möglicherweise dem Protein ovary testis transcribed protein (Ott), Dreger et al., 1999), oder daß nur eine kleine Subpopulation von LAP 2 β im Präparat tyrosinphosphoryliert. Es ist nicht auszuschließen, daß in den Spektren aus den Parent ion scan-Messungen (s. unten) etwaige tyrosinphosphorylierte Peptide nur schlecht detektiert wurden. Solche Spektren werden eher von Ser/Thr-phosphorylierten Peptiden dominiert, die eine stärkere Abspaltung der Phosphatgruppen zeigen (Neubauer, mündl. Mitteilung).

P160 Myb-binding Protein ist ein negativ regulatorischer Bindungspartner des Transkriptionsfaktors Myb und kann bei Überexpression dessen transformierender Wirkung entgegenwirken (Tavner et al., 1998). Außerdem kann das Protein in ähnlicher Weise den Transkriptionsfaktor Jun binden. P160 Myb-binding protein ist hauptsächlich im Nukleolus lokalisiert (Tavner et al., 1998, die einzige mir bekannte Veröffentlichung zu diesem Protein).

Einige der identifizierten Proteine weisen nach PROSITE-Vorhersage (<http://www.motif.genome.ad.jp>) auch Phosphorylierungs-Konsensussequenzen für Tyrosinkinasen auf (Lamin B1: Y240 und Y268, Lamin B2: Y260 und Y297, LAP 2 α : Y626, NUP 98: Y801 und Y847, jeweils basierend auf der Konsensus-Sequenz [RK]-x(2,3)-[DE]-x(2,3)-Y nach Patschinsky et al., 1982, Hunter, 1982 und Cooper et al., 1984). Diese Art der Vorhersage von Modifikationen bleibt aber für sich allein genommen unsicher: weder müssen die

vorgeschlagenen Phosphorylierungsstellen auch tatsächlich *in vivo* phosphoryliert sein noch erfaßt die Suche Konsensus-Sequenzen aller verschiedener Tyrosinkinase (für die Substratspezifität verschiedener Tyrosinkinase s. Songyang et al., 1995, Songyang und Cantley, 1995).

Träfe jedoch die Annahme der Tyrosinphosphorylierung dieser Proteine zu, wäre hier erstmals ein Hinweis auf einen weiteren Regulationsmechanismus der Struktur und Funktion der Zellkernhülle gefunden, denn für die meisten identifizierten potentiellen Tyrosinasesubstrate (bzw. für die gesamten Strukturzusammenhänge, in die sie integriert sind wie die Kernlamina oder der Kernporenkomplex), ist diese Art der posttranslationalen Modifikation bislang noch nicht beschrieben worden.

Das gewählte Untersuchungssystem erscheint daher als ausreichend potent, um substantiell neue Erkenntnisse über die Zellkernhülle zu erhalten, wenn eine angemessene apparative Ausstattung (Parent ion scan mit einem Tripel-Quadrupol-Massenspektrometer auf dem analytischen Niveau der Nanoelektrospray-Massenspektrometrie) verwendet werden kann.

4.1.3 Tyrosinasesubstrate aus Kernhüllen von PC12-Zellen

Die Etablierung einer Kernhüllenpräparation aus PC 12-Zellen war insofern von besonderem Interesse, als daß mit der Antwort der Zellen auf Nervenwachstumsfaktor (NGF) bereits ein Signal bekannt ist, das eine intrazelluläre Dynamik der Tyrosinphosphorylierung hervorruft. Inwiefern die Kernhülle daran partizipiert, ist unbekannt.

Eine Korrelationsanalyse zwischen anti-Phosphotyrosin-Western Blot und Gelfärbung wie im Falle der Neuro 2a-Zellen wurde nicht systematisch durchgeführt, da das Proteinmuster aus PC 12-Kernhüllen nach Coomassie-Färbung der BAC-Gele erheblich komplexer als das aus Neuro 2a-Kernhüllen war. Die größere Komplexität des Präparates ist wahrscheinlich nicht auf eine stärkere Kontamination des Kernpräparates durch andere Zellorganellen im Vergleich zum Neuro 2a-Präparat zurückzuführen, sondern eher durch eine höhere Kontamination des Kernhüllenpräparates durch Reste der Kernmatrix. Dies kann zumindest daraus gefolgert werden, daß Peripherin und die hnRNPs anders als im Neuro 2a-Präparat im PC 12-Präparat zu den Haupt-Proteinspots auf den BAC-Gelen gehören. Im Tritonextrakt aus den PC 12-Kernhüllen wurden nahezu ausschließlich integrale Membranproteine, überwiegend aus dem

Endoplasmatischen Retikulum (z.B. BIP, Calnexin, Oligosaccharyltransferase, Ribophorin, BAP-32), die aufgrund der Kontinuität zwischen ER-Membran und äußerer Kernmembran auch direkt in der Kernhülle lokalisiert sein könnten, und aus der inneren Kernmembran (LAP 2 β , Emerin), identifiziert. Nach Augenschein war die Menge mitochondrialer Proteine, vor allem der α - und β -Untereinheit der F₁-ATP-Synthase, im PC 12-Präparat vergleichbar mit der im Neuro 2a-Kernhüllenpräparat.

Die Stimulierung der Zellen konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit direkt proteinchemisch nachgewiesen werden. Dieser Nachweis erfolgte über die Identifizierung des NGF-induzierten Proteins VGF im Kernhüllenpräparat. Das Protein war im Präparat aus Kontrollzellen nicht nachweisbar. Die Lokalisierung dieses eigentlich sekretorischen Proteins im Kernhüllenpräparat ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß sich eine gewisse Menge des nach der Stimulierung massiv exprimierten Proteins (Anstieg der VGF-mRNA um den Faktor 80, Possenti et al., 1989) bei der Kernpräparation noch im ER-Lumen befindet und damit auch im Perinuklearraum. Diese Annahme ist konsistent mit dem Befund in der Literatur, daß bei der immunchemischen Lokalisation des Proteins in den Zellen auch ein Signal im ER-Lumen und im Perinuklearraum erkennbar ist (Possenti et al., 1989). Daher erscheint das Protein auch im Triton X-100-Extrakt des Kernhüllenpräparates, das unter anderem auch den Inhalt des Perinukleären Raumes enthalten sollte.

Im niedrigen Molekulargewichtsbereich (etwa bei 30 kDa) erschien eine Zuordnung von Western Blot-Signalen und Proteinspots nach Coomassie-Färbung zulässig, da einige Proteine ein charakteristisches Migrationsverhalten zeigten und von der Hauptmenge der Proteine separiert waren (s. Abb. 6). Bei diesen Proteinen wurde ein Anstieg der Tyrosinphosphorylierung nach Stimulation der Zellen durch NGF beobachtet. Die Proteine wurden als hnRNP A2/B1 und hnRNP A3 (als zwei Spots) identifiziert.

HnRNP A2 und B1 sind eigentlich zwei Spleißvarianten desselben Gens (Kozu et al., 1995). Bei der Identifizierung in der vorliegenden Arbeit konnte jedoch nicht zwischen den Spleißvarianten diskriminiert werden. Bei hnRNP A2/B1 handelt es sich um ein bekanntes Tyrosinkinasesubstrat, das im tyrosinphosphorylierten Zustand eine von der im nicht-phosphorylierten Zustand abweichende RNA-Bindungsspezifität zeigt (Pype et al., 1994). Es ist bekannt, daß hnRNP A2 und B1 Einfluß auf die Auswahl von Spleißstellen ausüben können (Mayeda et al., 1994). Die Tyrosinphosphorylierung der beiden hnRNPs stellt möglicherweise einen Weg der Regulation differentiellen Spleißens durch NGF (Prentice et al., 1987; Smith et al.,

1997) dar. Erforderlich wäre nun die Identifizierung der hnRNP-Kinase, die Identifizierung der nach NGF-Stimulierung phosphorylierten Aminosäurereste und eine Untersuchung, ob die Proteine auf die Phosphorylierung hin *in vivo* ihre RNA-Bindungsspezifität ändern.

Im anti-Phosphotyrosin-Western Blot waren weitere Signale zu erkennen, deren Intensität sich nach der Stimulierung der Zellen durch NGF im Vergleich zum Kontrollzustand änderte. Eine Identifizierung der korrespondierenden Proteine wäre insofern lohnend, da anders als im Falle des Präparates aus Neuro 2a-Zellen sofort ein biologischer Zusammenhang ersichtlich wäre. Dieser Ansatz wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht weiter verfolgt, da es (wie oben beschrieben und weiter unten nochmals diskutiert) mit den zur Verfügung stehenden apparativen Mitteln prinzipielle Schwierigkeiten bei der Phosphopeptid-Detektion im Mikromaßstab gab. Es erscheint aber sehr aussichtsreich, das PC 12-Kernhüllensystem dann weiter zu untersuchen, wenn die Möglichkeit zur Durchführung von Parent ion scans auf dem Empfindlichkeitsniveau der Nanoelektrospray-Massenspektrometrie besteht. Aufgrund der stärkeren Kontamination des PC-12-Kernhüllenpräparates durch Kernmatrixreste im Vergleich zum Präparat aus Neuro 2a-Zellen müßte zuvor eine weitere Subfraktionierung vorgenommen werden.

4.1.4 Tyrosinphosphorylierung an isolierten Kernen in der indirekten Immunfluoreszenz

Sowohl bei Zellkernen aus NGF-stimulierten 615-Zellen als auch bei Kernen aus Kalium-(2,2'-Bipyridin)-oxobisperoxovanadat (V)- (BiPy-) behandelten Neuro 2a-Zellen war in der indirekten Immunfluoreszenz mit anti-Phosphotyrosin-Antikörpern ein Anstieg der Tyrosinphosphorylierung in den Zellkernen im Vergleich zur Kontrollsituation detektierbar. Die Signale im Kern lassen sich beim gegenwärtigen Stand der Identifizierung der potentiellen nukleären Tyrosinkinase-Substrate nicht bestimmten Proteinen zuordnen. Im Falle der Befunde mit isolierten Kernen von Neuro 2a-Zellen ist proteinchemisch im Kernhüllenpräparat Cortactin als Haupt-Tyrosinkinase-Substrat gefunden worden. Die subzelluläre Lokalisation dieses Proteins wird in der Literatur jedoch als zytoplasmatisch beschrieben. Eine durch die Befunde in der vorliegenden Arbeit nahegelegte Kernlokalisierung des Proteins müßte durch indirekte Immunfluoreszenz mit einem anti-Cortactin-Antikörper überprüft werden. In einem solchen Experiment könnte auch durch eine Doppelmarkierung mit α -Phosphotyrosin- und anti-Cortactin-Antikörpern überprüft werden, ob

eine mögliche Tyrosinphosphorylierung von Cortactin für den Anstieg des anti-Phosphotyrosin-Signals in Kernen aus BiPy-stimulierten Neuro 2a-Zellen in der Immunfluoreszenz verantwortlich ist.

Die Doppelmarkierung anti-Phosphotyrosin/anti-LAP 2 β / ϵ an Kernen aus Neuro 2a-Zellen zeigte auch eindeutig, daß anti-Phosphotyrosin-Immunreaktivität partiell mit der inneren Kernmembran kolokalisiert ist. Dies ließ sich jedoch nur bei Kernen aus BiPy-stimulierten Zellen detektieren. Die Aufklärung, welche Proteine der inneren Kernmembran tyrosinphosphoryliert sind, bleibt weiteren proteinchemischen Untersuchungen mit verbessertem analytischen Potential (s. unten) vorbehalten.

Daneben waren prominente Signale in beiden experimentellen Systemen (Kerne aus 615-Zellen und Neuro 2a-Zellen) an der Kern-Peripherie sichtbar, quasi assoziiert mit der äußeren Kernmembran.

4.1.5 Detektion tyrosinphosphorylierter Peptide anhand ihrer charakteristischen UV-Absorption

Die Verschiebung des Absorptionsmaximums bei Phosphotyrosin gegenüber Tyrosin von 280 nm (Tyr) nach 270 nm (pTyr) ist bislang lediglich zur Beobachtung von Tyrosinphosphatase-Reaktionen eingesetzt worden (Zhang et al., 1993). Dabei wurde allerdings lediglich die Zunahme der UV-Absorption des Peptids bei $\lambda=280$ nm infolge der Abspaltung der Phosphatgruppe von Tyrosin berücksichtigt. Der analytisch bedeutende nutzbare Effekt bei der in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Absorptionsmethode liegt vor allem darin, daß Phosphotyrosin kaum noch bei 280 nm absorbiert, aber eine charakteristische Absorption bei 270 nm zeigt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, den Effekt für die Detektion eines tyrosinphosphorylierten Peptides in der Mikro-HPLC-Trennung eines Verdauemisches nach in-Gel-Verdau eines integralen Membranproteins (nAChR β aus *T. californica*) auszunutzen. Es gelang die Identifizierung der Tyrosinphosphorylierungsstelle einschließlich der direkten massenspektrometrischen Sequenzierung des Phosphopeptides bei gleichartigen Präparationsbedingungen wie in der Originalveröffentlichung zur Identifizierung der Tyrosinphosphorylierungsstelle (Wagner et al., 1991) mit einer um den Faktor 2000 geringeren Ausgangsmenge.

Jedoch gelang es mit der Methode nicht, tyrosinphosphorylierte Proteine in Verdauemischen von Kernhüllenproteinen spezifisch zu detektieren. Dafür gibt es mehrere mögliche Erklärungen:

1. Zum einen war die Menge an Ausgangsmaterial in den meisten (nicht in allen) Fällen geringer als im Testversuch mit der Untereinheit des nikotinischen Rezeptors. Dies hatte zur Folge, daß die UV-Absorption der Peptide bei der Trennung über die Mikro-HPLC auch bei Verwendung der Trennsäule mit dem kleinsten Innendurchmesser (2 mm) unter den zur Verfügung stehenden Trennsäulen im Bereich des Detektorrauschens lag. Die Wiederholung der Experimente mit engeren Trennsäulen, z.B. mit 100-300 µm Innendurchmesser, erscheint hier sinnvoll.

2. Die Rezeptoruntereinheit war nach bereits nativ nach der Präparation hoch phosphoryliert. Nach *in vitro* Phosphorylierung durch die endogene Tyrosinkinase in rezeptorreichen Membranen liegt Y355 annähernd quantitativ in phosphoryliertem Zustand vor (Hopfield et al., 1988, Dreger et al., 1997). Das gilt nicht unbedingt für die Proteine der Kernhülle, zumal, abgeschätzt anhand der Intensität der Signale aus dem anti-Phosphotyrosin-Western Blot, unter den gewählten Bedingungen der *in vitro*-Phosphorylierung durch endogene Kinasen keine Steigerung des Phosphotyrosingehaltes der Proteine erreicht wurde (der Tyrosinphosphatase-Inhibitor Kalium-(2,2'-Bipyridin)-oxobisperoxovanadat (V) stand zu diesem Zeitpunkt noch nicht zur Verfügung).

3. Eine Schwäche der Methode liegt mit Sicherheit darin, daß bei Koelution eines tyrosinhaltigen Peptides mit einem phosphotyrosinhaltigen Peptid die charakteristische Absorptionsdifferenz aufgrund der starken Absorption von Tyrosin auch bei 270 nm nicht mehr detektierbar ist. Gerade bei der Auftrennung von Peptiden aus in-Gel-verdauten Proteinen wurden regelmäßig Mehrkomponenten-Fractionen gefunden, obwohl die Absorption bei 215 nm auf eine Einkomponenten-Fraktion hingedeutet hatte.

4.2 Interphase-Phosphorylierungsstellen in LAP 2 β

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden vier *in vivo* Interphase-Phosphorylierungsstellen von LAP 2 β , Thr 74, Thr 159, Ser 176 und Ser 179 identifiziert. Drei der Phosphorylierungsstellen liegen in einem nur 20 Aminosäuren der Primärstruktur umfassenden Teil des Proteins, so daß dieser Bereich vermutlich eine hochphosphorylierte Proteindomäne bildet (Graphik 3). Diesem Sequenzbereich läßt sich keine auf Literaturbefunden basierte Funktion zuschreiben. Die Sequenz-Zusammenhänge der drei Phosphorylierungsstellen deuten darauf hin, daß der Bereich Signale auf die Aktivität verschiedener Proteinkinasen integrieren kann: Thr 159 liegt in einer Konsensus-Phosphorylierungssequenz für Prolin-gerichtete Kinasen, Ser 179 in einer Konsensussequenz für Proteinkinase C, Ser 176 in keiner bekannten Konsensussequenz. Dabei konnte bei der Analyse langer Phosphopeptide gezeigt werden, daß die identifizierten Phosphorylierungsstellen zumindest partiell gemeinsam phosphoryliert vorliegen, auch wenn insgesamt das Vorliegen verschieden phosphorylierter LAP 2 β -Subpopulationen in der Interphase nicht auszuschließen ist. In den Versuchen zur zweidimensionalen Phosphopeptid-Kartierung nach *in vitro*-Phosphorylierung von Kernhüllenproteinen durch endogene Kinasen wurde gezeigt, daß alle identifizierten *in vivo*-Phosphorylierungsstellen von LAP 2 β Substrate für Proteinkinasen sein können, die im Kernhüllenpräparat anwesend sind.

Die identifizierten Phosphorylierungsstellen liegen ausnahmslos innerhalb der Aminosäuren 1-187, einem Sequenzabschnitt, der bei allen Mitgliedern der LAP 2-Proteinfamilie vorkommt. Ob anhand dessen ein gemeinsamer Regulationsmechanismus dieser Proteine postuliert werden kann, bleibt einer Analyse der Interphase-Phosphorylierungsstellen der verschiedenen LAP 2-Familienmitglieder vorbehalten.



Graphik 4: Domänenstruktur von LAP 2 β mit Lokalisierung der Interphase-Phosphorylierungsstellen

Außer LAP 2 β wurden in den Neuro 2a-Kernhüllen im Rahmen der vorliegenden Arbeit auch die Spleißvariante LAP 2 α sowie die Spleißvariante LAP 2 ϵ (die sich von LAP 2 β nur durch die Deletion von 40 Aminosäureresten in den nukleoplasmatischen Teil des Proteins unterscheidet und die hier erstmals auf Proteinebene beschrieben wurde) gefunden.

Implikationen der Interphase-Phosphorylierung von LAP 2 β

Welche Rückschlüsse können aus der Kenntnis der identifizierten Interphase-Phosphorylierungsstellen von LAP 2 β vor dem Hintergrund der Literatur gezogen werden?

Detaillierte Daten über die Phosphorylierung von LAP 2 β zur Interphase liegen in der Literatur nicht vor. Foisner und Gerace (1993) konnten zeigen, daß die Bindung von LAP 2 β an B-Typ-Lamine sowie an Chromatin durch mitotisch aktive Kinasen gebrochen werden kann. Kürzlich wurde gezeigt, daß eine sequentielle Phosphorylierung durch Proteinkinase C und Cdc2-Kinase für die Deassemblierung der Kernhülle notwendig ist (Collas, 1999).

Phosphorylierung durch Prolin-gerichtete Kinasen

Thr 74 liegt wie Thr 159 in einer Konsensussequenz für eine Phosphorylierung durch Prolin-gerichtete Kinasen. Zu den Prolin-gerichteten Kinasen zählen die Zellzyklus-abhängigen Kinasen p34^{cdc2} und Cdk2, aber auch ERK 2 (MAP Kinase) und etliche weitere Serin-/ Threonin-Kinasen, deren gemeinsame Phosphorylierungs-Konsensussequenz sich nicht weiter eingrenzen läßt als auf x-S/T-P-x (für Cdc2 eigentlich x-S/T-P-x-K/R, Songyang et al., 1994; allerdings gibt es "nicht-optimale" Phosphorylierungsstellen, s. Colgan et al., 1998). Eine Aktivität von Cdc2 müßte zur Interphase ausgeschlossen werden können, da diese Kinase den Übergang aus der G2-Phase in die Mitose initiiert (im Überblick bei Morgan, 1997). Cdk2 ist eine der zentralen Kinasen beim Übergang von der G1-Phase zur S-Phase des Zellzyklus (Morgan, 1997), kommt also für eine Interphase-Phosphorylierung von LAP 2 β in Frage. Jedoch kann aufgrund der Befunde in der vorliegenden Arbeit dazu keine Aussage getroffen werden.

Die Interphase-Phosphorylierung von Thr 74 ist ein überraschender Befund, da diese Phosphorylierungsstelle die einzige Konsensussequenz für Prolin-gerichtete Kinasen innerhalb der von Furukawa et al. (1998) identifizierten Chromatin-Bindungsregion ist und damit scheinbar prädestiniert für eine mitotische Phosphorylierung durch Cdc2 Kinase zur Aufhebung der

Chromatinbindung. Andererseits erfordert die hochaffine Bindung von LAP 2 β an Chromatin ($K_D \approx 80$ nM) beim nativen Protein (Foisner und Gerace, 1993) einen über die Aminosäuren 1-88 hinausgehenden Bereich (1-187, Gant et al., 1999), jedoch ist auch in diesem Bereich die einzige weitere Konsensussequenz für die Phosphorylierung durch Prolin-gerichtete Kinasen den Daten der vorliegenden Arbeit zufolge bereits phosphoryliert (Thr 159). Dagegen wurden optimale Konsensussequenzen für Cdc2-Phosphorylierung (Thr 256 und Thr 320) sowie andere mögliche Phosphorylierungsstellen für diese Kinase (Thr 207, 278, 354) unter anderem innerhalb des minimalen Lamin-bindenden Fragmentes (Aminosäuren 296-373, Furukawa et al., 1998) zur Interphase nicht in phosphoryliertem Zustand gefunden. Für die mögliche Regulation der Chromatin-Bindung von LAP 2 β durch Prolin-gerichtete Kinasen kann aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit gefolgert werden, daß Cdc2 nicht die Kinase ist, die über mitotische Phosphorylierung der Chromatin-Bindungsregion von LAP 2 β die Chromatinbindung aufhebt. Alternativ könnte es möglich sein, daß durch Cdc2 die Chromatin-Bindungsregion zur Mitose hin quantitativ phosphoryliert wird und so die Bindung völlig aufhebt, daß aber während der Interphase diese Region des Proteins auch schon -vielleicht partiell- durch andere Prolin-gerichtete Kinasen, z.B. Cdk2, phosphoryliert wird und dadurch eine dynamische LAP 2 β -Chromatin-Bindung beispielsweise während der DNA-Replikation erreicht werden kann. Die Hypothese einer dynamischen Interaktion zwischen LAP 2 β und Chromatin während der Interphase des Zellzyklus erscheint insbesondere vor dem Hintergrund des Modells fix lokalisierter "Replikationsfabriken" (s. bei Cardoso und Leonhardt, 1998) attraktiv: Wenn eine vollständige DNA-Replikation erfolgen soll, kann eigentlich nicht von einer völlig statischen Interaktion zwischen Chromatin und Kernhülle ausgegangen werden. In der Tat wurde von Gant et al. (1999) im zellfreien Kern-Rekonstitutionsystem bei *Xenopus laevis* ein Effekt durch überexprimiertes LAP 2 β auf die DNA-Replikation gefunden: Ein zusätzliches Angebot von rekombinantem LAP 2 β in der Rekonstitution steigert die Effizienz der Replikation in den assemblierten Kernen.

Phosphorylierung von LAP 2 β durch PKC

Keine der Konsensussequenzen für Phosphorylierung durch PKC innerhalb der Aminosäurereste 1-88 wurde in phosphoryliertem Zustand gefunden, eine einzige Konsensussequenz für PKC (unter zahlreichen nach PROSITE vorhergesagten) wurde zur Interphase als phosphoryliert

identifiziert, nämlich Ser 179 innerhalb der durch multiple Proteinkinasen hochphosphorylierten Proteindomäne zwischen Thr 159 und Ser 179, die im Rahmen dieser Arbeit identifiziert wurde. Collas (1999) zeigte, daß die sequentielle Phosphorylierung durch PKC und Cdc2 für die Deassemblierung der Kernhülle zur Mitose hin beim Zebrafisch notwendig ist. Eines der Kernhüllensubstrate, nämlich das Homolog von Lamin B1, wurde dabei durch beide Kinasen phosphoryliert. Das LAP 2 β -Homolog war aber in diesem experimentellen System offenbar kein PKC-Substrat, was indirekt mit der Aussage in der vorliegenden Arbeit konsistent ist, daß es sich bei Ser 179 von LAP 2 β um eine *in vivo* Phosphorylierungsstelle für eine PKC-Isoform während der Interphase des Zellzyklus handelt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde außerdem gezeigt, daß Kernhüllen-gebundenes LAP 2 β *in vitro* ein Substrat für aktivierte rekombinante PKC α ist (s. Abschn. 3.3.4). Dieser Befund suggeriert, daß LAP 2 β ein Kernmembran-Effektor von Lipid-Signalwegen ist und damit auch an einer zellulären Antwort auf extrazelluläre Signale, beispielweise an der Wirkung von Wachstumsfaktoren, teilnehmen könnte. In der Tat zeigte sich in der vorliegenden Arbeit, daß LAP 2 β *in vitro* eines der Hauptsubstrate für exogene aktivierte PKC α ist. Buchner et al. (1997) zeigten, daß PKC α in Zellkernen von Neuro 2a Zellen vorkommt und auf Aktivierung durch Phorbolester hin fester mit intranukleären Strukturen assoziiert ist. Es bleibt daher zu untersuchen, ob LAP 2 β auf einen Stimulus hin, der intranukleär Lipidbotenstoffe freisetzt, *in vivo* von einer nukleären Isoform der PKC phosphoryliert wird.

Das bestuntersuchte System in diesem Zusammenhang ist die Kerntranslokation von PKC α in Swiss 3T3-Fibroblasten auf Stimulierung durch insulin-like growth factor 1 (IGF-1) hin (Neri et al., 1994), auf der Ebene der Kern-Ultrastruktur zu den Interchromatin-Räumen und zur Kernlamina (Zini et al., 1995). Für dieses System ist ebenfalls gezeigt, daß durch Modulation der Aktivität nukleärer Phospholipasen und Lipidkinasen der Phosphoinositid-Umsatz im Zellkern erhöht wird, was auch über die Generierung von sekundären Botenstoffen wie Diacylglycerol zur Aktivierung nukleärer PKC führen könnte (im Überblick bei D'Santos et al., 1998). Nukleäre PKC in verschiedenen Zellsystemen kann auch den Übergang von der G1-zur S-Phase des Zellzyklus regulieren (im Überblick bei Buchner, 1995, Livneh et al., 1997). Weitere Untersuchungen, die auf den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit aufbauen könnten, sollten der Identifizierung extrazellulärer Signale dienen, die über Aktivierung nukleärer Isoformen der PKC in Neuro 2a-Zellen zur Phosphorylierung von LAP 2 β *in vivo* führen. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf die Funktion der Interphase-Phosphorylierung gerichtet werden.

4.3 Protein-Protein-Interaktionen von LAP 2 β

Bei den Immunpräzipitations-Experimenten mit dem Antikörper R1 fiel auf, daß neben B-Typ Laminen (proteinchemisch identifiziert) auch Lamin A/C (proteinchemisch und im Western Blot identifiziert) kopräzipitierte. Es ist unwahrscheinlich, daß Lamin A/C direkt mit LAP 2 β interagiert, da von Foisner und Gerace (1993) gezeigt wurde, daß LAP 2 β *in vitro* B-Typ-Lamine, nicht aber Lamin A/C bindet. Da der R1-Antikörper nicht nur LAP 2 β , sondern auch das in geringeren Mengen vorliegende LAP 2 ϵ erkennt und immunpräzipitiert, ist es auch möglich, daß eine Interaktion zwischen dieser Isoform und Lamin A/C besteht. LAP 2 ϵ wurde noch nie auf Proteinebene beschrieben. Daß die Kopräzipitation von Lamin A/C spezifisch ist, wird durch die Befunde aus der Blauen Nativen Elektrophorese unterstützt: Neben einem Hauptsignal im anti-LAP 2-Western Blot etwa in Höhe des LAP 2 β -Monomers (ca. 50 kDa) erscheint ein Signal bei etwa 200-240 kDa. Diese Signal koinzidiert mit einer Lamin A/C-Immunreaktivität. Dieser Proteinkomplex, dessen Zusammensetzung im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht mehr aufgeklärt werden konnte, ist auch in Gegenwart von 1% (w/v) SDS im Probenpuffer noch weitgehend stabil. Ob die LAP 2-Reaktivität auf die β - oder auf die ϵ -Isoform zurückzuführen ist, konnte nicht entschieden werden. Bei dem Komplex könnte es sich angesichts seiner Stabilität um einen strukturellen Kernkomplex an der Kontaktfläche zwischen Kernmembran und Kernlamina handeln. Aufbauend auf die genannten Befunde erscheint es sinnvoll, die Proteinzusammensetzung des Komplexes und seine Stabilität in Bezug auf verschiedene LAP 2-Phosphorylierungszustände zu untersuchen. Die Blaue Native Elektrophorese könnte sich dazu als ein geeignetes Hilfsmittel erweisen.

4.4 Analytik von Phosphopeptiden mit massenspektrometrischen

Methoden:

4.4.1 Grenzen herkömmlicher Strategien der Phosphopeptidanalytik

Die "klassische" Methode der Analyse von Proteinphosphorylierung ist auf proteinchemischer Seite die Einführung einer radioaktiven Markierung, meistens ^{32}P , in ein interessierendes Protein mittels einer *in vitro*-Kinasereaktion (für nicht-radioaktive Phosphoserinmarkierung: Meyer, 1993). Anschließend an den proteolytischen Verdau des Substratproteins und an eine chromatographische Fraktionierung der generierten Peptide (meistens über reversed phase HPLC) erfolgt die Edman-Sequenzierung von markierten Peptiden, wobei dann die Phosphoaminosäure eine "Leerstelle" im Sequenzierungszyklus hervorruft, der abgebaute Aminosäurerest aber meßbare Radioaktivität enthält.

Alternativ können Phosphopeptide nach zweidimensionaler Phosphopeptidkartierung (Boyle et al., 1991) zumindest anhand einer Autoradiographie visualisiert werden. In Kombination mit gerichteter Mutagenese können auf diese Weise auch Phosphorylierungsstellen identifiziert werden.

Die erste der aufgeführten Methoden wird den Anforderungen einer proteinchemischen Phosphopeptidanalyse von Proben im Mengenbereich von wenigen Picomol oder darunter nicht gerecht, da die Analysegrenze herkömmlicher Sequenziergeräte unterschritten wird oder eine einfache HPLC-Trennung nur ausnahmsweise Einkomponenten-Fractionen liefert (die in der Regel für die Interpretation der Ergebnisse, die mit dem Edman-Abbau erzielt werden können, erforderlich sind), die Probenmenge aber für weitere Separations-oder Anreicherungs-schritte nicht ausreicht. Die zweite genannte Strategie setzt zusätzliche Vorinformationen über Art und mögliche Position der Phosphorylierungen innerhalb der Protein-Primärstruktur voraus. Bei einer an Konsensussequenzen für die Proteinphosphorylierung (wie PROSITE) angelehnten Datenbankrecherche wird aber in der Regel eine Vielzahl von möglichen Phosphorylierungsstellen vorhergesagt, zudem können auch wirkliche Phosphorylierungsstellen außerhalb bekannter Konsensussequenzen liegen.

4.4.2 Potentiale von MALDI-TOF-MS und Nanoelektrospray-Tandem-MS in der Phosphopeptidanalytik

Massenspektrometrische Methoden erlauben eine Phosphopeptidanalytik bis hin zur direkten Peptidsequenzierung im Subpicomol-Bereich. Bei der MALDI-TOF-MS an Geräten mit Reflektor besteht zunächst die Möglichkeit, durch Zuschalten eines Massenselektors ("ion gate") Peptide aus Gemischen heraus zu sequenzieren. Außerdem zeigen Phosphopeptide bei Messungen im Reflektormodus ein spezifisches Zerfallsmuster infolge eines Zerfalls der Elternionen nach der Ionenquelle (post source decay, PSD) unter Abspaltung von PO_3^- (bei Tyrosinphosphorylierung) oder H_3PO_4 (bei Serin-/Threoninphosphorylierung). Durch die hohe Empfindlichkeit der Messung können auch Anreicherungsversuche für Phosphopeptide, etwa über Fe^{3+} -Chelatsäulen (z.B. Wagner et al., 1991) oder Immunpräzipitation tyrosinphosphorylierter Peptide mit Antiphosphotyrosin-Antikörpern (M. Schnölzer, mündl. Mitteilung) unternommen oder Mikroseparationsexperimente (Neubauer et al., 1999) durchgeführt werden. Die Phosphopeptid-Detektion in der MALDI-TOF-MS ist durch die im Vergleich zu nichtphosphorylierten Peptiden schlechtere Ionisierbarkeit von Phosphopeptiden im Positiv-Modus limitiert. Außerdem schlägt die Detektion in komplexen Peptidgemischen, in denen nur substöchiometrische Mengen von Phosphopeptiden vorliegen, fehl. Wie auch in der vorliegenden Arbeit aufgezeigt, ist es in solchen Fällen mit der Nanoelektrospray-Tandem-Massenspektrometrie immer noch möglich, Phosphopeptide eindeutig zu identifizieren.

4.4.3 Methodische Implikationen der Phosphopeptid-Analyse bei

LAP 2ß

Die Technik des Parent ion scan im Detektionsmodus für negativ geladene Analytionen, die ausschließlich auf Tripel-Quadrupol-Instrumenten ausgeführt werden kann (Carr et al., 1996, Wilm et al., 1996, Neubauer et al., 1999), ist nach meinem Wissen die einzige Technik, die zuverlässig aus einem nicht-fraktionierten Peptidgemisch spezifisch Phosphopeptide detektieren kann. Damit ist sie bei Anwendung auf Nanoelektrospray-Massenspektrometern gegenwärtig auch die einzige adäquate Technik zur Identifizierung posttranslationaler Modifikationen im Rahmen von Proteomanalyse-Strategien, da bei solchen Experimenten immer mit geringen Proteinmengen (maximal im niedrigen Picomolbereich) umgegangen wird, weshalb die Anzahl experimenteller Schritte nach der proteolytischen Spaltung der Proteine auf ein Minimum beschränkt bleiben muß. Auch eine Auftrennung der Peptidgemische mittels HPLC kann in diesem Mengenbereich zu nicht tolerierbaren Verlusten führen.

Der Parent ion scan ermöglicht nur die spezifische Detektion der Phosphopeptidmasse, nicht die Peptidsequenzierung. Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit durch die Kooperationspartnerin Dr. G. Neubauer eine Mikrofraktionierung der Peptide des Verdaugemisches vorgenommen. Anzumerken ist jedoch, daß auch mit dem Parent ion scan nicht unbedingt gewährleistet ist, daß alle belegten Phosphorylierungsstellen direkt aus dem unfraktionierten Peptidgemisch heraus detektierbar sind. Außerdem ist die Detektion aller im Protein besetzten Phosphorylierungsstellen schwierig, wenn aufgrund unvollständiger und uneinheitlicher proteolytischer Spaltung das Spektrum trotz des Parent ion scans sehr komplex ist, vor allem in Anwesenheit vergleichsweise langer Phosphopeptide. Diese Schwierigkeit kann auch bei Anwendung des Mikrofraktionierungs-Protokolls nach Neubauer und Mann (1999) bestehen bleiben (G. Neubauer, mündl. Mitteilung).

Zusammengefaßt kann die folgende Einschätzung vorgenommen werden: Die Wahl der experimentellen Strategie zur Identifizierung von Phosphorylierungsstellen in Proteinen sollte sich danach richten, ob eine *in vitro*-Phosphorylierung untersucht werden soll oder eine *in vivo*-Phosphorylierung, außerdem danach, ob die Einführung einer radioaktiven Markierung erfolgt oder nicht. In den vergleichsweise einfachsten Fällen, der *in vitro*-Phosphorylierung von rekombinantem Protein in Gegenwart von z.B. γ -³²P-ATP oder bei der Phosphorylierung eines

endogenen Proteins durch eine exogene Proteinkinase, kann es (bei hinreichender Stöchiometrie des ^{32}P -Einbaus) die sinnvollste Strategie sein, ein Peptidgemisch nach proteolytischem Verdau des Substrates über Mikro-HPLC aufzutrennen und radioaktive Fraktionen massenspektrometrisch zu vermessen. Für diese Fälle sind MALDI-MS und Nanoelektrospray-MS etwa gleich gut geeignet, wobei die Nanoelektrospray-MS aufgrund der Möglichkeit der Durchführung eines Parent ion scans aber bereits eine selektivere Phosphopeptid-Detektion erlaubt. Allerdings enthalten die Fragmentationenspektren der Peptide nach Zerfall durch post source decay in der MALDI-MS aufgrund der guten Detektion sowohl N-als auch C-terminaler Ionen die größere Sequenzinformation. In allen anderen Fällen (d.h. bei stark substöchiometrischer Belegung der Phosphorylierungsstellen nach *in vitro*-Phosphorylierung, bei Detektion des *in vivo*-Phosphorylierungsstatus eines Proteins ohne Einführung einer Markierung) sind die Nanoelektrospray-Massenspektrometrie und die ESI-MS *online* gekoppelt mit Flüssigkeitschromatographie aufgrund der Möglichkeit der selektiven Phosphopeptid-Detektion die klar überlegenen Methoden, was auch aus der vorliegenden Arbeit hervorgeht.

4.5 Ausblick auf zu untersuchende Fragestellungen

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weisen aus, daß das ursprüngliche Ziel, nämlich die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung tyrosinphosphorylierter Kernhüllenproteine, nicht umfassend erreicht werden konnte. Jedoch ist klar geworden, an welchen Stellen in der experimentellen Strategie Modifizierungen vorgenommen werden müssen, um in Zukunft zu eindeutigen Ergebnissen zu gelangen. Die Phosphopeptid-Detektion per MALDI-MS ist wegen der fehlenden Möglichkeit einer selektiven Messung, wie sie in der Nanoelektrospray-Massenspektrometrie auf Tripelquadrupol-Instrumenten möglich ist, auf Anreicherungs-, Markierungs- und Fraktionierungsschritte angewiesen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit nur ansatzweise etabliert werden konnten. Zu solchen Fraktionierungsmethoden unter gleichzeitiger spezifischer Phosphopeptid-Detektion gehören die Differenzabsorption in der Mikro-HPLC, die allerdings zukünftig für eine geringere Materialmenge kompatibel gemacht werden muß, sowie die zweidimensionale Phosphopeptidkartierung mit anschließender Detektion der Phosphopeptide mit Hilfe der MALDI-MS. Allerdings ist auch hier, vor allem im Peptid-Separationsschritt und bei

der Rückgewinnung der Peptide von den Dünnschichtplatten, eine Anpassung der experimentellen Durchführung an geringere Mengen an Ausgangsmaterial erforderlich.

Vor allem die Analyse der Tyrosinphosphorylierung in Kernhüllenpräparaten aus PC12-Zellen in Abhängigkeit von einer vorherigen Stimulation der Zellen durch NGF stellt ein neues Untersuchungssystem dar, das schon mit den im Rahmen der vorliegenden Arbeit angewendeten Analysemethoden zu interpretierbaren Ergebnissen geführt hat (hnRNP A2/B1 und hnRNP A3 wurden mutmaßlich infolge der NGF-Stimulierung der PC12-Zellen tyrosinphosphoryliert). Dieses experimentelle System sollte mit Hilfe einer systematischen Subfraktionierung des Präparates unter Anwendung spezifischer Phosphopetid-Detektionsmethoden weiterentwickelt werden.

Die Erkenntnisse über potentielle Tyrosinkinase-Substrate aus Neuro 2a-Kernhüllen lassen trotz der Unsicherheit der Zuordnung erwarten, daß bei systematischer Phosphopeptidanalytik mit Hilfe einer verbesserten apparativen Ausstattung Informationen über völlig neue Regulationsmechanismen auch für bereits bekannte Kernhüllenproteine gefunden werden können.

Im Hinblick auf die Proteinpräparation konnte mit der von Dr. H. Otto in unserem Labor etablierten BAC-Gelelektrophorese ein methodischer Durchbruch in der Analyse des Kernhüllenpräparates erreicht werden. Diese Proteinauftrennung ermöglicht erst die zuvor angesprochene Phosphopeptidanalytik, da durch dieses Trennsystem Kernhüllenproteine signifikant besser isoliert als in der eindimensionalen Gelelektrophorese (nach Laemmli, 1970) in analysierbaren Mengen zur Verfügung stehen.

Davon wurde auch bei der detaillierten Analyse der Interphase-Phosphorylierung von LAP 2 β im Rahmen der vorliegenden Arbeit entscheidend profitiert. Die dabei gewonnenen Daten sind die ersten dieser Art über das Protein überhaupt und ermöglichen eine funktionelle Charakterisierung der Phosphorylierungsstellen. Darüberhinaus richten sie das Augenmerk auf einen bislang in der Literatur überhaupt nicht aufgegriffenen Aspekt der möglichen Rolle des Proteins, nämlich auf die Möglichkeit dynamischer Interaktionen von LAP 2 β mit Bindungspartnern während der Interphase des Zellzyklus.

Vielversprechend für die Analyse von Struktur-Funktionsbeziehungen in der Kernhülle erscheint auch die Anwendung der Blauen Nativen Elektrophorese zur Auftrennung intakter Proteinkomplexe, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit noch nicht systematisch in die experimentelle Strategie einbezogen werden konnte. Diese Technik könnte auch für die Analyse der Komponenten von anti-Phosphotyrosin-immunreaktiven Komplexen der Kernhülle genutzt

werden, deren Komponenten dann anschließend mit massenspektrometrischen Methoden identifiziert werden könnten.

4.6. Zusammenfassung

Die Kernhülle ist auf Proteinebene eines der am wenigsten charakterisierten Kompartimente in eukaryotischen Zellen. Außer einigen Komponenten der Kernporenkomplexes sind bislang nur sehr wenige spezifisch in der Kernhülle lokalisierte Proteine bekannt. Infolge dieses begrenzten Kenntnisstandes wird der Kernhülle in der Literatur meist nur die Rolle einer passiven Barriere zwischen Zytoplasma und Nukleoplasma zugewiesen, die von Makromolekülen beim Kernim- und -exports mit Hilfe der Kernporen überquert werden muß. Zunehmend gibt es aber Veröffentlichungen über in der Kernhülle lokalisierte Komponenten von Signaltransduktionswegen, was für eine vielfältigere Funktion der Kernhülle spricht. Es ist weitgehend unbekannt, ob intranukleäre Signalwege, abgesehen von der Zellzyklus-abhängigen Assemblierung und Deassemblierung der Kernhülle, Bestandteile der Kernhülle einbeziehen.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die Analyse von Kernhüllenproteinen unter besonderer Berücksichtigung ihrer posttranslationalen Modifikationen, vor allem unter Berücksichtigung ihrer Phosphorylierung. Der experimentelle Ansatz basiert auf der gelelektrophoretischen Auftrennung von Kernhüllenpräparaten und der nachfolgenden Analyse der Kernhüllenproteine mit massenspektrometrischen Methoden.

Mit Hilfe von Western Blots und Immunpräzipitation unter Verwendung von anti-Phosphotyrosin-Antikörpern konnte gezeigt werden, daß in Kernhüllenpräparaten aus Neuroblastoma Neuro 2a-Zellen der Maus sowie aus Pheochromocytoma PC12-Zellen der Ratte zahlreiche tyrosinphosphorylierte Proteine vorkommen. Das 16-Benzyldimethyl-hexadecylammoniumchlorid- (16-BAC)- Gelelektrophoresesystem, das von Dr. Henning Otto in unserem Labor etabliert worden ist, erwies sich als sehr gut geeignet für die zweidimensionale gelelektrophoretische Auftrennung von Kernhüllenproteinen.

Aufgrund der Korrelation zwischen den Positionen anti-Phosphotyrosin-Immunreaktivität auf Blotmembranen und den Positionen Coomassie-gefärbter Proteinspots in Polyacrylamidgelen wurden nach proteolytischer Spaltung interessierender Proteine im Gel und Analyse der Peptidgemische mit Hilfe der MALDI-Massenspektrometrie mehrere Kandidatenproteine für

Tyrosinkinasesubstrate identifiziert. Unter den identifizierten Kandidatenproteinen waren vermutlich der Kernmatrix zuzuordnende RNA-bindende Proteine, ein Protein des Kernporenkomplexes sowie Proteine aus der inneren Kernmembran oder mit dieser assoziierte Proteine. Da jedoch keine direkte Sequenzierung tyrosinphosphorylierter Peptide aus den Verdauungsmischen heraus gelang, kann nicht ausgeschlossen werden, daß in der Elektrophorese mit den identifizierten Proteinen komigrierende andere Proteine die anti-Phosphotyrosin-Immunreaktivität hervorriefen.

Mit Hilfe indirekter Immunfluoreszenz und konfokaler Laserscanning-Mikroskopie unter Verwendung von anti-Phosphotyrosin-Antikörpern konnte in Neuro 2a-Zellen, die mit dem selektiven Protein-Tyrosinphosphatase-Inhibitor Kalium-(2',2-Bipyridin)-oxobisperoxovanadat (V) vorbehandelt worden waren, ein starker Anstieg der Tyrosinphosphorylierung unter anderem von Proteinen der inneren Kernmembran nachgewiesen werden.

Der Phosphorylierungsstatus eines integralen Membranproteins der inneren Kernmembran, dem Lamina-assoziierten Polypeptid 2 β (LAP 2 β) wurde detailliert untersucht. Das Protein spielt vermutlich eine Rolle in der Organisation der Grenzfläche zwischen innerer Kernmembran, Kernlamina und Chromatin. Die Interaktionen des Proteins mit anderen Proteinen und mit Chromatin werden wahrscheinlich durch Phosphorylierung reguliert.

Die nicht-mitotischen Phosphorylierungsstellen von LAP 2 β , die im nativen Protein besetzt sind, wenn das Protein aus Kernhüllen von Neuro 2a-Zellen isoliert wird, wurden analysiert. Bei der Untersuchung tryptischer Peptide von LAP 2 β mit der Nanoelektrospray-Massenspektrometrie unter Anwendung Phosphopeptid-spezifischer Elternionenscans (durchgeführt in Kooperation mit Dr. G. Neubauer, Protein & Peptide Group, EMBL Heidelberg) wurden fünf besetzte Phosphorylierungsstellen gefunden. Thr 74, Thr 159, Ser 176 und Ser 179 wurden nach massenspektrometrischer Sequenzierung der Phosphopeptide als Phosphoaminosäuren identifiziert. Zwei dieser Phosphorylierungsstellen (Thr 74 in der Chromatinbindungsregion von LAP 2 β und Thr 159) sind Teile von Phosphorylierungs-Konsensussequenzen, die von Prolin-gerichteten Kinasen erkannt werden. Ser 179 ist Teil einer Konsensussequenz für Proteinkinase C, deren Fähigkeit, LAP 2 β *in vitro* zu phosphorylieren, ebenfalls gezeigt wurde. Drei der Phosphorylierungsstellen (Thr 159, Ser 176 und Ser 179) liegen innerhalb eines nur 20 Aminosäuren langen Sequenzabschnittes von LAP 2 β und bilden offenbar eine hochphosphorylierte Proteindomäne. Diese Proteindomäne kann wahrscheinlich (aufgrund der

verschiedenen enthaltenen besetzten Phosphorylierungs-Konsensussequenzen) Signale, die über verschiedene Proteinkinasen vermittelt werden, integrieren.

Die LAP 2-Spleißvariante LAP 2 ϵ wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit erstmals auf Proteinebene nachgewiesen.