

Immunozytochemische und biochemische Untersuchungen von Kernhüllen-Antigenen des Huhns

Doctoral Thesis

Author(s):

Bailer, Susanne Margarete

Publication date:

1990

Permanent link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000578019>

Rights / license:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#)

Diss. ETH Nr. 9127

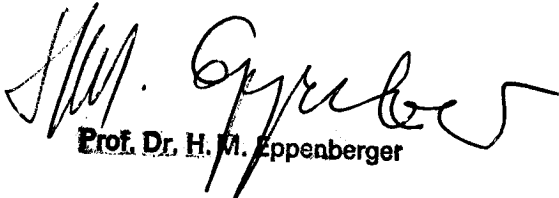
IMMUNOZYTOCHEMISCHE UND BIOCHEMISCHE
UNTERSUCHUNGEN VON KERNHÜLLEN-ANTIGENEN
DES HUHNS

Abhandlung
zur Erlangung des Titels einer
Doktorin der Naturwissenschaften
der
Eidgenössischen Technischen Hochschule
Zürich

vorgelegt von
Susanne Margarete Bailer
Diplom-Biologin
Universität Ulm, BRD
geboren am 18. April 1959
aus Hüttisheim, BRD

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. H. M. Eppenberger, Referent
PD Dr. E. A. Nigg, Koreferent

1990


Prof. Dr. H. M. Eppenberger

ZUSAMMENFASSUNG

Die Kernhülle, die sich aus der doppelten Kernmembran, den Porenkomplexen und der Lamina zusammensetzt, trennt zytoplasmatische und nukleäre Aktivitäten voneinander. Die äussere Kernmembran ist ein Ort der Membran-gebundenen Proteinsynthese, die innere Kernmembran dagegen dient der Verankerung der Lamina und ist somit für die Organisation des Interphasechromatins und die dynamische Veränderung der Kernhülle während des Zellzyklus von Bedeutung. Um die Architektur der Kernhülle zu studieren, wurden monoklonale Antikörper selektioniert, die Proteine der Kernhülle erkennen. Drei Antikörper, R7, P1 und U5, wurden im Detail charakterisiert.

Der R7-Antikörper färbte die Kernhülle gleichmässig und identifizierte ein extraktionsresistentes, integrales Membranprotein (54/55kDa), das sich ausschliesslich an der Innenseite der Kernmembran befand. Aufgrund seiner immunzytochemischen und biochemischen Kolo-kalisation mit der Kernlamina wurde für das R7-Antigen eine Interaktion mit der Lamina postuliert. Tatsächlich ist es gelungen, die in vitro-Bindung von Laminproteinen an ein Kernhüllenprotein nachzuweisen, das mit grösster Wahrscheinlichkeit dem R7-Antigen entspricht. Die Fähigkeit dieses Kernmembranproteins, sowohl in vitro translatiertes Lamin A als auch B₂ zu binden, ist gute Evidenz dafür, dass das R7-Antigen als Rezeptor für die Isopren-Modifikation der Laminproteine dienen und dadurch den Einbau von neusynthetisierten Laminproteinen ermöglichen könnte. Dass es sich nicht um einen Lamin B-Rezeptor im engeren Sinne handeln kann, wird zudem aus der ungleichen Gewebeverteilung von Lamin B₂ und dem R7-Antigen ersichtlich. Während der Interphase teilungsaktiver Zellen trat das R7-Antigen in zwei Varianten auf, einer phosphorylierten 55kDa- sowie einer nicht phosphorylierten 54kDa-Form. Da nur die nicht phosphorylierte Variante extraktionsresistent war, scheint das R7-Antigen in Abhängigkeit von der Phosphorylierung mit der Lamina zu interagieren. In mitotischen Zellen konnte nur die solubilisierbare, phosphorylierte Variante des R7-Antigens gefunden werden, was bedeuten könnte, dass das R7-Antigen während der Mitose vom Lamin B₂ dissoziiert vorliegt. Diese Hypothese wird durch immunzytochemische Studien gestützt, wonach das Membran-assoziierte R7-Antigen in der Telophase unabhängig von den Laminproteinen wieder in die Kernperipherie zurückkehrte.

Beim P1-Antigen (82kDa) handelt es sich ebenfalls um ein extraktionsresistentes, integrales Membranprotein der Kernhülle, das aber sowohl in beiden Kernmembranen als auch im Zytoplasma lokalisiert werden konnte. Die

Membran-Verankerung geschieht mittels eines etwa 12kDa grossen Fragments, während das verbleibende 70kDa-Fragment für die Interaktion mit der Porenkomplex-Lamina verantwortlich zu sein scheint. Die auffällig unregelmässige Immunfluoreszenzfärbung der Kernhülle und die biochemischen Eigenschaften lassen vermuten, dass es sich beim P1-Antigen um ein Porenkomplex-Protein handelt, das aber im Gegensatz zu allen bisher identifizierten Porenkomplex-Proteinen nicht glykosyliert ist. Allerdings gibt es auch Hinweise dafür, dass das P1-Antigen mit den Laminproteinen verwandt sein könnte, was insbesondere im ähnlichen Peptidmuster des P1-Antigens und des Lamin A-Vorläufers zum Ausdruck kommt. Am Ende der Mitose wanderte das P1-Antigen jedoch unabhängig von den Laminproteinen an die Kernperipherie zurück. Zudem war es sowohl in Inter- als auch Metaphasezellen extraktionsresistent.

Der U5-Antikörper identifizierte eine ganze Familie von Proteinen; von besonderem Interesse waren mehrere strukturell verwandte, hochmolekulare Proteine (190-250kDa), die ausschliesslich an der Innenseite der Kernhülle nachweisbar waren und möglicherweise durch rasch stattfindende posttranslationelle Modifikationen gebildet werden. Aufgrund ihrer Sensitivität gegenüber Nukleasen und hoher Salzkonzentration sowie ihrer ultrastrukturellen Lokalisierung konnte ausgeschlossen werden, dass es sich um Porenkomplex-Proteine handelt. Vielmehr scheinen die U5-Antigene an der Verankerung des Chromatins während der Interphase bzw. an der Kondensation des Chromatins in der Prophase beteiligt zu sein. Während späterer Stadien der Mitose liegen sie allerdings in gelöster Form vor. Neben den hochmolekularen Kernproteinen erkannte der U5-Antikörper ein 90kDa-, mit Mannose-Resten modifiziertes Protein, das möglicherweise in der Plasmamembran lokalisiert ist, sowie ein 116kDa grosses, an der Zelloberfläche exponiertes Protein. Wie es zu der immunologischen Verwandtschaft dieser Proteine kommt, ist noch nicht geklärt; umfassendere strukturelle Ähnlichkeiten sowie Modifikationen durch Zuckerreste konnten jedoch bereits als Ursache ausgeschlossen werden.

SUMMARY

The nuclear envelope which separates cytoplasmic and nuclear activities, is composed of the double nuclear membrane, pore complexes, and the lamina. Whereas the outer nuclear membrane is active in membrane-bound protein synthesis, the inner nuclear membrane provides an anchor for the nuclear lamina and therefore is involved in the organization of interphase chromatin. In addition, it is thought to be important for dynamic changes in nuclear envelope structure during the cell cycle. To elucidate the architecture of the nuclear envelope, monoclonal antibodies were screened for recognition of nuclear envelope-associated proteins. Three antibodies, R7, P1 and U5 were characterized in detail.

The antibody R7 stained the nuclear envelope uniformly and identified an integral membrane protein (54/55kDa) resistant to extraction and located exclusively at the inside of the nuclear membrane. Based on its immunocytochemical and biochemical colocalization with the nuclear lamina, the R7 antigen was postulated to interact with the nuclear lamina. In fact, using an in vitro binding assay lamin proteins were shown to bind to a nuclear envelope-associated protein, most probably identical with the R7 antigen. As judged from its ability to bind both in vitro translated lamin A and B₂, the R7 antigen is a putative receptor for isoprenoid residues of lamin proteins, mediating integration of newly synthesized lamin proteins. Considering the unequal distribution of lamin B₂ and the R7 antigen in various tissues, the latter is unlikely to function as a receptor for lamin B only. During interphase of rapidly growing cells, R7 antigen exists in two variants, a phosphorylated 55kDa form and a non-phosphorylated 54kDa form. Only the non-phosphorylated protein was resistant to extraction indicating that interaction of R7 antigen with the nuclear lamina is dependent on phosphorylation. In mitotic cells only the soluble non-phosphorylated variant was found, suggesting that during mitosis R7 antigen is dissociated from lamin B₂. This hypothesis is supported by the finding that in telophase the membrane-associated R7 antigen is reintegrated into the nuclear periphery independently from lamin proteins.

The P1 antigen (82kDa) was also found to be an extraction-resistant integral membrane protein located at the nuclear envelope. In contrast to the R7 antigen, P1 antigen is located in both nuclear membranes and in the cytoplasm. Whereas a fragment of approximately 12kDa was shown to be anchored in the membrane, a 70kD fragment seems to be responsible for interaction with the pore complex lamina. Because of the strikingly discontinuous immunofluorescence staining of

the nuclear envelope and its biochemical properties, P1 antigen is an attractive candidate for a pore complex protein. In contrast to all so far identified pore complex proteins, P1 antigen is not glycosylated. However, we have evidence for P1 antigen being related to the lamin proteins as it revealed peptide patterns similar to the lamin A precursor. Nevertheless, after mitosis, P1 antigen becomes incorporated into the reassembling nuclear envelope independently from lamin proteins. In addition, P1 antigen was shown to be resistant to extraction throughout the entire cell cycle.

The antibody U5 recognized a family of proteins; interest was focused on several structurally related high molecular weight proteins (190-250kDa). They were shown to be located at the inside of the nuclear envelope exclusively. They may be formed by posttranslational modifications which take place rapidly. As judged from their sensitivity to both nucleases and high salt as well as their localization these proteins are unlikely to be components of the pore complex. Rather, they seem to be involved in anchoring of chromatin during interphase and condensation of chromatin in prophase. Later in mitosis they were found to be soluble. Besides the high molecular weight proteins, U5 recognized a 90kDa protein modified by mannose residues and probably located at the plasma membrane. Furthermore, U5 identified a 116kDa protein exposed at the cell surface. The basis of the immunological relationship of these proteins is still unclear; extended structural similarities and modification by sugar residues could so far be excluded.