Leda Dimou (Autor)

Die neuronalen Proteolipide M6a und M6b

Eine funktionale Analyse in vivo & in vitro

https://cuvillier.de/de/shop/publications/3609

Copyright:
Cuvillier Verlag, Inhaberin Annette Jentzsch-Cuvillier, Nonnenstieg 8, 37075 Göttingen, Germany
Telefon: +49 (0)551 54724-0, E-Mail: info@cuvillier.de, Website: https://cuvillier.de

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen VI

Abbildungsverzeichnis VIII

I. Einleitung

1. Neurone und Axonwachstum 1
2. Oligodendrozyten und Myelin 3
3. Das Proteolipid Protein (PLP) 6
4. Mutationen im PLP-Gen und PLP-defiziente Mäuse 7
5. Die Proteolipid-Genfamilie 9
6. M6A / EMA (*E*dge *M*embrane *A*ntigen) 11
7. Das Zelloberflächenprotein M6B 13
8. Zielsetzung der Dissertation 16

II. Ergebnisse

1. Lokalisation von M6B 18
    1.1 M6B-Expression in primären Zellen 18
        1.1.1 M6B-Expression in Neuronen 19
        1.1.2 M6B-Expression während der Oligodendrozyten-Differenzierung 21

2. Expressionsanalyse von M6B-Isoformen 23
    2.1 Expressionsanalyse der M6B-RNA 23
        2.1.1 Northern Blot-Analyse 23
        2.1.2 Regulierte M6B-mRNA-Expression während der Gehirnentwicklung der Maus 24
        2.1.3 Expression der M6B-mRNA während der Oligodendrozyten-Differenzierung 26
    2.2 Herstellung von isoformspezifischen M6B-Antiseren 28
        2.2.1 Western Blot Analyse der Seren 28
        2.2.2 Immunzytochemische Analyse der Seren 30
    2.3 Molekulare Klonierung eukaryontischer M6B-Expressions-konstrukte 32
    2.4 Expression von M6B-Isoformen in heterologen Zellen 34

3. Ausläuferbildung nach M6B-Überexpression 35
3.1 Endogene Expression von M6B in PC12-Zellen in An- oder Abwesenheit von NGF 36
3.2 Überexpression von M6B in PC12-Zellen 37
3.3 Die Ausbildung der Ausläufer ist spezifisch für M6B 39
3.4 Zelltyp unabhängige Ausläuferbildung 40
3.5 Entstehen die Filopodien aufgrund der Aktivierung einer Signaltransduktionskaskade? 41

4. Analyse von M6A- und M6B-defizienten Mäusen 46
4.1 Analyse M6A-, M6B- und M6A*M6B-defizienter Neuronen *in vitro* 46
4.2 Phänotypische Analyse M6A- und M6A*M6B-defizienter Mäuse 49

5. Interaktion von M6B mit dem Proteolipid Protein 50
5.1 Transport von *jimpy*-PLP wird durch N-terminale Modifikationen beeinflusst 52
5.2 Einführung von Mutationen im M6B-Protein 53

III. Diskussion

1. Funktion von Proteolipiden: eine Übersicht 55
2. Ausläuferbildung nach M6B-Überexpression 57
2.1 Endogene M6B-Expression in PC12-Zellen 57
2.2 Zelluläre Überexpression induziert die Bildung von Ausläufern 58
2.2.1 NGF hat keinen Einfluss auf die M6B-induzierte Ausläuferbildung 58
2.2.2 M6B-bedingte Ausläuferbildung ist unabhängig von der überexprimierten M6B-Isoform 59
2.2.3 Ausläuferbildung durch M6B ist auch in primären Hippocampus-Neuronen zu beobachten 60
2.2.4 Die Ausläuferbildung ist spezifisch für M6B 61
2.3 Handelt es sich bei diesen induzierten Ausläufern um Filopodien? 61
2.4 Mögliche Mechanismen der Ausläuferentstehung 63
3. Analyse M6A*M6B-defizienter Mäuse 66
3.1 Motorische Fähigkeiten doppeldefizienter Tiere nehmen im Alter ab 68
4. *jp*-PLP als Mittel um die Interaktion zwischen Proteolipiden zu zeigen 70
5. Der Transport von *jp*-PLP wird durch N-terminale Modifikationen beeinflusst 71

IV. Material

1. Chemikalien 74
1.1 Allgemeine Chemikalien 74
1.2 Zellkultur-Chemikalien 74
2. Verbrauchsmaterial 75
2.1 Allgemeines Verbrauchsmaterial 75
2.2 Zellkultur-Verbrauchsmaterial 76
3. Geräte 76
4. Lösungen und Puffer 77
4.1 Lösungen für die Gelelektrophorese 77
4.2 Lösungen für RNA-Präparationen und Nothern Blot Hybridisierung 77
4.3 Sonstige Puffer und Lösungen 78
5. Medien 79
5.1 Medien zur Bakterienkultivierung 79
5.2 Zellkulturmedien 79
6. Immunzytochemie 82
7. Proteinbiochemie 82
8. Histochemie 84
9. Reaktionskomplettausstattungen 85
10. Enzyme 85
11. Antikörper 86
12. Tiere, Zellinien, Bakterien und Vektoren 86
12.1 Tiere 86
12.2 Zellinien 87
12.3 Bakterienstämme 87
12.4 Vektoren und Konstrukte 87
13. Größenmarker für DNA und Proteine für die Gelelektrophorese 87
14. Radioaktiv markierte Oligonukleotide 88
15. Oligonukleotide 88
16. Hard- und Software 89

V. Methoden

1. Molekularbiologische Methoden 90
1.1 Präparation und Analyse von Nukleinsäuren 90
1.1.1 Reinigung und Konzentrierung von DNA 90
1.1.2 Plasmidpräparation aus Bakterien 90
1.1.3 Präparation genomischer DNA aus Mausschwanzgewebe 90

1.1.4 Phenol/Chloroform-Präparation von RNA aus Geweben 90
1.1.5 Präparation von RNA aus Geweben 91
1.1.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren 91
1.1.7 Agarose-Gel-Elektrophorese von DNA 92
1.1.8 Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese von DNA 92
1.1.9 Denaturierende Formaldehyd-Gelelektrophorese von RNA 92
1.1.10 Elution von DNA aus Agarose-Gelen 93
1.1.10a Elution von DNA mit NA45 Anionenaustauscherpapier 93
1.1.10b Phenol/Chloroform-Extraktion 93
1.1.11 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten 93
1.1.12 Radioaktive Markierung von Oligonukleotiden und Größenmarkern (Kinasieren) 93
1.1.13 Northern Blot Hybridisierung 94
1.2 Methoden zur molekularen Klonierung 94
1.2.1 Restriktionsverdau von DNA 94
1.2.2 Dephosphorylierung von Vektoren 94
1.2.3 Generierung von blunt-Enden 94
1.2.4 Ligation von DNA-Fragmenten 95
1.2.5 Klonierung von PCR-Produkten 95
1.2.6 Transformation von Bakterien 95
1.2.7 Blau-Weiß-Selektion auf X-Gal/IPTG-Platten 95
1.3 Herstellung von cDNA 95
1.4 Polymerase-Ketten-Reaktion 96
1.4.1 Nicht-quantitative PCRs 96
1.4.2 Semiquantitative radioaktive PCRs 96

2. Zellkultur-Methoden 97
2.1 Kultivierung verschiedener Zellinien 97
2.1.1 Einfrieren und Auftauen von Zellen 97
2.2 Ektopische Expression von Proteinen in verschiedenen Zellinien 97
2.2.1 Kalzium-Phosphat-Transfektion von HeLa-Zellen 98
2.2.2 Elektroporation von kultivierten Zellen 98
2.2.3 ß-Galaktosidase-Test 99
2.3 Präparation von primären Oligodendrozyten und kortikalen Astrozyten 99
2.4 Präparation von Hippocampus-Neuronen der Maus bzw. der Ratte 100

3. Immuncytochemie 100
3.1 Immunfärbung 100
3.1.1 Lebendfärbung von Zellen 100
3.1.2 Färbung von permeabilisierten Zellen 100

4. Methoden zur Proteinanalyse 101
4.1 Herstellung von Zell- und Gewebeextrakten 101

4.1.1 Membranpräparation 101
4.1.2 Gesamtzellextrakte 101
4.1.3 Proteinbestimmung 101
4.1.4 TCA-Präzipitation 102
4.2 Proteinanalyse 102
4.2.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 102
4.2.2 Western Blot Analyse 102
4.2.3 Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen 103
4.3 PathDetect Trans reporting system Stratagene 103
4.4 in vitro Kinasen-Test 103

5. Herstellung polyklonaler Antiseren 104
5.1 Kopplung des Antigenpeptids 104
5.2 Immunisierung 104
5.3 Gewinnung und Aufreinigung von Immunseren 105
5.4 Analyse der Antikörperbindung (ELISA) 105
5.5 Aufreinigung von Antikörpern durch Affinitätschromatographie an Protein A-Sepharose 105

6. Histologische und immunhistochemische Methoden 106
6.1 Ganzkörperfixierung von Mäusen durch Perfusion 106
6.2 Immunhistochemie auf Vibratomschnitten 106

7. Verhaltensbiologie: Rotarod-Test 106

VI. Zusammenfassung 107

VII. Literatur 108