

**Entwicklung eines direkten fluoreszenzbasierten Stickstoffmonoxid-
Biosensors und Untersuchungen zur Lokalisation der membranassoziierten
Isoform der Stickstoffmonoxid-sensitiven Guanylylcyclase**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften

der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig

zur Erlangung des Grades

einer Doktorin der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

genehmigte

D i s s e r t a t i o n

von Joana Baumgarten

aus Hildesheim

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.1	Der NO/cGMP-Signalweg	9
1.2	cGMP als zellulärer Botenstoff	13
1.3	Die Stickstoffmonoxid-sensitive Guanylylcyclase	13
1.4	Pharmakologische Bedeutung des NO/cGMP-Signalwegs	19
1.5	Das grün fluoreszierende Protein GFP	21
1.6	Genetisch codierte Biosensoren	21
2	Zielsetzung	25
2.1	Untersuchungen zur Lokalisation der NOsGC2	25
2.2	Entwicklung eines direkten NO-Biosensors	25
3	Material und Methoden	26
3.1	Material	26
3.1.1	Geräte und Hilfsmittel	26
3.1.2	Chemikalien und Reagenzien, Puffer, Lösungen und Reagenziensysteme	28
3.1.3	Vektoren und Gene	31
3.1.4	Oligonukleotide und Enzyme	33
3.1.5	Kompetente Zellen und Expressionssysteme, verwendete Medien	34
3.1.6	Antikörper	35
3.1.7	Software	35
3.2	Molekularbiologische Methoden	36
3.2.1	Herstellung kompetenter <i>E.-coli</i> -Bakterien	36
3.2.2	Transformation	36
3.2.3	Plasmid-Präparation	37
3.2.4	Bestimmung der Plasmid-Konzentration	38
3.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	38
3.2.6	Mutagenesen	39

3.2.7	Klonierung der Plasmide zur Untersuchung der Lokalisation der α_2 -Untereinheit..	41
3.2.8	Klonierung der Plasmide zur Entwicklung eines direkten NO-Biosensors.....	42
3.2.9	Überprüfung der Plasmid-DNA.....	49
3.3	Proteinbiochemische Methoden und Kultivierung eukaryotischer Zellen	49
3.3.1	Kultivierung von Zelllinien	49
3.3.2	Proteinbiosynthese der klonierten Konstrukte in eukaryotischen Zellen	50
3.3.3	Cytosolextraktion von HEK293-Zellen.....	52
3.3.4	Bestimmung der Protein-Konzentration nach Bradford	53
3.3.5	SDS-PAGE	53
3.3.6	Western-Blot.....	53
3.3.7	Bestimmung der NOsGC-Aktivität	54
3.4	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie	56
3.4.1	Spektrale Aufnahmen	56
3.4.2	Vier-Kanal-Messungen.....	56
3.4.3	<i>Controlled-Light-Exposure</i> -Mikroskopie	57
3.4.4	Perfusion von HEK293-Zellen	59
3.5	Motif Scan	61
3.6	Statistische Auswertung	61
4	Ergebnisse	62
4.1	Untersuchungen zur Lokalisation der NOsGC2.....	62
4.1.1	Untersuchung der Lokalisation der α_2 -Untereinheit und aminoterminaler Deletionsmutanten	62
4.1.2	Untersuchung der α_2 -Untereinheit hinsichtlich regulatorischer Motive.....	64
4.1.3	Einfluss des SH3-Bindemotivs auf die Lokalisation der α_2 -Untereinheit	65
4.1.4	Cortactin als möglicher Interaktionspartner	68
4.1.5	Charakterisierung von Zell-Zell-Kontakten in verschiedenen Zelllinien.....	69
4.1.6	Untersuchung von α_2 -Krebsmutanten CaCo-2-Zellen.....	72
4.2	Entwicklung eines direkten NO-Biosensors.....	75

4.2.1	Charakterisierung der zirkulär permutierten EGFP-Konstrukte.....	76
4.2.2	Charakterisierung der verbesserten zirkulär permutierten EGFP-Konstrukte.....	78
4.2.3	Spezifische Charakterisierung von $\beta_1\alpha_1$ cpIGFP.....	86
4.2.4	Weiterführende Untersuchung von $\beta_1\alpha_1$ cpIGFP anhand aktivitätsmodulierender Mutationen.....	89
5	Diskussion.....	93
5.1	Untersuchungen zur Lokalisation der NOsGC2.....	93
5.1.1	Lokalisationsverhalten und Interaktionsmöglichkeiten verkürzter Mutanten der α_2 -Untereinheit.....	93
5.1.2	Mögliche Interaktionspartner der NOsGC2.....	97
5.1.3	Einfluss somatischer Mutationen auf das Lokalisationsverhalten der NOsGC2....	102
5.2	Entwicklung eines direkten NO-Biosensors.....	105
5.2.1	Die intrazelluläre Fluoreszenz der entwickelten Konstrukte.....	106
5.2.2	Eignung der klonierten cpIGFP-Konstrukte als direkte NO-Biosensoren.....	111
5.2.3	pH-Abhängigkeit von $\beta_1\alpha_1$ cpIGFP.....	114
5.2.4	Eignung von $\beta_1\alpha_1$ cpIGFP als direkter NO-Biosensor.....	116
6	Zusammenfassung.....	118
7	Literaturverzeichnis.....	119
8	Abkürzungsverzeichnis.....	134
9	Abbildungsverzeichnis.....	139
10	Tabellenverzeichnis.....	141
11	Anhang.....	142