

# 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

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

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 $\alpha$ und GST-His-PKC $\alpha$ .....	56
<b>4.4. PKC-AKTIVITÄTSTEST .....</b>	<b>57</b>
<b>4.5. IN VITRO TRANSPORTTEST .....</b>	<b>58</b>
<b>4.6. PROTEIN-BESTIMMUNG .....</b>	<b>60</b>
<b>4.7. GELEKTROPHORESE VON PROTEINEN .....</b>	<b>60</b>
<b>4.8. WESTERN BLOT .....</b>	<b>61</b>
4.8.1. Blotting nach dem <i>Semidry</i> -Verfahren .....	61
4.8.2. Proteinfärbung auf der Blotmembran .....	61
4.8.3. Immunoblots .....	62
<b>4.9. FLUORESCENZMIKROSKOPIE .....</b>	<b>62</b>
<b>4.10. MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN .....</b>	<b>63</b>
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
<b>5. LITERATUR .....</b>	<b>72</b>
<b>6. ANHANG .....</b>	<b>82</b>
<b>6.1. LEBENSLAUF .....</b>	<b>82</b>
<b>6.2. VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>83</b>
<b>6.3. DANKSAGUNGEN .....</b>	<b>84</b>
<b>6.4. ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>85</b>