

1. Einleitung

1.1. Kalzium als intrazellulärer Botenstoff

Kalzium ist in Form von Ca^{2+} -Ionen neben zyklischen Nukleotiden wie zyklischem Adenosinmonophosphat („cyclic adenosine monophosphate“, cAMP) als „second messenger“ in zahlreiche intrazelluläre Signalwege in nahezu allen tierischen Zellen involviert. Kalzium-abhängige intrazelluläre Signalwege spielen eine zentrale Rolle bei der aktivitätsabhängigen Kontrolle der Differenzierung und Plastizität von Neuronen im Zentralnervensystem (Malenke *et al.*, 1989; Wong und Gosh, 2002; Libersat und Duch, 2004). Während der Entwicklung des Zentralnervensystems reichen die Änderungen der intrazellulären Kalzium-Konzentration von räumlich begrenzten transienten Erhöhungen innerhalb eines dendritischen Dorns bzw. eines Filopodiums bis hin zu periodischen Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration (Kalzium-Wellen), die durch das gesamte Neuron laufen (Spitzer *et al.*, 2002; Wong und Gosh, 2002; Lohmann *et al.*, 2002). Tierische Zellen verfügen über verschiedene Mechanismen, um die intrazelluläre Kalzium-Konzentration zu regulieren. Hierzu gehören die Kalzium-Freisetzung aus dem Endoplasmatischen Reticulum (Berridge, 1998), der Kalzium-Einstrom aus dem extrazellulären Raum durch liganden- und spannungsabhängige Kalzium-Kanäle (Malinow *et al.*, 1994) und der Kalzium-Einstrom durch den „Natrium-Kalzium-Exchanger“, der darüber hinaus zusammen mit membranständigen, ATP-getriebenen Kalzium-Transportproteinen Kalzium aus dem Cytoplasma transportiert und damit die intrazelluläre Kalzium-Konzentration reguliert; die Transportrichtung hängt vom Membranpotential und den Konzentrationen der beteiligten Ionen innerhalb und außerhalb der Zelle ab (Blaustein und Lederer, 1999). In Nervenzellen konnte darüber hinaus gezeigt werden, daß Aktionspotentiale zum Kalzium-Einstrom durch spannungsabhängige Kalzium-Kanäle in Dendriten führen können: Christie *et al.* (1995) haben mit intrazellulären Ableitungen und Visualisierung der Unterschiede der lokalen Kalzium-Konzentrationen mit dem Kalzium-sensitiven Farbstoff Fura-2 („calcium imaging“) den Beitrag verschiedener Typen von spannungsabhängigen Kalzium-Kanälen zum aktivitätsabhängigen Kalzium-Einstrom untersucht; sie kamen zu dem Ergebnis, daß Kalzium-Kanäle mit hoher Reizschwelle vorwiegend für den Kalzium-Einstrom in den Somata und proximalen Dendriten verantwortlich sind, während durch Kanäle mit niedriger Reizschwelle der Kalzium-Einstrom in distale Dendriten erfolgt und diese daher wahrscheinlich für Kalzium-abhängige neuronale Plastizität die größere Rolle spielen. In einer anderen Studie wurden aktivitätsbedingte zeitliche und räumliche Änderungen des Mem-

branpotentials und der intrazellulären Kalzium-Konzentration mit „calcium imaging“-Experimenten und simultanen „patch clamp“-Ableitungen an Somata und Dendriten untersucht; es konnte gezeigt werden, daß der Einfluß von Aktionspotentialen auf die neuronale Plastizität sowohl vom Verzweigungsgrad der Dendriten als auch vom Muster der neuronalen Aktivität abhängig ist (Spruston *et al.*, 1995). In einer *in situ*-Studie wurden die Änderungen der intrazellulären Kalzium-Konzentration in einem identifizierten Motoneuron des Tabakswärmers *Manduca sexta* während der Metamorphose durch „calcium imaging“-Experimente untersucht; es konnte gezeigt werden, daß bestimmte Phasen postembryonaler Strukturveränderungen einzelner Motoneurone mit signifikanten Änderungen der intrazellulären Kalziumkonzentration korrelieren (Duch und Levine, 2002). In Anbetracht dieser und vieler weiterer Studien erscheint es möglich, daß aktivitätsbedingter Kalzium-Einstrom sowohl die synaptische Plastizität im adulten ZNS als auch die Änderungen der Dendritenstruktur während der Entwicklung beeinflusst. Da die neuronale Aktivität die Sinneseindrücke, Lernprozesse und Handlungen eines Individuums widerspiegelt, ist der Zusammenhang mit den molekularen Grundlagen des Lernens offensichtlich. Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, die Aktivität und die Verteilung von intrazellulären Kalzium-Sensoren während der Metamorphose von *Manduca sexta* zu untersuchen und diese in Zusammenhang zu postembryonalen strukturellen Veränderungen im ZNS zu setzen (Consoulas *et al.*, 2000).

1.2. Intrazelluläre Kalzium-Sensoren

Änderungen der intrazellulären Kalzium-Konzentration werden durch ein breites Spektrum Kalzium-abhängiger Enzyme registriert, die in unterschiedlichsten Bereichen der Zelle lokalisiert sind oder im Cytoplasma vorliegen. Es handelt sich hier u.a. um die kalziumabhängige Phosphatase Calcineurin (Review z. B. Guerini, 1997), die Proteinkinasen Proteinkinase C (PKC, Review z. B. Huang, 1990) und die Ca^{2+} /Calmodulin-regulierten Kinasen (CaM Kinasen) sowie Vesikel-assoziierte Proteine in den Präsynapsen, die an der Freisetzung von Neurotransmittern beteiligt sind und dadurch die synaptische Übertragung beeinflussen können, z.B. Synaptotagmin (Review z. B. Tucker und Chapman, 2002). Im Nervensystem kommt einem Mitglied der Familie der Ca^{2+} /Calmodulin-regulierten Kinasen, der CaM Kinase II, besonders aufgrund ihrer Ubiquität, der Diversität ihrer Isoformen und spezieller Autophosphorylierungs-Eigenschaften, die eine Art „molekulares Gedächtnis“ ermöglichen, eine besondere Bedeutung zu.

1.3. CaM Kinase II

Die Ca²⁺/Calmodulin-regulierte Proteinkinase II (CaM Kinase II) ist von den Kalzium-regulierten Enzymen das in Nervengewebe am meisten verbreitete; aus dieser Kinase bestehen ungefähr 2 % des gesamten Proteins im Hippocampus und 2 bis 5 % in der „Postsynaptic Density“ (PSD), einem Proteinkomplex in der Postsynapse, der ursprünglich als elektronendichte Struktur an der zytoplasmatischen Seite der postsynaptischen Membran entdeckt wurde (Soderling, 2000; Petersen *et al.*, 2003). CaM Kinase II gehört zu einer Familie von Ca²⁺/Calmodulin-regulierten Kinasen, die einige Homologien teilen, sich aber dennoch in wichtigen Eigenschaften unterscheiden (Hudmon und Schulman, 2002). Zu dieser Kinasen-Familie gehören neben der erwähnten CaM Kinase II auch noch die CaM Kinasen I und IV sowie ein Enzym, das ursprünglich mit CaM Kinase III bezeichnet wurde aber inzwischen wegen seiner hohen Substratspezifität für den Translationsfaktor „eukaryotic Elongation Factor 2“ eEF2-Kinase genannt wird (Nairn *et al.*, 1985; Hudmon und Schulman, 2002a). Die CaM Kinasen I und IV unterscheiden sich von CaM Kinase II in ihrer Monomerstruktur und der Art der Regulation (Soderling, 1999; Hook und Means, 2001). Während CaM Kinase II nur Ca²⁺/Calmodulin zu ihrer Aktivierung benötigt, ist bei I und IV zusätzlich die Phosphorylierung ihrer Aktivierungsdomäne durch eine weitere CaM Kinase erforderlich (Soderling, 1999). Bei der CaM Kinase II gibt es dagegen wichtige Autophosphorylierungen an den Threoninresten 286 bzw. 287 sowie 305 bzw. 306, die Affinität und Sensitivität zu Ca²⁺/Calmodulin regulieren und auch die intrazelluläre Lokalisation der Kinase (siehe unten); in diesem Zusammenhang ist die Diversität von Isoformen, auch als Untereinheiten bezeichnet, der CaM Kinase II von eminenter Bedeutung (Hudmon und Schulman, 2002b).

1.4. Die Isoformen der CaM Kinase II

CaM Kinase II umfaßt in Vertebraten vier Isoformen, die mit α , β , γ und δ bezeichnet und von vier eng verwandten Genen codiert werden, durch alternatives Spleißen jedes dieser Gene entstehen jedoch zahlreiche weitere Isoformen (Hudmon und Schulman, 2002). Bei Insekten gibt es deutlich weniger Studien über die Diversität der CaM Kinase II. Das einzige System, in dem hier die genetische Organisation der CaM Kinase II genau untersucht wurde, ist die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*. Hier existiert nur ein CaM Kinase II Gen, aus dem sämtliche Isoformen, zahlenmäßig natürlich erheblich weniger als in Vertebraten, durch alternatives Spleißen hervorgehen (Ohsako *et al.*, 1993; GuptaRoy *et al.*, 2000). Dieses Gen ist zu 75 % homolog mit dem Gen für die α -Isoform aus der Ratte (GuptaRoy und Griffith, 1996).

Die Isoformen aus *Drosophila* unterscheiden sich nur in der Region zwischen der regulatorischen und der assoziativen Domäne; dies ist der Bereich, in dem auch die Isozyme aus Vertebraten die größte Variabilität aufweisen (GuptaRoy *et al.* 2000). Es gibt jedoch deutliche Unterschiede zwischen den Isoformen hinsichtlich ihrer Funktion und intrazellulären Lokalisation, wobei beides auch entwicklungsbedingt reguliert wird (Menegon *et al.*, 2002). Hier soll nur auf die Isoformen α und β eingegangen werden, die in Nervengewebe vorkommen (Hanson und Schulman, 1992). CaM Kinase II, sowohl die α - als auch die β -Isoform, ist eines der ubiquitärsten Proteine in der „postsynaptic density“ (Petersen *et al.*, 2003) und spielt dort, wie andere PSD-Proteine, eine wichtige Rolle bei der Langzeitpotenzierung („long term potentiation“, LTP), einem aktivitätsabhängigen Prozeß, von dem angenommen wird, daß er zu den molekularen Grundlagen des Lernens gehört (siehe unten), und damit wahrscheinlich bei der Gedächtnisbildung (Lisman *et al.*, 2002); dies hängt damit zusammen, daß sie die Synapsenstärke beeinflusst (Fink *et al.*, 2003) und daß die Lokalisation in der PSD nicht statisch sondern aktivitätsabhängig ist: bei starker synaptischer Aktivität findet die Translokation zur PSD statt (Shen und Meyer, 1999; Dosemeci *et al.*, 2001), wo sie Kalzium-Einstrom durch N-Methyl-D-Aspartat- (NMDA-) Rezeptoren registrieren kann (Petersen *et al.*, 2003). Die β Isoform unterscheidet sich von α insbesondere durch ihre Fähigkeit, aktivitätsabhängig an Aktin zu binden (Shen *et al.*, 1998). Dies prädestiniert sie für eine zentrale Rolle bei der Steuerung von Aktin-regulierten morphologischen Prozessen, z. B. Dendritenwachstum, was in neueren Arbeiten auch gezeigt wurde (z.B. Fink *et al.*, 2003). Beide Isoformen liegen auch im Cytoplasma in Form von ringförmigen Holoenzymen vor, die aus zwölf Monomeren bestehen, wobei α - und β -Isoform entsprechend ihrem stöchiometrischen Verhältnis im Cytoplasma gemischt sind. Eine modifizierte Form der α -Untereinheit ist mit präsynaptischen Vesikeln assoziiert und phosphoryliert das ebenfalls Vesikel-assoziierte Protein Synapsin I (Benfenati *et al.*, 1992; Llinas *et al.*, 1985). Es ist somit klar erwiesen, daß CaM Kinase II α sowohl prä- als auch postsynaptisch lokalisiert sein kann, der prä- und der postsynaptischen Fraktion kommen unterschiedliche Aufgaben bei Lernprozessen und neuronaler Plastizität zu.

1.5. Monomerstruktur und Regulierung

Eine typische CaM Kinase II Untereinheit besteht aus einer katalytischen, einer autoregulatorischen und einer assoziativen Domäne. Die katalytische Domäne enthält die ATP- und die Substratbindungsstelle, sowie die Bereiche, die mit Ankerproteinen interagieren und damit eine Assoziation mit dem Zytoskelett ermöglichen. Die autoregulatorische Domäne enthält

EINLEITUNG

eine Region, die als Pseudosubstrat fungieren und durch Wechselwirkung mit der katalytischen Domäne das Enzym in einem inaktiven Zustand halten kann. In Abwesenheit von gebundenem Ca^{2+} /Calmodulin befindet sich CaM Kinase II durch Wechselwirkung der Pseudosubstrat-Region der autoregulatorischen Domäne mit der Substratbindungsregion der katalytischen Domäne in einer inaktiven Konformation, die durch Bindung von Ca^{2+} /Calmodulin an die autoregulatorische Domäne aufgehoben wird, dies ist gleichbedeutend mit einer Aktivierung der CaM Kinase II durch Ca^{2+} /Calmodulin. Bei dieser Aktivierung wird zugleich eine Autophosphorylierung am Threoninrest 286 (bzw. 287, siehe unten) ermöglicht, die im inaktiven Zustand durch die autoregulatorische Domäne sterisch verhindert wird. Auf die weitreichende Bedeutung dieser Autophosphorylierung wird noch näher einzugehen sein. Die assoziative Domäne am C-Terminus wird zur Bildung von CaM Kinase II Holoenzymen benötigt (Hudmon und Schulman, 2002).

CaM Kinase II α kann auch durch Autophosphorylierung an Threonin-286, die anderen Isoformen durch Phosphorylierung von Threonin-287 (beides in der regulatorischen Domäne, jedoch außerhalb der CaM-Bindungsregion), die innerhalb eines Holoenzym zwischen den Untereinheiten stattfindet, in einen partiell aktiven, von Ca^{2+} /Calmodulin unabhängigen Zustand versetzt werden; zusätzlich hat diese Phosphorylierung eine ca. 1000-fache Erhöhung der Affinität der Kinase zu Ca^{2+} /Calmodulin zur Folge, ein Effekt, den man als „CaM-Trapping“ bezeichnet. In *Drosophila* führt Autophosphorylierung an Threonin-287 zu einer persistenten Aktivierung, diese Reaktion ist damit äquivalent zur Autophosphorylierung an Threonin-286 in der α -Isoform aus der Ratte (Wang *et al.*, 1998). Erst durch die Kombination von Autophosphorylierung und Ca^{2+} /Calmodulin-Aktivierung infolge von CaM-Trapping wird die volle Kinase-Aktivität erreicht. Die Autophosphorylierung ist reversibel: sowohl an α - als auch an β -Untereinheiten kann eine Autodephosphorylierung stattfinden, die von dem stöchiometrischen Verhältnis von ATP und ADP abhängt (Hudmon und Schulman, 2002). Zusätzlich kann autophosphorylierte CaM Kinase II durch Phosphatasen dephosphoryliert und damit in den inaktiven Zustand zurückversetzt werden. Auch hier scheint es eine gewisse Variabilität zu geben, die eine selektive Regulation unterschiedlich lokalisierter CaM Kinase II Fraktionen unterstützt. So wird z.B. CaM Kinase II in den Postsynaptic Densities primär von Protein-Phosphatase 1 (PP1) dephosphoryliert, während im Cytoplasma gelöste CaM Kinase II selektiv von PP2A dephosphoryliert wird (Colbran, 2004).

EINLEITUNG

Die persistente Aktivierung infolge von Thr-286 bzw. -287 Autophosphorylierung ermöglicht es der CaM Kinase II, Änderungen der Frequenz von Kalzium-Wellen in Änderungen der Kinase-Aktivität des Holoenzym zu übersetzen: Bei steigender Kalzium-Konzentration werden einzelne Untereinheiten innerhalb eines Holoenzym durch Ca^{2+} /Calmodulin-Bindung aktiviert und infolge dessen autophosphoryliert. Die aktivierten Monomere phosphorylieren dann benachbarte Untereinheiten, so daß diese beim Eintreffen der nächsten Kalzium-Welle mit höherer Wahrscheinlichkeit Ca^{2+} /CaM binden (CaM-Trapping). Bei niedrigen Frequenzen sind dennoch sämtliche Untereinheiten vor dem Eintreffen der nächsten Kalzium-Welle durch Autodephosphorylierung oder Phosphatasen wieder vollständig inaktiviert, so daß es zu keiner frequenzabhängigen Steigerung der Kinase-Aktivität kommt. Bei hohen Frequenzen dagegen kommt es zwischen den Kalzium-Wellen zu keiner vollständigen Inaktivierung, so daß bei jeder Welle zusätzliche Untereinheiten aktiviert werden, bis ein von der Frequenz abhängiges Gleichgewicht zwischen Aktivierung und Inaktivierung erreicht ist. Eine frequenzabhängige Aktivierung der CaM Kinase II kann bei *in vitro*-Experimenten mit an der Innenwand des Reaktionsgefäßes immobilisierter Kinase zwischen 0,1 Hz und 1 Hz beobachtet werden. Unter 0,1 Hz kommt es, wie oben erläutert, zu keiner frequenzabhängigen Aktivierung, während bei 1 Hz die volle Aktivierung erreicht ist und daher höhere Frequenzen zu keiner höheren Aktivität führen (Colbran, 2004).

Autophosphorylierung innerhalb der CaM-Bindungsregion an Thr-305 oder -306 führt hingegen dazu, daß kein Ca^{2+} /Calmodulin mehr gebunden werden kann; diesen Effekt bezeichnet man als „CaM-Capping“. Er tritt auf, wenn Ca^{2+} /CaM von an Thr-286 bzw. -287 phosphorylierter CaM Kinase II dissoziiert. Die Kalzium-unabhängige Kinase-Aktivität wird dadurch nicht beeinflußt (Hanson und Schulman, 1992b). CaM-Capping wurde jedoch auch an vollständig inaktiver, weder an Thr-286/287 phosphorylierter noch mit Ca^{2+} /Calmodulin komplexierter CaM Kinase II beobachtet. Dies führt zu einer konstitutionell inaktiven, Kalzium-insensitiven Konformation. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist jedoch so gering, daß *in vivo* dieser Effekt durch Phosphatasen normalerweise wieder aufgehoben wird (Colbran, 1993).

1.6. Intrazelluläre Substrate

CaM Kinase II ist eine Serin/Threonin-Kinase und phosphoryliert ein breites Spektrum an Zielmolekülen. Es handelt sich hier u. a. um Enzyme, z.B. Kinasen, die stromabwärts in einer Signal-Kaskade liegen und dadurch ihrerseits aktiviert werden und Bestandteile des Zytoske-

lets wie Tubulin und Tau (Yamamoto *et al.*, 2002) und das Mikrotubuli-assoziierte Protein 2 (MAP-2, „microtubuleassociated protein 2“, Schulman, 2004). Der Transkriptionsfaktor „cAMP response element-binding protein“ (CREB) kann auch durch CaM Kinase II aktiviert werden, wodurch die Genexpression beeinflusst werden kann, wie bei *in vitro*-Studien mit aus Ratten- bzw. Rinderhirn isoliertem CREB gezeigt wurde (Yamamoto *et al.*, 1988; Dash *et al.*, 1991). Gaudilliere *et al.* (2004) haben an Ratten-Gehirnschnitten gezeigt, daß auch der Transkriptionsfaktor NeuroD durch CaM Kinase II phosphoryliert wird und dadurch dendritisches jedoch nicht axonales Wachstum beeinflusst. In der Postsynaptic Density sind über 28 Proteine identifiziert worden, die durch postsynaptische CaM Kinase II phosphoryliert werden (Yoshimura *et al.*, 2002), hier werden auch Glutamat-Rezeptorkanäle vom AMPA- und NMDA-Typ phosphoryliert (Schulman, 2004). In einer neueren Arbeit wurde gezeigt, daß auch der *eag* Kalium-Kanal in *Drosophila melanogaster* mit CaM Kinase II interagiert: Bindung von CaM Kinase II an den membranständigen Kaliumkanal aktiviert die Kinase, die daraufhin den Kalium-Kanal phosphoryliert, was zu einer Erhöhung der Amplitude des durch diesen Kanal fließenden Kalium-Stromes führt (Sun *et al.*, 2004). Vesikel-assoziierte Proteine wie Synapsin I und Syntaxin 1A werden durch präsynaptische CaM Kinase II phosphoryliert. Diese Phosphorylierungen führen zur Dissoziation der genannten Proteine von den synaptischen Vesikeln und erleichtern damit die Transmitter-Freisetzung (Llinas *et al.*, 1985; Colbran, 2004). Es werden auch bestimmte Kalzium-Kanäle von CaM-Kinase II phosphoryliert (Welsby *et al.*, 2003). Nicht zu vergessen sind hier auch die oben erwähnten Autophosphorylierungs-Eigenschaften, die neben der Ubiquität und dem breiten Substratspektrum die zentrale Stellung dieses Signalweges begründen.

1.7. Rolle bei Entwicklung, neuronaler Plastizität und Lernen

Wie oben erläutert, wird CaM Kinase II durch Autophosphorylierung an Thr-286 bzw. -287 in einen persistenten, partiell aktiven Zustand versetzt, der die Anwesenheit des Kalzium-Signals überdauert. Diese Eigenschaft erlaubt es ihr, auf molekularer Ebene Informationen zu speichern und prädestiniert sie für eine Rolle bei der Entstehung von Gedächtnis; Mutationen, die Autophosphorylierung an Thr-286 unterbinden, verhindern Langzeitpotenzierung und damit wahrscheinlich auch Gedächtnisbildung. Langzeitpotenzierung („long term potentiation“, LTP) ist, wie oben bereits erwähnt, ein Modell für die molekularen Grundlagen von Lernprozessen: Im Hippocampus von Ratten wurde beobachtet, daß Effizienz der synaptischen Übertragung (Synapsenstärke) aktivitätsabhängig erhöht wird, häufig benutzte Sy-

EINLEITUNG

napsen nehmen dadurch gegenüber seltener benutzten an Stärke zu, was neben Änderungen des Verzweigungsverhaltens ein Beitrag zur erfahrungsbedingten neuronalen Plastizität ist (Lisman *et al.*, 2002). Da durch spannungsabhängige Kalzium-Kanäle aktivitätsbedingter, von Aktionspotentialen abhängiger Kalzium-Einstrom erfolgt, der von Kalzium-abhängigen Enzymen registriert wird, kann die CaM Kinase II Aktivität einer präzisen Wiedergabe der neuronalen Aktivität gleichen; zum Beispiel ist in kultivierten Rückenmark-Nervenzellen aus Mäuse-Embryonen gezeigt worden, daß die Aktivität der CaM-Kinase durch die Frequenz der Aktionspotentiale reguliert wird (Eshete und Fields, 2001).

Auch die intrazelluläre Lokalisation der Isoformen der CaM Kinase II ist, wie oben bereits erwähnt, in hohem Maße von neuronaler Aktivität abhängig. Die Translokation zur PSD bei synaptischer Aktivität wird wahrscheinlich durch Thr-286 bzw. -287 Autophosphorylierung reguliert (McNeill und Colbran, 1995). Neben der Dephosphorylierung durch PP1 gibt es Hinweise, daß Phosphorylierung an Thr-305 und/ oder -306 die Dissoziation von der PSD unterstützt (Shen *et al.*, 2000). Beide im Nervensystem vertretenen Isoformen werden aktivitätsabhängig zur PSD transloziert. Im inaktiven Zustand verhalten sie sich jedoch unterschiedlich: Während die α -Isoform gleichmäßig im Cytoplasma vorliegt, ist die β -Isoform in diesem Zustand mit filamentösem Aktin (F-Aktin) assoziiert; die Translokation der Isoformen zur PSD nach diesem Mechanismus erfordert Aktivierung von NMDA-Rezeptoren und Ca^{2+} /Calmodulin-Bindung an die CaM Kinase II (Shen und Meyer, 1999). Andererseits ist an kultivierten Ratten-Neuronen gezeigt worden, daß die β -Untereinheit als Ankerprotein fungieren kann, das die Bindung von gemischten Holoenzymen an F-Aktin ermöglicht (Shen *et al.*, 1998). Diese Einschränkung der Isoform-spezifischen Lokalisierung wird jedoch dadurch relativiert, daß auch die Expression der beiden Isoformen aktivitätsabhängig ist: Eine Erhöhung der synaptischen Aktivität führt zu einer verstärkten Expression der α -Isoform während die Expression der β -Isoform herunterreguliert wird (Thiagarajan *et al.*, 2002). Der aktivitätsabhängige Kalzium-Einstrom, der neuronale CaM Kinase II reguliert, erfolgt, wie bereits erwähnt, primär über NMDA-Rezeptoren (Fukunaga *et al.*, 1992; Colbran, 2004). Es handelt sich hier um Kalzium-Kanäle, die durch gleichzeitige Bindung von präsynaptisch freigesetztem Glutamat an die extrazelluläre Domäne und Membran-Depolarisation geöffnet werden; die Öffnung dieser Kanäle führt zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Kalzium-Konzentration, die sich auf den dendritischen Dorn beschränkt, der in der aktivierten Postsynapse endet; dieser Anstieg der Kalzium-Konzentration ist notwendig für die Induktion von LTP (Lisman

EINLEITUNG

et al., 2002). Die durch den Anstieg der Kalzium-Konzentration aktivierte CaM Kinase II phosphoryliert dann unter anderem bestimmte Untereinheiten der NMDA-Rezeptoren, was zu einer Verringerung ihrer Empfindlichkeit führt (Colbran, 2004).

Auch bei bei Invertebraten ist die Rolle der CaM Kinase II bei Lernen und erfahrungsbedingter Plastizität untersucht worden. Ein wichtiges Modellsystem für solche Studien ist die Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, die aufgrund ihres komplexen Verhaltens und der guten Zugänglichkeit für molekulargenetische Methodik besonders geeignet ist, um die Rolle der CaM Kinase II bei Lernprozessen und erfahrungsbedingter neuronaler Plastizität zu untersuchen (Griffith, 1997). Griffith *et al.* (1993) haben *Drosophila*-Linien erzeugt, bei denen die Expression eines für CaM Kinase II spezifischen Inhibitor-Peptides unter der Kontrolle eines temperatursensitiven Promotors steht; die Expression dieses Peptides konnte somit durch Erhöhen der Umgebungstemperatur („heat shock“) induziert werden. Diese Linien zeigen Defizite bei nicht-assoziativen und assoziativen Lernprozessen, die bei einer erhöhten Expression des Inhibitor-Peptides infolge von „heat shock“-Induktion verstärkt werden. Unter nicht assoziativem Lernen versteht man die Gewöhnung (Habituation) an einen wiederholt auftretenden Reiz und die Verstärkung der Reaktion auf einen solchen Reiz (Sensitivierung). Beiden Formen des nicht-assoziativen Lernens ist gemein, daß sie Verhaltensanpassungen auf einen neutralen Reiz sind, der weder mit positiven noch mit negativen Folgen für das Individuum verbunden ist. Griffith *et al.* (1993) haben bei ihren Untersuchungen nicht zwischen prä- und postsynaptischer CaM Kinase II unterschieden. Jin *et al.* (1998) haben jedoch gezeigt, daß präsynaptische CaM Kinase II bei nicht-assoziativen Lernprozessen eine wichtige Rolle spielt. Als Modell benutzten sie einen einfachen propriorezeptiven Reflex, der die Beinposition in adulten Fliegen kontrolliert und bei wiederholter Reizung schwächer wird, also der Habituation unterliegt. In den präsynaptischen sensorischen Neuronen, die diesen Reflex kontrollieren, exprimierten sie mutante Formen von CaM Kinase II sowie ein CaM Kinase II Inhibitorpeptid und untersuchten den Einfluß dieser Manipulationen auf die Habituation des Reflexes. Präsynaptische Expression von konstitutiv aktiver CaM Kinase II, bei der das Threonin an Position 287 durch Aspartat ersetzt wurde (T287D), führt zu einem völligen Unterbleiben der Habituation. Um die Rolle der Autophosphorylierung an Threonin-287 zu untersuchen, exprimierten sie wiederum präsynaptisch eine mutante CaM Kinase II, bei der Threonin-287 durch Alanin ersetzt war (T287A) und die dadurch nicht mehr an Position 287 phosphoryliert werden konnte. Die erste Reflexantwort war bei den manipulierten Tieren er-

EINLEITUNG

heblich schwächer als in der Kontrollgruppe, darauf folgte jedoch eine dramatische Sensitivierung. Inhibition von CaM Kinase II mit einem präsynaptisch exprimierten Inhibitorpeptid verhindert ebenfalls die Habituation. Die Autoren schlagen zur Interpretation dieser Effekte ein Modell vor, bei dem Habituation auf eine Abnahme der Transmitterfreisetzung bei wiederholtem synaptischen Eingang zurückzuführen ist; dem oben erläuterten „molekularen Gedächtnis“ der CaM Kinase II kommt dabei die Aufgabe zu, die Transmitterfreisetzung abhängig von synaptischen Ereignissen in der Vergangenheit zu modulieren. Im Gegensatz zum nicht-assoziativen Lernen kommt es beim assoziativen Lernen zur Verknüpfung eines neutralen Reizes mit einem Reiz, der als angenehm oder unangenehm erlebt wird (Belohnung oder Strafe). Ein wichtiges Modellsystem zur Untersuchung des assoziativen Lernens ist das Paarungsverhalten von *Drosophila*, das zwar einem genetisch determinierten Programm folgt, aber durch Erfahrung moduliert werden kann. So können männliche Fliegen z.B. lernen, ihr Paarungsverhalten gegenüber Weibchen, die sich in den vergangenen zwei bis drei Stunden gepaart haben, zu reduzieren; dieses Phänomen bezeichnet man als Paarungs-Konditionierung („courtship conditioning“; Siegel und Hall, 1979). Es wird durch ein von solchen Weibchen produziertes Pheromon ausgelöst, das von den Männchen als aversives Signal wahrgenommen wird; die Produktion wird durch das Paarungsverhalten des Männchens induziert und erhöht sich mit zunehmender Dauer des Paarungsverhaltens (Tompkins *et al.*, 1983). Präsentiert man Männchen ein kürzlich begattetes Weibchen und kurz danach ein jungfräuliches Weibchen, zeigen sie diesem gegenüber im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von nicht konditionierten Männchen ein reduziertes Paarungsverhalten. Bei Mutanten mit reduzierter CaM Kinase II Aktivität bleibt dieser Lerneffekt aus. Joiner und Griffith (1997) schlagen ein Modell vor, nach dem das motorische Programm für das Paarungsverhalten fest installiert ist, aber durch synaptischen Eingang von dem Konditionierungs-Signalweg inhibiert werden kann. Die Übertragungseffizienz dieser Synapsen erhöht sich nach diesem Modell durch wiederholten Eingang durch heterosynaptische Bahnung, wobei für diese Erhöhung der Synapsenstärke CaM Kinase II essentiell ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß Regulation, intrazelluläre Lokalisation und Expression der CaM Kinase II in höchstem Maße von neuronaler Aktivität bestimmt werden. Da diese Kinase sowohl über die Vesikel- und die PSD-Fraktion die synaptische Übertragung beeinflusst als auch über die mit dem Cytoskelett assoziierte Fraktion die neuronale Plastizität, ist sie in der Lage, Erfahrungen und Eindrücke des Individuums sowohl in Veränderungen der

Synapsenstärke als auch in Veränderungen der neuronalen Struktur umzusetzen. Dies demonstriert ihre zentrale Bedeutung für Lernen und erfahrungsbedingte neuronale Plastizität und impliziert zugleich, daß für beide Phänomene auf molekularer Ebene die gleichen oder sehr stark ineinandergreifende Mechanismen verantwortlich sind.

1.8. *In vivo*- und *in vitro*-Studien in verschiedenen Systemen

Daß CaM Kinase II eine Rolle während der neuronalen Entwicklung spielt ist durch *in vitro* Studien mit zahlreichen Zelllinien demonstriert worden: die α -Isoform ist durch Transfektion mit der zugehörigen cDNA aus der Maus in PC12-Zellen (Tashima *et al.*, 1996; Masse und Kelly, 1997) und Neuro2a- sowie NG108-15-Zellen (Goshima *et al.*, 1993) überexprimiert worden. Diese Zelllinien sind aus Nebennieren-Tumoren der Ratte gewonnen worden (aus dem Phäochromozytom im Falle der PC12-Zellen, bei den anderen beiden handelt es sich um Neuroblastoma-Zelllinien) und zeigen ähnliche Eigenschaften wie Nervenzellen in Primärkultur (Green und Tischler, 1976). PC12-Zellen beginnen nach Zugabe von Nerven-Wachstumsfaktor (NGF, „nerve growth factor“) sich zu teilen und verstärkt Verzweigungen zu bilden (Green und Tischler, 1976). Diese NGF-induzierte Verzweigungsbildung wird durch die Überexpression von CaM Kinase II α gehemmt, unter Einwirkung des CaM Kinase II Inhibitors KN-62 verhalten sich die Zellen wieder wie untransfizierte PC12-Zellen (Masse und Kelly, 1997). Die Studie von Tashima *et al.* (1996) läßt einen Zusammenhang zwischen dem CaM Kinase II- und dem PKA-Signalweg bei der Steuerung des neuronalen Wachstums vermuten: Aktivierung der PKA in gleichermaßen transfizierten PC12-Zellen durch das cAMP-Analogon Dibutyryl-cAMP, das aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften die Zellmembran durchdringen kann, führt zu stabilem neuronalem Wachstum; Enzymaktivitäts-Messungen ergaben, daß die CaM Kinase II Aktivität mit steigendem Anteil neuritenausbildender Zellen abnimmt. Die Autoren diskutieren die Möglichkeit, daß die Unterdrückung neuronalen Wachstums durch CaM Kinase II Aktivität durch Inhibition des cAMP-Signalweges erfolgt. Es wird jedoch auch die Variante erörtert, daß der Effekt von CaM Kinase II Aktivität auf neuronales Wachstum durch direkte Phosphorylierung von Proteinen des Zytoskeletts vermittelt wird. In Vorversuchen zu der zitierten Studie wurde gezeigt, daß in transfizierten PC12-Zellen, die mit dem Kalzium-Ionophor Ionomycin behandelt wurden, die Phosphorylierung des mikrotubuliassoziierten Proteins 2 höher war als in unbehandelten Kontrollzellen. Goshima *et al.* (1993) haben die Zelllinien Neuro2a und NG108-15 mit Wildtyp-CaM Kinase II α (α), mit CaM Kinase II α , bei der Threonin-286 durch Alanin ersetzt wurde (Ala) und zur Kontrolle

EINLEITUNG

nur mit dem Transfektionsvektor pEF321-neo (neo) transfiziert. Einige Stunden nach dem Ausplattieren wurde bei den α -Transfektanten Abflachung der vorher sphärischen Zellen und Initiation von Neuritenwachstum beobachtet, später zahlreiche lange, sich verzweigende Neuriten. In Ala-Mutanten waren die morphologischen Änderungen deutlich schwächer, neo-Zellen und nicht-transfizierte Zellen zeigten keine Änderungen. Aus dieser Studie kann man zum einen schließen, daß Autophosphorylierung an Thr-286 erforderlich ist, damit CaM Kinase II ihre Funktion bei der Ausbildung morphologischer Änderungen effektiv ausführen kann; zum anderen fällt auf, daß CaM Kinase II Aktivität hier einen anderen, gegenteiligen Effekt auf neuronales Wachstum hat als in den beiden anderen Arbeiten. Die Hinweise in der Literatur über die Beziehung zwischen neuronalem Wachstum und intrazellulärer Kalzium-Konzentration sind ebenfalls widersprüchlich. Hier sollen nur zwei Beispiele aus einer wesentlich größeren Zahl von relevanten Arbeiten genannt werden. Goldberg (1988) hat an kultivierten Riesen-Neuronen des Seehasen *Aplysia californica* gezeigt, daß Blockade von Kalzium-Kanälen mit Co^{2+} -Ionen, also eine Verringerung der intrazellulären Kalzium-Konzentration, das Auswachsen von Neuriten unterdrückt. Dagegen wurde an kultivierten *Helisoma*-Neuronen demonstriert, daß ein durch Neurotransmitter oder neuronale Aktivität verursachter Anstieg der intrazellulären Kalzium-Konzentration ebenfalls zu einer Reduktion des Neuritenwachstums führt (Mattson und Kater, 1987). Eine Erklärung für diesen Widerspruch könnte die Hypothese sein, daß die Kalzium-Konzentration, bei der das Auswachsen von Neuriten möglich ist, nicht nur nach unten, sondern auch nach oben begrenzt ist. Über- und Unterschreiten dieses Konzentrationsbereiches würde damit zu ähnlichen Effekten, nämlich zur Reduktion des Neuritenwachstums, führen (Kater und Mills, 1991).

Es gibt erheblich weniger *in situ* Studien, in denen die Rolle der CaM Kinase II bei der neuronalen Entwicklung untersucht wurde. Deutliche Hinweise, die für eine wichtige Rolle der CaM Kinase II bei der Entwicklung von neuronalen Schaltkreisen sprechen, wurden vor allem im optischen Tektum des Krallenfrosches *Xenopus laevis* erzielt. In diesen Studien wurden unpigmentierte Kaulquappen (Albino-Tiere) verwendet; dadurch war es möglich, die Entwicklung von fluoreszenzmarkierten Nervenzellen im intakten Tier über mehrere Stunden oder Tage zu verfolgen. In einer proliferativen Zone am kaudalen Ende des Tektums werden laufend neue Nervenzellen gebildet, wodurch die frühen Ereignisse bei der Entstehung von Dendritenbäumen besonders gut beobachtet werden können. Zudem ist es auch möglich, die Ereignisse bei der Stabilisierung von Dendritenbäumen an älteren Neuronen im selben Tier zu

EINLEITUNG

beobachten und sie mit den frühen zu vergleichen. Mit Stabilisierung ist hier gemeint, daß in einer ersten Phase Dendriten aller Ordnungen gleichmäßig wachsen, während in einer zweiten Phase das Wachstum auf Dendriten hoher Ordnung beschränkt ist (Cline, 2001). Wu und Cline (1998) haben einzelne Neuronen entlang der rostrokaudalen Achse mit DiI markiert und deren morphologische Entwicklung durch regelmäßige konfokale Aufnahmen über einen Zeitraum von 3 bis 5 Tagen dokumentiert. Die Expression von CaM Kinase II in unterschiedlich alten Nervenzellen wurde ebenfalls untersucht; hierzu wurden einzelne Neuronen entlang der rostrokaudalen Achse mit DiI markiert und die Tiere danach für eine immunhistochemische Untersuchung vorbereitet. Es zeigte sich, daß die CaM Kinase II Immunoreaktivität einem rostrokaudalen Gradienten folgt. Junge Nervenzellen zeigen keine Immunoreaktivität, während in älteren CaM Kinase II exprimiert wird und die Expression mit steigender Komplexität des Dendritenbaumes zunimmt. Um zu testen, ob die CaM Kinase II Aktivität Einfluß auf die Entwicklung des Dendritenbaumes hat, wurden *Xenopus*-Kaulquappen mit einem rekombinanten Vakzinia-Virus infiziert, der konstitutiv aktive CaM Kinase II exprimiert. Die markierten Neuronen in derart manipulierten Tieren zeigten am ersten Tag nach der Virusinfektion das gleiche Wachstumsverhalten wie die entsprechenden Neuronen in Kontrolltieren. Am nächsten Tag jedoch wuchsen die Neuronen in den manipulierten Tieren deutlich langsamer als in den Kontrolltieren und hatten erheblich kleinere Dendritenbäume. Diese Verlangsamung des Dendritenwachstums korreliert mit dem ersten nachweisbaren Auftreten von viralen Proteinen. Zou und Cline (1999) haben in einer komplementären Studie endogene CaM Kinase II Aktivität im optischen Tektum mittels viraler Expression eines spezifischen Inhibitor-Peptides unterdrückt; dies hatte zur Folge, daß der Wechsel der dendritischen Wachstumsphasen unterblieb. Die Expression der CaM Kinase wird also im sich entwickelnden optischen Tektum entwicklungsbedingt kontrolliert und die Aktivität beeinflusst die morphologische Entwicklung von Neuronen. Wu *et al.* (1996) haben gezeigt, daß CaM Kinase II an der Reifung glutamaterger Synapsen im optischen Tektum beteiligt ist. Der aktivitätsbedingte Kalzium-Einstrom in die Postsynapse erfolgt entwicklungsabhängig durch zwei Typen von Glutamat-Rezeptorkanälen. Zunächst handelt es sich ausschließlich um *N*-methyl-D-Aspartat-(NMDA-) Rezeptoren, während mit der Reifung der Synapse α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-Propionsäure- (AMPA-) Rezeptoren hinzukommen, was zu einer Erhöhung der Synapsenstärke führt. Expression von konstitutiv aktiver CaM Kinase II mittels der oben beschriebenen Virusinfektion führt zu einem frühzeitigen Auftreten von AMPA-Rezeptoren im Vergleich zu Kontrolltieren. Das erste Auftreten von CaM Kinase II und von AMPA-Rezep-

EINLEITUNG

toren in Nervenzellen des optischen Tektums korreliert zeitlich mit dem Wechsel der dendritischen Wachstumsphasen. Das Auftreten dieser Ereignisse ist aktivitätsabhängig: Reh und Constantine-Paton (1985) haben durch lokale Applikation des Kugelfisch-Giftes Tetrodotoxin (TTX) in einzelnen Neuronen Natrium-Kanäle blockiert und damit auch die Fortleitung von Aktionspotentialen; dies führte in den manipulierten Neuronen ebenfalls zu einem Ausbleiben des Wechsels der dendritischen Wachstumsphasen. Diese Beobachtungen sind konsistent mit den oben referierten Daten über Funktionen der CaM Kinase II beim Lernen und der Entwicklung des Nervensystems. Sie geben damit zu der Hoffnung Anlaß, daß *in vitro* erzielte Erkenntnisse über neuronale Plastizität auch *in vivo* ihre Gültigkeit haben.



Abb. 1 *Manduca sexta* L., Lepidoptera: Sphingidae. Der in Südamerika und den südlichen USA beheimatete Tabakswärmer durchläuft fünf Larvenstadien (L1 bis L5), an die sich vier Wandererstadien anschließen (W1 bis W4). Der Tag der Verpuppung wird mit P0 bezeichnet; bis zum Schlüpfen folgen achtzehn Puppenstadien (P1 bis P18). Die Abbildung zeigt eine Larve des Stadiums L5, eine Puppe des Stadiums P12 und ein adultes Insekt. Ein Entwicklungsstadium dauert annähernd einen Tag. Morphologische und chronologische Kriterien erlauben eine exakte Bestimmung des jeweiligen Stadiums (Bell und Joachim, 1976; Consoulas *et al.*, 1996; Nijhout und Williams, 1974; Tolbert *et al.*, 1983).

In vivo Studien zur Funktion der CaM Kinase II während der Neuralentwicklung mit anderen Modellsystemen als dem optischen Tektum von *Xenopus laevis* sind immer noch selten. In einer der seltenen Studien über CaM Kinase II in anderen Spezies und Gewebetypen haben Braak und Fähmann (2003) die Expression von CaM Kinase II in verschiedenen Gewebetypen der Wanderheuschrecke *Locusta migratoria* untersucht. Die höchsten Konzentrationen von CaM Kinase II wurden im Gehirn sowie in der Bein- und Flugmuskulatur gefunden, geringere Konzentrationen konnten jedoch auch in Teilen des Verdauungstraktes und in den Ovarien nachgewiesen werden. Shanavas *et al.* (1998) haben Expression und Aktivitätsentwicklung der CaM Kinase II im ZNS des Seidenspinners *Bombyx mori* untersucht. Auch wegen ihrer bisherigen Seltenheit sind vergleichende Studien zwischen verschiedenen Spezies von großer Wichtigkeit, um die Allgemeingültigkeit der gewonnenen Ergebnisse zu untersuchen. In dieser Arbeit geht es um entwicklungsbedingte Änderungen in Expression, Aktivität

und Funktion von CaM Kinase II während der Metamorphose des Tabakswärmers *Manduca sexta*. Während der Metamorphose von *Manduca* treten entwicklungsbedingte Änderungen des Dendritenwachstums auf, die zeitlich mit aktivitätsbedingtem Kalzium-Einstrom in die Dendriten korrelieren (Consoulas *et al.*, 2000; Tissot und Stocker, 2000; Duch und Levine, 2000; 2002; Libersat und Duch, 2002). Daher ist dieser Modellorganismus gut geeignet, um den Einfluß von aktivitätsabhängigem Kalzium-Einstrom auf das Dendritenwachstum während der Entwicklung zu untersuchen.

1.9. CaM Kinase II in *Manduca sexta*

Während der Metamorphose von holometabolen Insekten wird das Zentralnervensystem umgebaut, um es an die damit einhergehenden Verhaltensänderungen anzupassen (Tissot und Stocker, 2000; Consoulas *et al.*, 2000). Viele Neurone, die nur für larvale Verhaltensweisen wie Kriechen und Nahrungsaufnahme benötigt werden, unterliegen während der Metamorphose dem programmierten Zelltod. Andere überdauern die Metamorphose und erhalten im adulten Insekt eine neue Funktion. Beide Vorgänge zielen darauf ab, dem adulten Insekt die zum Überleben und zum Arterhalt benötigten Verhaltensweisen wie Laufen, Fliegen, Paarung und Eiablage zu ermöglichen. Die meisten sensorischen Neuronen entstehen postembryonal. Im Gegensatz dazu sind die meisten Motoneuronen im adulten Insekt persistierende larvale Zellen. Um sie ihren neuen Funktionen anzupassen werden ihre dendritische Architektur, ihre intrinsischen biophysikalischen Eigenschaften und ihre synaptische Interaktion postembryonal verändert. Die meisten dieser Veränderungen stehen unter hormoneller Kontrolle, denn Ecdysteroide steuern die Metamorphose (Truman, 1996), zentrale Neurone exprimieren Steroidhormon-Rezeptoren und Manipulationen der Hormon-Titer induzieren strukturelle Veränderungen *in vivo* (Weeks, 1999) und *in vitro* (Matheson und Levine, 1996). Dennoch ist kürzlich gezeigt worden, daß es sowohl beim axonalen Wachstum als auch bei der Kontrolle der dendritischen Struktur auch aktivitätsbedingte Mechanismen gibt (Duch und Mentel, 2003; Mentel und Duch, 2004, im Druck), und von Kalzium-abhängigen Mechanismen wird angenommen, daß sie zur Kontrolle der dendritischen Struktur von Motoneuronen beitragen (Duch und Levine, 2002; Libersat und Duch, 2002).

Ein Beispiel für einen postembryonalen Funktionswechsel bei holometabolen Insekten sind eine Gruppe von Flugmotoneuronen in dem Tabakswärmer *Manduca sexta*. Dieses Insekt durchläuft fünf Larvenstadien (L1 bis L5), an die sich vier sogenannte Wandererstadien an-

EINLEITUNG

schließen, die durch hohe motorische Aktivität gekennzeichnet sind; in seiner natürlichen Umgebung gräbt sich das Tier in dieser Phase ein, um sich zu verpuppen. Der Tag der Verpuppung wird mit P0 bezeichnet. Es folgen achtzehn Puppenstadien (P1 bis P18) bis zum Schlüpfen des adulten Insekts. Jedes Stadium dauert annähernd einen Tag. Abbildung 1 zeigt eine Larve, eine Puppe und ein adultes Insekt von *M. sexta*. Diese Flugmotoneurone gehören zu den oben erwähnten Motoneuronen, die die Metamorphose überdauern; in der Larve sind sie an Kriechbewegungen beteiligt, während sie im adulten Insekt den dorsolongitudinalen

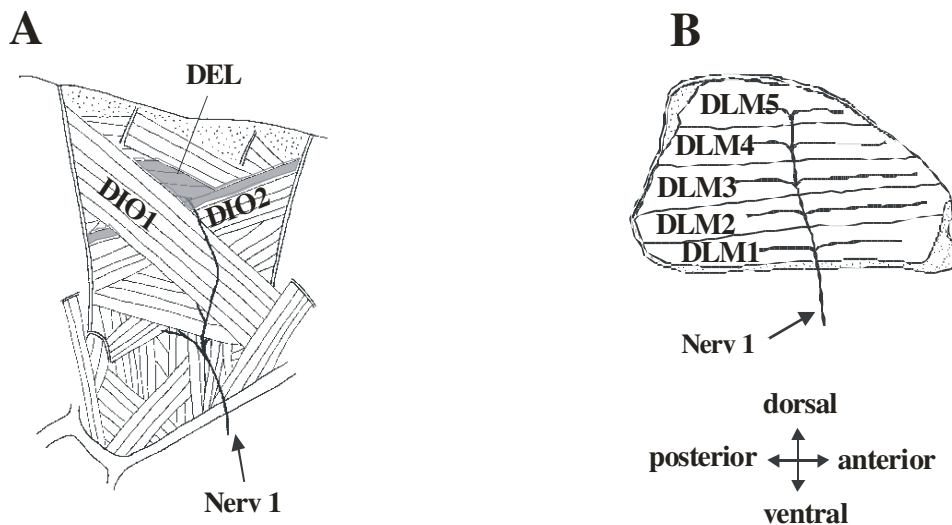


Abb. 2 Umbau des neuromuskulären Systems während der Metamorphose. **A:** Schematische Darstellung der dorsalen Region des Mesothorakalsegmentes in der Larve. Der „dorsal external longitudinal muscle“ (DEL) und der „dorsal internal oblique muscle 2“ (DIO2) enthalten Fasern, die zur Bildung des „dorsolongitudinal flight muscle“ (DLM) beitragen. DIO1 trägt wahrscheinlich nicht zur Entstehung der adulten Flugmuskulatur bei. **B:** Schematische Darstellung der dorsalen Region des Mesothorakalsegmentes in der adulten Motte. Der Dorsolongitudinale Flugmuskel (DLM) besteht aus den fünf Muskelfaserbündeln DLM1 bis DLM5. Die Muskelfaserbündel DLM1 bis DLM4 werden jeweils von einem der prothorakalen Motoneurone MN1 bis MN4 innerviert, DLM5 von dem mesothorakalen Motoneuron MN5 (Baylne *et al.*, 2001).

Flugmuskel („dorsolongitudinal flightmuscle“, DLM) innervieren (Abb. 2). Der DLM besteht aus fünf Muskelfaserbündeln (DLM1 bis 5), die jeweils von einem Motoneuron innerviert werden, sie werden mit MN1 bis MN5 bezeichnet. Die Zellkörper der Motoneurone MN1 bis MN4 befinden sich im Prothorakalganglion, während sich das Soma von MN5 im Mesothorakalganglion befindet (Abb. 3). Während der Metamorphose sind diese Motoneurone umfassenden morphologischen Änderungen unterworfen. Abbildung 4 zeigt dies am Beispiel von MN5: Zu Beginn der Metamorphose ziehen sich die Dendriten aus dem larvalen Netzwerk zurück, was man an der Reduktion des Dendritenbaumes zwischen dem letzten Larvenstadium und dem Beginn der Puppenentwicklung (Stadium P0/P1) erkennen kann. Das darauf folgende Auswachsen des Dendritenbaumes bis zum adulten Insekt ist auf die Integration in

EINLEITUNG

das neue Flugnetzwerk zurückzuführen. Metrische Analysen des Dendritenbaumes durch dreidimensionale Rekonstruktion und Erstellung von Dendrogrammen zeigen, daß diese Integration in das adulte Flugnetzwerk nach der Retraktion aus dem larvalen Netzwerk in zwei Phasen erfolgt (Liberat und Duch, 2002), wobei in der ersten, wahrscheinlich hormongesteuerten (Weeks, 2003), Wachstumsphase Dendriten aller Ordnungen gleichmäßig wachsen, während in der zweiten Phase, die ungefähr nach der Hälfte der Puppenentwicklung beginnt (Stadium P8) und wahrscheinlich durch neuronale Aktivität gesteuert wird, das Wachstum auf besonders feine Dendriten hoher Ordnung am Rande des Dendritenfeldes beschränkt ist; diese Phase dient wahrscheinlich der Feinabstimmung des Netzwerkes und ist entscheidend für die Synaptogenese zur korrekten Integration des Motoneurons in das adulte Flugnetzwerk (Liberat und Duch, 2002). Der Wechsel der Wachstumsphasen korreliert zeitlich mit entwicklungsbedingten Änderungen in der Expression von Kalzium-Kanälen, Kalzium-Membranströmen, aktivitätsbedingtem Kalzium-Einstrom und der Ruhe-Kalzium-Konzentration in den Dendriten (Duch und Levine, 2000; 2002).

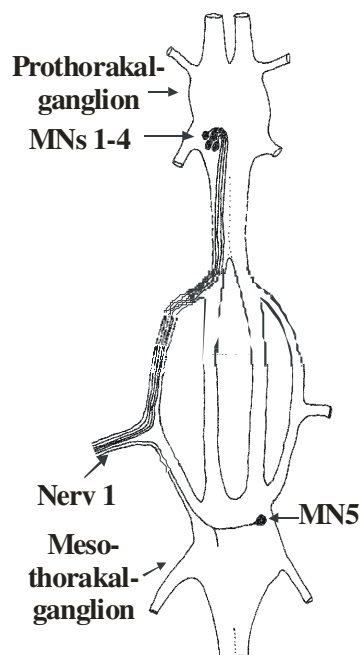


Abb. 3 Schematische Darstellung von Pro- und Mesothorakalganglion. Die Zellkörper von MN1 bis MN4 befinden sich im Prothorakalganglion, der von MN5 im Mesothorakalganglion. Die Axone aller fünf Motoneurone münden in Nerv 1. Auf Ebene dieser schematischen Darstellung ähneln sich die Morphologien der gezeigten Thorakalganglien in der Larve und im adulten Insekt weitgehend, Meso- und Metathorakalganglion verschmelzen jedoch während der Metamorphose (Bayline *et al.*, 2001).

Manduca sexta erscheint gut geeignet, um aktivitätsbedingte Mechanismen der neuronalen Entwicklung zu untersuchen, da die hormongesteuerten Mechanismen, die die erste Wachstumsphase bestimmen, bereits gut untersucht sind (Weeks, 2003) und aktivitätsbedingte Mechanismen sich daher gut von ihnen abgrenzen lassen. Außerdem sind diese Insekten aufgrund ihrer Größe auch neuroanatomischen und biochemischen Methoden besonders gut zugänglich, was Untersuchungen der Dendritenstruktur nach pharmakologischen Manipulatio-

nen des aktivitätsbedingten Kalzium-Einstroms oder anderer Stationen der Signalkette erheblich erleichtert.

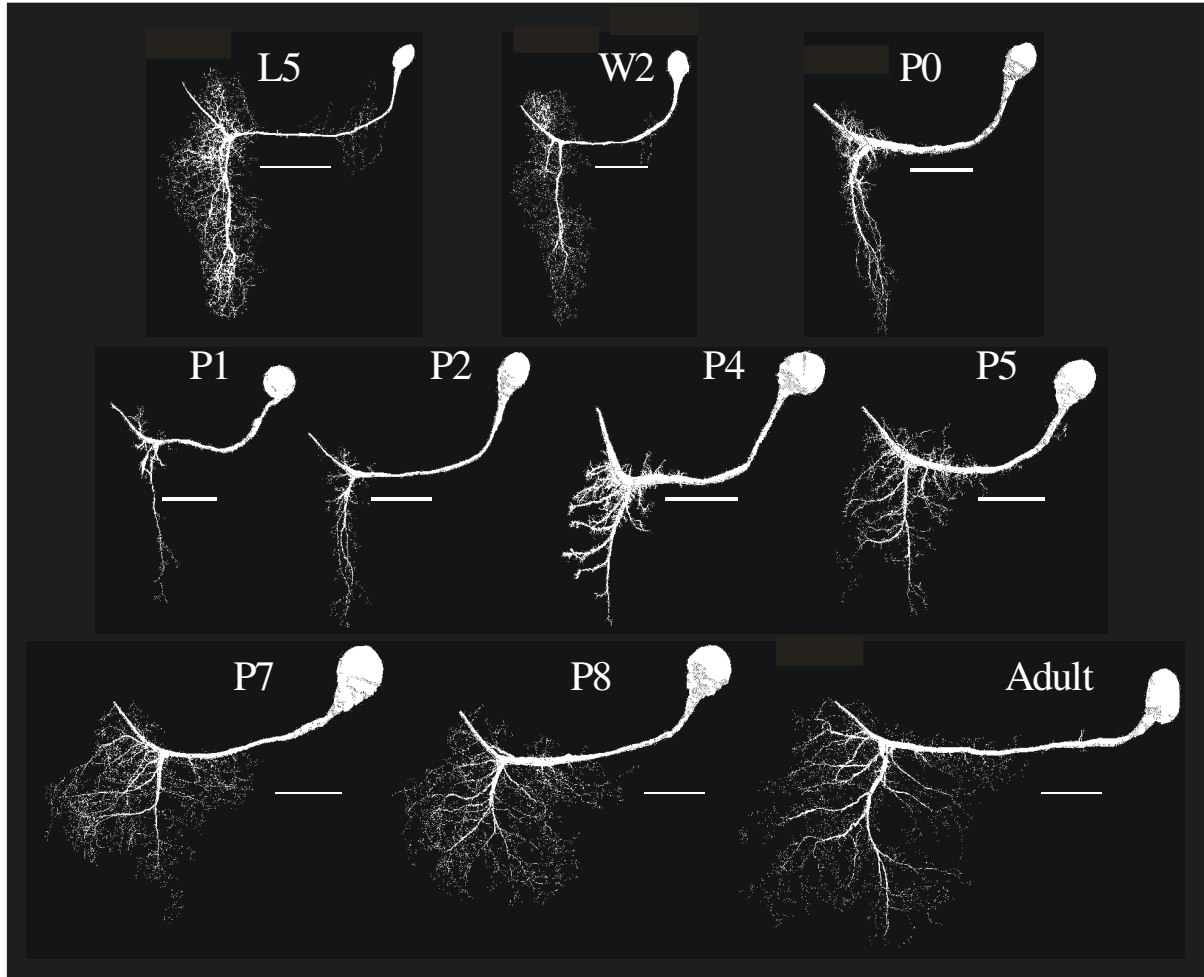


Abb. 4 Morphologische Änderungen von MN5 während der Metamorphose. Gezeigt wird hier der Dendritenbaum mit Zellkörper (Soma) in verschiedenen Entwicklungsstadien. Das Axon verläßt das Bild an der linken Seite. In der späten Larval- und frühen Puppenentwicklung (L5 bis P1) ziehen sich die Dendriten zurück. Die weitere Entwicklung bis zum adulten Insekt ist durch erneutes Auswachsen der Dendriten gekennzeichnet (Duch und Levine, 2000; Libersat und Duch, 2002; Abbildung aus Duch und Levine, 2000). Maßstab: 100 μ m.

In der vorliegenden Arbeit sollten insbesondere die biochemischen Aspekte einer möglichen Rolle der CaM Kinase II beim Wechsel der dendritischen Wachstumsphasen untersucht werden. Um festzustellen, ob zumindest eine Korrelation zwischen dendritischem Kalzium-Einstrom, Änderungen des dendritischen Wachstumsmodus und Änderungen der Aktivität von CaM Kinase II zu erkennen ist, wurde die Aktivität dieser Kinase zunächst in allen kritischen Entwicklungsstadien gemessen. Da sich die Verteilung der CaM Kinase II innerhalb eines Ganglions und auch innerhalb eines Neurons ändern kann, ohne daß es zu meßbaren Änderungen der Gesamtaktivität kommt, wurden mit immunhistochemischen Untersuchungen die

EINLEITUNG

Änderungen der Verteilung und Lokalisation der CaM Kinase II sowohl innerhalb des Nervensystems als auch intrazellulär beschrieben. Weiterhin wurden Experimente zur Regulation der CaM Kinase II Aktivität während der Entwicklung durchgeführt. Um die Funktion der CaM Kinase II bei der Entwicklung des Nervensystems direkt zu untersuchen, wurde die Kinase-Aktivität pharmakologisch gehemmt und Änderungen der Dendritenstruktur infolge dieser Manipulation mit retrograden Färbungen visualisiert. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, daß CaM Kinase II eine wichtige Rolle bei der Neuorganisation des Nervensystems während der Metamorphose von *Manduca sexta* spielt.