

Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin-Buch

Forschungsgruppe Entwicklungsneurobiologie

Leiter: Prof. Dr. Fritz G. Rathjen

**Untersuchungen zur Funktion der cGMP-abhängigen Kinase I $\alpha$   
während der Entwicklung des Nervensystems**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

des Doktors der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie

der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

**Susanne Schäffer**

aus Magdeburg

Berlin, im Februar 2006

**1. Gutachter:** Prof. Dr. Fritz G. Rathjen

**2. Gutachter:** Prof. Dr. Gary R. Lewin

**Disputation am:** 15.05.2006

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1. Axonale Wegfindung .....	1
1.2. cGMP .....	3
1.3. cGMP-abhängige Proteinkinasen.....	4
1.4. Substrate und Funktion der cGKI im Nervensystem .....	6
1.5. Funktion der cGKI in der Wegfindung sensorischer Axone.....	7
1.6. Aufgabenstellung .....	8
<b>2. Material und Methoden</b> .....	<b>10</b>
2.1. Material .....	10
2.1.1. Chemikalien, Enzyme und Labormaterialien.....	10
2.1.2. Verwendete Antikörper .....	10
2.1.2.1. Primäre Antikörper.....	10
2.1.2.2. Sekundäre Antikörper .....	11
2.1.3. Verwendete Programme und Datenbanken.....	11
2.1.4. Versuchstiere .....	11
2.2. Methoden.....	12
2.2.1. Histologische Methoden.....	12
2.2.1.1. Beschichtung von Objektträgern mit Gelatine .....	12
2.2.1.2. Anfertigung von Gewebeschnitten.....	12
2.2.1.3. Immunhistochemie an Gewebeschnitten.....	12
2.2.1.4. Modifizierte Bielschowsky-Färbung für die Zellkörper- und Faserfärbung... 13	
2.2.1.5. Ganzkörperfärbungen von Embryonen/ „whole-mount staining“ .....	14
2.2.1.6. Immunzytologie .....	15
2.2.2. Biochemische Methoden .....	15
2.2.2.1. Gewinnung von Proteinextrakten aus Geweben .....	15
2.2.2.2. Gewinnung von Proteinextrakten aus Zelllinien.....	16
2.2.2.3. Gewinnung der Zytosol- und Membran-Fraktion von HEK293-Zellen .....	16
2.2.2.4. Gewinnung der Kern-Fraktion von HEK293-Zellen .....	16
2.2.2.5. Präparation und Stimulation von Spinalganglien mit 8-pCPT-cGMP .....	17
2.2.2.6. Dephosphorylierung mit $\lambda$ – Protein-Phosphatase.....	18
2.2.2.7. SDS–PAGE und Western Blot.....	18
2.2.2.7.1. Dokumentation und Quantifizierung der Blots .....	19
2.2.2.8. Immunpräzipitation .....	19
2.2.3. Molekularbiologische Methoden.....	20
2.2.3.1. Genotypisierung .....	20
2.2.3.1.1. Isolierung genomischer DNA.....	20
2.2.3.1.2. Primer/Oligonukleotide .....	20
2.2.3.1.3. PCR .....	20
2.2.3.2. Isolierung von DNA-Fragmenten.....	21
2.2.3.2. Plasmid-DNA Präparation.....	22
2.2.3.3. Transformation .....	22
2.2.3.3.1. Chemokompetente E.coli DH5 $\alpha$ .....	22
2.2.3.3.2. Transformation von DH5 $\alpha$ .....	22
2.2.3.4. Transfektion der Zelllinie COS 7 mit Lipofectamine 2000 .....	22
2.2.4. Zweihybrides Hefesystem .....	23
2.2.4.1. Hefestämme.....	24
2.2.4.2. cDNA-Bibliothek .....	24
2.2.4.3. Plasmide .....	25

2.2.4.4. Lösungen, Medien und Agar .....	25
2.2.4.5. Sequentielle Kotransformation.....	26
2.2.4.5.1. Vorbereitung kompetenter Hefezellen .....	26
2.2.4.5.2. Transformation der Hefe mit der Sonde (BD-Fusionsplasmid).....	26
2.2.4.5.3. Vorbereitung der Hefezellen für die zweite Transformationsstufe .....	27
2.2.4.5.4. Transformation der Hefe mit der cDNA-Bibliothek .....	27
2.2.4.5.5. Bestimmung der Transformationseffizienz.....	27
2.2.4.6. Simultane Kotransformation .....	28
2.2.4.7. $\beta$ -Galaktosidase Filtertest.....	28
2.2.4.8. Plasmidisolierung aus Hefezellen .....	28
2.2.4.9. Transformation der Plasmid-DNA in Bakterien .....	29
2.2.4.9.1. Vorbereitung elektrokompeter Bakterien.....	29
2.2.4.9.2 Transformation durch Elektroporation.....	29
2.2.4.10. Gewinnung der Plasmid-DNA aus transformierten <i>E. coli</i> HB 101 .....	29
2.2.4.11. Sequenzierung der Plasmid-DNA .....	30
2.2.5. Zweidimensionale Gelelektrophorese .....	30
2.2.5.1. Probenaufbereitung und Proteinbestimmung.....	31
2.2.5.2. Erste Dimension: Isoelektrische Fokussierung .....	32
2.2.5.3. Rehydratisierung .....	32
2.2.5.4. Equilibrierung der IPG-Streifen .....	34
2.2.5.5. Zweite Dimension: SDS-PAGE.....	34
2.2.5.6. Färbung der 2D Gele .....	35
2.2.5.6.1. Silberfärbung von Polyacrylamidgelen.....	35
2.2.5.6.2. Färbung von Polyacrylamidgelen mit Coomassie.....	35
2.2.5.6.3. Phosphoproteinfärbung von Polyacrylamidgelen .....	36
2.2.5.7. Dokumentation und Auswertung der 2D Gele.....	36
2.2.5.7.1. Dokumentation .....	36
2.2.5.7.2. Auswertung und Quantifizierung.....	37
2.2.5.7.3. Proteinspotidentifizierung .....	38
<b>3. Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
3.1. Expression der cGMP-abhängigen Kinase I im Nervensystem der Maus .....	39
3.1.1. Expression der cGKI $\alpha$ im Nervensystem der Maus .....	39
3.1.1.1. Expression der cGKI $\alpha$ in den Hirnnerven .....	39
3.1.1.2. Expression der cGKI $\alpha$ im Mesencephalon .....	44
3.1.1.3. Expression der cGKI $\alpha$ im Notochord, in den Spinalganglien und im Rückenmark .....	44
3.1.1.4. Expression der cGKI $\alpha$ im sich entwickelnden olfaktorischen System.....	46
3.1.1.5. Expression der cGKI $\alpha$ im sich entwickelnden Auge.....	47
3.1.1.6. Expression der cGKI $\alpha$ in den Purkinje-Zellen des Cerebellums .....	48
3.1.1.7. Postnatale Expression der cGKI $\alpha$ in weiteren Hirnstrukturen.....	49
3.1.2. Expression der cGKI $\beta$ im Nervensystem der Maus.....	50
3.2. Analyse cGKI $\alpha$ -positiver Strukturen hinsichtlich morphologischer Veränderungen in cGKI-defizienten Mäusen .....	51
3.2.1. Analyse der Spinalganglien.....	51
3.2.2. Analyse der peripheren spinalen Innervation.....	53
3.2.3. Analyse der Hirnnerven .....	55
3.2.4. Analyse der präganglionären sympathischen Neurone .....	57
3.2.5. Analyse des Hippocampus .....	59
3.2.6. Analyse des Bulbus olfactorius .....	60
3.2.7. Analyse des Cerebellums .....	61

3.3. Untersuchung bekannter und putativer cGKI-Substrate hinsichtlich einer Beteiligung an der axonalen Wegfindung.....	62
3.3.1. Untersuchung von CRP2 (Cysteine-rich Protein 2).....	62
3.3.2. Untersuchung von Myosin IIB bzw. der Myosinphosphatase.....	64
3.3.3. Untersuchung von VASP (Vasodilator-stimulated phosphoprotein).....	65
3.3.3.1. Untersuchungen zur cGKI-abhängigen VASP-Phosphorylierung in embryonalen Spinalganglien.....	66
3.3.3.1.1. Ermittlung der optimalen Stimulationszeit mit 8-pCPT-cGMP.....	67
3.3.3.1.2. Dephosphorylierung von VASP mit der $\lambda$ - Protein-Phosphatase.....	68
3.3.3.1.3. Vergleichende Untersuchung zur VASP-Phosphorylierung in WT- und cGKI-defizienten Spinalganglien.....	68
3.3.3.2. Untersuchung der zentralen Projektion der Spinalganglienaxone in VASP-defizienten Mäusen.....	70
3.4. Suche nach Interaktionspartnern der cGKI.....	72
3.4.1. Untersuchungen des Cerebellum-Proteoms von cGKI-defizienten und WT-Mäusen mittels Zweidimensionaler Gelelektrophorese.....	72
3.4.1.1. Vergleichende Untersuchungen zur Proteinexpression in cGKI-defizienten und Wildtyp-Mäusen.....	72
3.4.1.2. Vergleichende Untersuchungen zum Phosphorylierungsmuster im Cerebellum cGKI-defizienter- und Wildtyp-Mäuse.....	75
3.4.2. Suche nach intrazellulären Interaktionspartnern der cGKI $\alpha$ im Zweihybriden Hefesystem.....	80
3.4.2.1. Analyse der primärpositiven Klone.....	81
3.4.2.2. Sequenzanalyse.....	82
3.4.2.2.1. Sequenzanalyse der Klone 4 und 8.....	82
3.4.2.2.2. Sequenzanalyse von Klon 13.....	84
3.4.2.3. Verifizierung der Interaktion von cGKI $\alpha$ und Dnmt3a1 mittels Immunpräzipitation.....	86
3.4.2.4. Untersuchung zur Expression der Dnmt3a1 und Dnmt3a2 im Nervensystem.....	89
3.4.2.5. Untersuchungen zur subzellulären Verteilung der Dnmt3a und cGKI $\alpha$ .....	90
3.4.2.6. Untersuchungen zur Interaktion der cGKI $\alpha$ mit anderen Mitgliedern der DNA-Methyltransferasen.....	94
3.4.2.6.1. Dnmt1, nicht Dnmt3b1 kann cGKI $\alpha$ in COS 7-Zellen kopräzipitieren... 96	
3.4.2.6.2. Untersuchungen zur subzellulären Verteilung der Dnmt1 und cGKI $\alpha$ .... 98	
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>100</b>
4.1. Expression der cGMP-abhängigen Kinasen im Nervensystem.....	100
4.1.1. Hirnnerven.....	102
4.1.2. Spinalganglien und Rückenmark.....	104
4.1.2.1. Gibt es Mausmodelle die ähnliche Wegfindungsfehler sensorischer Axone aufweisen?.....	106
4.1.3. Präganglionäre sympathische Neurone.....	107
4.1.4. Notochord (Chorda dorsalis).....	108
4.1.5. Bulbus olfactorius.....	108
4.1.6. Hippocampus.....	109
4.1.7. Cerebellum.....	110
4.2. Untersuchung bekannter und putativer Substrate der cGK.....	112
4.2.1. CRP2 (Cysteine-rich protein family).....	112
4.2.2. Myosin IIB und Myosinphosphatase.....	113
4.2.3. VASP (Vasodilator-stimulated phosphoprotein).....	116

4.3. Suche nach Interaktionspartnern der cGKI bzw. cGKI $\alpha$ .....	119
4.3.1. Untersuchungen zur Proteinexpression und Phosphorylierung im Cerebellum mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese .....	120
4.3.1.1. Unterschiede in der Proteinexpression cGKI-defizienter Mäuse .....	120
4.3.1.1.1. B22-Untereinheit der NADH-Q-Reduktase (Ndufb9) und D-Kette der mitochondrialen ATP-Synthase (ATP5H) .....	121
4.3.1.1.2. Glutathion S-Transferase omega 1 (GSTO1-1) .....	121
4.3.1.1.3. ADP-Ribosylierungsfaktor-ähnliches Protein 3 (Arl3) .....	122
4.3.1.2. Untersuchungen zum Phosphorylierungsmuster .....	122
4.3.1.3. Anmerkungen zur Methode .....	123
4.3.2. Suche nach intrazellulären Interaktionspartnern der cGKI $\alpha$ im Zweihybriden Hefesystem .....	124
4.3.2.1. Hydroxysteroidsulfotransferase 2b1b (Sult2b1b) .....	125
4.3.2.2. DNA-Methyltransferase 3 (Dnmt3a) .....	126
4.3.2.2.1. DNA-Methylierung und DNA-Methyltransferasen .....	126
4.3.2.2.2. Interaktion der cGKI $\alpha$ mit der Dnmt3a1 .....	127
4.3.2.2.2.1. Expression der Dnmt3a1 und Dnmt3a2 im Nervensystem .....	128
4.3.2.2.2.2. Subzelluläre Verteilung der cGKI $\alpha$ und der Dnmt3a .....	128
4.3.2.2.3. cGKI $\alpha$ und die Dnmt1 .....	130
4.3.2.2.4. cGKI $\alpha$ und die DNA-Methyltransferasen .....	130
4.3.2.2.5. DNA-Methylierung und transkriptionelle Inaktivierung .....	131
4.3.2.2.6. cGK und Genexpression .....	132
4.3.2.2.7. Rolle der DNA-Methyltransferasen und der DNA-Methylierung im Nervensystem .....	133
<b>5. Zusammenfassung/ Summary .....</b>	<b>135</b>
5.1. Zusammenfassung .....	135
5.2. Summary .....	137
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>140</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>156</b>
<b>8. Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>158</b>
<b>9. Lebenslauf .....</b>	<b>160</b>
<b>10. Erklärung .....</b>	<b>161</b>