

**Charakterisierung von Rezeptoren
neurotropher Glykosaminoglykane im Rattenhirn**

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Sebastian Franken

aus **Mönchengladbach**

Düsseldorf 2000

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität

Referent: Prof. Dr. Hans Werner Müller

Koreferent: Prof. Dr. Hanns Weiss

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juni 2000

Berichte aus der Biologie

Sebastian Franken

**Charakterisierung von Rezeptoren neurotropher
Glykosaminoglykane im Rattenhirn**

D 61 (Diss. Universität Düsseldorf)

Shaker Verlag
Aachen 2000

Die Deutsche Bibliothek - CIP-Einheitsaufnahme

Franken, Sebastian:

Charakterisierung von Rezeptoren neurotropher Glykosaminoglykane
im Rattenhirn / Sebastian Franken.

Aachen : Shaker, 2000

(Berichte aus der Biologie)

Zugl.: Düsseldorf, Univ., Diss., 2000

ISBN 3-8265-7700-0

Copyright Shaker Verlag 2000

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen
oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungs-
anlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 3-8265-7700-0

ISSN 0945-0688

Shaker Verlag GmbH • Postfach 1290 • 52013 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • eMail: info@shaker.de

«Und wenn auch durch den Nebel nicht viel zu erkennen ist, hat man
doch irgendwie das selige Gefühl, in die richtige Richtung zu blicken.»

Zitat aus: Vladimir Nabokov «Sprich, Erinnerung, sprich»

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Extrazellulärmatrix des Zentralnervensystems	3
2.2	Proteoglykane	4
2.3	Glykosaminoglykane	6
2.4	Proteoglykane des Nervengewebes	9
2.5	Bindungspartner von Glykosaminoglykanen	11
2.6	Ziel der Arbeit	13
3	Material und Methoden	14
3.1	Material und Lösungen allgemein	14
3.1.1	Zentrifugen	14
3.1.2	Häufig verwendete Puffer und Lösungen	14
3.1.3	Tiere	15
3.1.4	Bakterienstämme	15
3.2	Hybridoma-Zellkultur	16
3.2.1	Material und Medien	16
3.2.2	Präparation peritonealer Feeder-Zellen	16
3.2.3	Tiefgefrorene Hybridomazellen auftauen	17
3.2.4	Einfrieren von Hybridomazellen	17
3.2.5	Einzelzellklonierung	18
3.3	Primäre Zellkulturen	19
3.3.1	Material und Medien	19
3.3.2	Neuronale Zellkultur	19
3.3.3	Astrogliale Zellkultur	20

ii Inhaltsverzeichnis

3.4	Proteinpräparation und -bestimmung	21
3.5	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Westernblot	22
3.6	Dot-Blot	22
3.7	Charakterisierung von Hybridomaüberständen	23
3.7.1	Immunhistochemie	23
3.7.2	Immuncytochemie	23
3.7.3	Westernblot mit Hoefer Inkubationskammern	24
3.7.4	Enzymgekoppelter Immunabsorptionsassay (ELISA)	24
3.8	Biochemische Reinigung des Chondroitinsulfat bindenden Proteins 2 (CSBP2) durch Chromatographie und SDS-PAGE	25
3.9	Massenspektrometrische Analysen	26
3.10	Molekularbiologische Arbeiten zum Collapsin response mediator protein-4 (CRMP-4)	28
3.10.1	Primersequenzen für Polymerasekettenreaktion (PCR) und Nukleinsäuresequenzierungen	28
3.10.2	Klonierung der CRMP-4 kodierenden Region mittels PCR	28
3.10.3	Sequenzierung	30
3.10.4	Überexpression von CRMP-4 in E.coli	30
3.10.5	RNA-Präparation und Northernblot-Analyse	32
3.11	Biochemische Arbeiten zu CRMP-4	34
3.11.1	Heparin-Chromatographie	34
3.11.2	Herstellung polyklonaler Antikörper	34
3.11.3	Biotinylierung der polyklonalen Antikörper	35
3.11.4	Immunpräzipitation	35
3.11.5	Quervernetzerexperimente	36

4	Ergebnisse	37
4.1	Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen Chondroitinsulfat bindende Proteine	37
4.1.1	Hintergrund: Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen Chondroitinsulfat bindende Proteine	37
4.1.2	Immunhistochemische Darstellung der CSBPs im Neokortex neugeborener Ratten	40
4.1.3	Immunocytochemische Darstellung der CSBPs an Dissoziationskulturen neuraler Zellen	42
4.1.4	Westernblotanalysen der Expression von CSBP1+2	44
4.2	Isolierung und Identifizierung von CSBP2/CRMP-4	46
4.2.1	Hintergrund: Experimentelle Ansätze zur Identifizierung der Antigene	46
4.2.2	Chromatographische Reinigung von CSBP2	47
4.2.3	Massenspektrometrie (MS)	50
4.3	Klonierung und Expression von CRMP-4	56
4.3.1	Klonierung und Sequenzierung der CRMP-4-cDNA	56
4.3.2	Expression von CRMP-4 in E.coli	61
4.3.3	Expressionsanalyse der CRMP-4 mRNA	64
4.4	Charakterisierung von CRMP-Interaktionen	66
4.4.1	Elutionsverhalten von CRMP in der Heparin-Affinitätschromatographie	66
4.4.2	Nachweis von CRMP-Interaktionen in der nichtreduzierenden SDS-PAGE	67
4.4.3	Herstellung polyklonaler Antikörper gegen CRMP	68
4.4.4	Immunpräzipitationen	70
4.4.5	Nachweis eines membranständigen CRMP-4-Proteinkomplexes durch Quervernetzereperimente	73

5	Diskussion	75
5.1	Herstellung und Charakterisierung monoklonaler Antikörper gegen CS-bindende Proteine	75
5.2	Expression Chondroitinsulfat bindender Proteine	76
5.3	Identifizierung von CSBPs	78
5.4	CRMP und Collapsin	81
5.5	CRMP-Interaktionen	83
5.6	GAG bindende Rezeptorkomplexe mit CRMP-Beteiligung	84
5.7	GAGs und axonale Wegfindung	86
5.8	Ausblick	89
6	Literatur	91
7	Abkürzungen	107
8	Danksagung	109