

Untersuchungen zur subzellulären Verteilung von Proteinkinase C

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

vorgelegt von
Stefan Wagner

Berlin 1999

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

1. Gutachter: Prof. Dr. F. Hucho
2. Gutachter: Prof. Dr. G. Schultz

Datum und Ort der Disputation: 7.10.1999, Berlin

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1. KERNHÜLLE UND KERNPORENKOMPLEXE	1
1.2. TRANSPORT VOM CYTOPLASMA IN DEN KERN	2
1.3. PROTEINKINASE C	4
1.3.1. Subzelluläre Verteilung von Proteinkinase C.....	7
1.3.2. Proteinkinase C im Zellkern.....	9
1.3.3. Detektion von PKC.....	10
1.4. DAS GRÜN FLUORESZIERENDE PROTEIN (GREEN FLUORESCENT PROTEIN, GFP)	11
1.4.1. EIGENSCHAFTEN VON GFP	12
1.5. ZIELSETZUNG DER ARBEIT	15
2. ERGEBNISSE	16
2.1. EXPRESSION VERSCHIEDENER PKCα'S IN INSEKTENZELLEN	16
2.2. <i>IN VITRO</i> TRANSPORTTEST MIT GFP-PKCα	19
2.3. DIGITONIN-PERMEABILISIERUNG TRANSFIZIERTER NIH 3T3-FIBROBLASTEN	23
2.4. SUBZELLULÄRE VERTEILUNG IN TRANSFIZIERTEN NIH 3T3-FIBROBLASTEN	24
2.4.1. GFP-PKC α und PKC α -GFP.....	24
2.4.2. Einfluß von GFP auf die PKC α -Translokation.....	26
2.4.3. Einfluß von Punktmutationen in GFP-PKC α auf die subzelluläre Verteilung.....	26
2.4.4. Einfluß der Überexpression auf die PKC α -Translokation.....	30
2.4.5. Eingrenzung der Kernlokalisationssequenzen von PKC α mit GFP-PKC α - Deletionsmutanten.....	31
2.5. SUBZELLULÄRE VERTEILUNG VON GFP-PKCα IN TRANSFIZIERTEN COS-7-, CHO- UND NEURO 2A-ZELLEN	38
3. DISKUSSION	40
3.1. EXPRESSION IN Sf9-INSEKTENZELLEN	40
3.2. DIGITONIN-PERMEABILISIERUNG UND KERNTRANSPORT	41
3.3. SUBZELLULÄRE VERTEILUNG VON GFP-PKCα-FUSIONSPROTEINEN	42
3.4. SUBZELLULÄRE VERTEILUNG VON GFP-PKCα-PUNKTMUTANTEN	43
3.5. UNTERSUCHUNGEN ZU KERNLOKALISATIONSSEQUENZEN VON PKCα	44
3.6. MODELL FÜR DIE KERNTRANSLOKATION VON PROTEINKINASE Cα	46
3.7. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK	48
3.8. SUMMARY	50
4. MATERIAL & METHODEN	51
4.1. ZELLKULTUR	51
4.1.1. Sf9-Insektenzellen.....	51
4.1.2. Transfektion von Sf9-Insektenzellen.....	51
4.1.3. Amplifikation rekombinanter Baculoviren.....	52
4.1.4. Plaque-Assay.....	53
4.1.5. Zellkultur der Säugerzellen.....	53
4.1.6. Transfektion von Zellen.....	54
4.2. PROTEINEXPRESSION IN <i>E. COLI</i>	54
4.3. PROTEINREINIGUNG	55

4.3.1. Reinigung von Proteinen aus <i>E. coli</i>	55
4.3.2. Sf9-Aufarbeitung für Western Blot und Aktivitätstest	56
4.3.3. Reinigung von GFP-PKC α und GST-His-PKC α	56
4.4. PKC-AKTIVITÄTSTEST	57
4.5. IN VITRO TRANSPORTTEST	58
4.6. PROTEIN-BESTIMMUNG	60
4.7. GELELEKTROPHORESE VON PROTEINEN	60
4.8. WESTERN BLOT	61
4.8.1. <i>Blotting</i> nach dem <i>Semidry</i> -Verfahren	61
4.8.2. Proteinfärbung auf der Blotmembran	61
4.8.3. Immunoblots	62
4.9. FLUORESCENZMIKROSKOPIE	62
4.10. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	63
4.10.1. Anzucht von Bakterien	63
4.10.2. Alkoholfällung von DNA	64
4.10.3. Analytische Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	64
4.10.4. Präparative Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i>	65
4.10.5. DNA-Konzentrationsbestimmung	65
4.10.6. Agarosegelelektrophorese	65
4.10.7. DNA-Elution aus Gelen	66
4.10.8. Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	66
4.10.9. Ligation von DNA-Fragmenten	66
4.10.10. Herstellung kompetenter <i>E. coli</i>	67
4.10.11. <i>E. coli</i> -Transformation	67
4.10.12. Mutagenese	67
4.10.13. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	68
4.10.14. DNA-Sequenzierung	68
4.10.15. Herstellung der Vektoren	69
5. LITERATUR	72
6. ANHANG	82
6.1. LEBENS LAUF	82
6.2. VERÖFFENTLICHUNGEN	83
6.3. DANKSAGUNGEN	84
6.4. ABKÜRZUNGEN	85