

**Rolle der CaM Kinase II bei der Umgestaltung des
Nervensystems während der Metamorphose von**
Manduca sexta

Dissertation

zur Erlangung des Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

Peter Burkert

Freie Universität Berlin

Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

Institut für Biologie

Abteilung Neurobiologie

Dezember 2004

Diese Arbeit ist in der Nachwuchsgruppe von Herrn Dr. Carsten Duch an der Freien Universität Berlin, Institut für Biologie, Abteilung Neurobiologie angefertigt worden.



Erstgutachter: Prof. Dr. Hans-Joachim Pflüger

Zweitgutachter: Prof. Dr. Ulrich Müller

Tag der Disputation: 28.01.2005

0. Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
1.1.	Kalzium als intrazellulärer Botenstoff	1
1.2.	Intrazelluläre Kalzium-Sensoren	2
1.3.	CaM Kinase II	3
1.4.	Die Isoformen der CaM Kinase II	3
1.5.	Monomerstruktur und Aktivierung	4
1.6.	Intrazelluläre Substrate	6
1.7.	Rolle bei Entwicklung, neuronaler Plastizität und Lernen	7
1.8.	<i>In vivo</i> - und <i>in vitro</i> -Studien in verschiedenen Systemen	11
1.9.	CaM Kinase II in <i>Manduca sexta</i>	15
2.	Material und Methoden	20
2.1.	Methoden	20
2.1.1.	Tierzucht	20
2.1.2.	Agaroseschnitte	20
2.1.3.	Retrograde Färbungen („backfills“)	20
2.1.4.	Intrazelluläre Färbungen	21
2.1.5.	Immunhistochemie	21
2.1.6.	Konfokale Mikroskopie	22
2.1.7.	Isolation von CaM Kinase II aus Nervengewebe	23
2.1.8.	Messung der CaM Kinase II-Aktivität	23
2.1.9.	Messung der Proteinkinase A-Aktivität	27
2.1.10.	<i>In vivo</i> Injektionen von Pharmaka während der normalen Entwicklung	29
2.1.11.	Western Blot	30
2.2.	Material	31
2.2.1.	Puffer und Lösungen	31
2.2.2.	Chemikalien	34

INHALTSVERZEICHNIS

2.2.3.	Antikörper und Enzyme	35
2.2.4.	Verbrauchsmaterial	36
2.2.5.	Geräte	36
2.2.6.	Software	37
3.	Ergebnisse	38
3.1.	Charakterisierung der neuronalen CaM Kinase II aus <i>Manduca sexta</i>	38
3.2.	Pharmakologische Inhibition von CaM Kinase II	41
3.3.	Änderungen der CaM Kinase II Aktivität während der Entwicklung	43
3.4.	Änderungen der PKA Aktivität während der Entwicklung	45
3.5.	Inhibition von Ca ²⁺ -Kanälen und ihr Effekt auf die CaM Kinase II Aktivität	46
3.6.	Änderungen der Verteilung der CaM Kinase II während der Metamorphose	49
3.7.	Änderungen der prä- und postsynaptischen CaM Kinase II Lokalisation	56
3.8.	Intrazelluläre Verteilung der CaM Kinase II in den Stadien W4 und P4	61
3.9.	Morphologischer Effekt von pharmakologischer Inhibition der CaM Kinase II	65
4.	Diskussion	74
4.1.	Eigenschaften der neuronalen CaM Kinase II aus <i>Manduca sexta</i>	75
4.2.	Änderungen von Aktivität und Expression der CaM Kinase II	76
4.3.	Änderungen der prä- und postsynaptischen Lokalisation von CaM Kinase II	79
4.4.	Änderungen der Aktivität der Proteinkinase A	81
4.5.	Wechselwirkungen zwischen CaM Kinase II und PKA	81
4.6.	Andere Kalzium-abhängige Enzyme	83
4.7.	Pharmakologische Inhibition der CaM Kinase II	84
4.8.	Wie beeinflusst CaM Kinase II das Wachstum von Nervenzellen?	85
4.9.	Schlußbetrachtung	86
4.10.	Ausblick	87
5.	Zusammenfassung/ Summary	89
5.1.	Zusammenfassung	89
5.2.	Summary	91

INHALTSVERZEICHNIS

6.	Anhang	93
6.1.	Literatur	93
6.2.	Verwendete Abkürzungen	103
6.3.	Danksagung	105
6.4.	Erklärung	106