

3. Ergebnisse

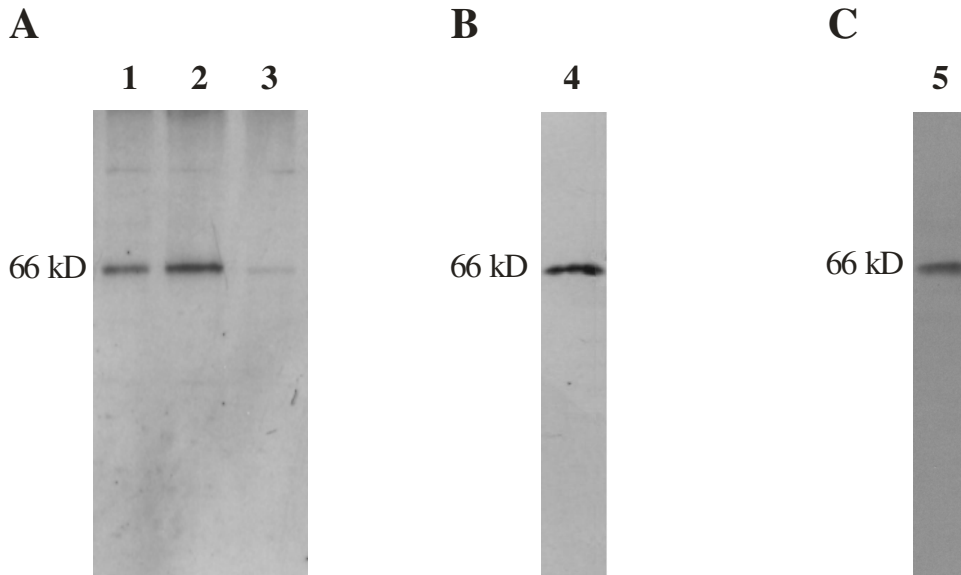
3.1. Charakterisierung der neuronalen CaM Kinase II aus *Manduca sexta*

Um CaM Kinase aus *Manduca sexta* zu charakterisieren, wurde sie zunächst mit Hilfe von Calmodulin-beschichteten „beeds“ aus Thorakalganglien isoliert wie unter Methoden beschrieben. Mit der isolierten Kinase wurden zuerst Autophosphorylierungs-Experimente durchgeführt. Die Proben wurden hierzu ohne Zugabe von nicht-radioaktivem ATP und ohne Substrat im Reaktionsansatz 30 Sekunden phosphoryliert; bis zur Autoradiographie wurden sie dann wie die Proben zur Substrat-Phosphorylierung weiter behandelt. Das Autoradiogramm von isolierter CaM Kinase zeigt eine einzige Bande, die auf der Höhe von 66 kD läuft (Abb. 9A). Diese Bande verschwand, wenn dem Phosphorylierungsansatz kein Kalzium hinzugefügt wurde. Ihre Intensität erhöhte sich dagegen, wenn dem Ansatz Kalzium hinzugefügt wurde und sie erhöhte sich weiter bei zusätzlichem Calmodulin im Reaktionsansatz. Anhand dieser Ergebnisse kann das isolierte Enzym als CaM Kinase identifiziert werden. Daß auch ohne Zusatz von Calmodulin Autophosphorylierung stattfindet kann man damit erklären, daß native CaM Kinase immer mit Calmodulin komplexiert ist und daher trotz der Isolierung auch ohne Zusatz Calmodulin im Reaktionsansatz vorhanden ist. Daß zusätzliches Calmodulin jedoch zu einer weiteren Intensitäts-Steigerung der Bande führt, ermöglicht eine eindeutige Identifikation als CaM-Kinase Bande. Im Nervensystem kommt sowohl die α - als auch die β -Isoform der CaM Kinase II als zytoplasmatisches bzw. mit dem Zytoskelett assoziiertes Protein vor (siehe Einleitung). Daher sollten bei der Autophosphorylierung eigentlich zwei Banden auftreten. Eine mögliche Erklärung für das Auftreten nur einer Bande könnte eine gleiche oder sehr ähnliche Größe der beiden Untereinheiten sein, so daß bei der Gelelektrophorese keine sichtbare Trennung zustande kommt.

Weiterhin wurden Western-Blot Experimente mit einem monoklonalen Antikörper gegen die α -Isoform der CaM Kinase II aus der Ratte durchgeführt, der in Nervengewebe-Homogenat aus *Bombyx mori* Immunoreaktivität gegen CaM Kinase II zeigt (Shanavas *et al.*, 1998). Isolierte CaM Kinase zeigt im Western-Blot eine Bande, die ebenfalls bei 66 kD läuft (Abb. 9B). Damit ist demonstriert, daß dieser Antikörper CaM Kinase aus *Manduca sexta* erkennt. Um zu testen, ob der Antikörper auch noch andere neuronale Proteine erkennt, wurde das gleiche Western Blot Experiment zusätzlich mit homogenisiertem Nervengewebe durchgeführt (Abb.

ERGEBNISSE

9C). Auch mit Nervengewebe-Homogenat aus *M. sexta* Thorakalganglien entsteht im Western-Blot nur eine Bande. Damit ist die Spezifität des Antikörpers nachgewiesen.



- 1: mit Kalzium
- 2: mit Kalzium, mit Calmodulin
- 3: ohne Kalzium, ohne Calmodulin
- 4: anti CaM Kinase II α gegen aufgereinigte CaM Kinase
- 5: anti CaM Kinase II α gegen Nervengewebe-Homogenat

Abb. 9 Weitere Charakterisierung der CaM Kinase II aus *Manduca sexta*. **A:** Autophosphorylierung von aus Nervengewebe isolierter CaM Kinase II. Mit zusätzlichem Kalzium im Reaktionsansatz erscheint eine Bande bei 66 kD (links), die mit zusätzlichem Calmodulin stärker wird (mitte) und ohne freies Kalzium fast vollständig verschwindet (rechts) **B:** Western-Blot mit isolierter CaM Kinase. Es entsteht eine Bande auf der Höhe von 66 kD. **C:** Western-Blot mit Nervengewebe-Homogenat. Es entsteht eine einzige Bande auf gleicher Höhe wie bei isolierter CaM Kinase.

Es handelt sich hier mit höchster Wahrscheinlichkeit um CaM Kinase II: zum Ersten tritt nur eine Bande auf und CaM Kinase II ist in Nervengewebe von allen Mitgliedern der Familie der Ca^{2+} /Calmodulin-abhängigen Proteinkinase mit weitem Abstand am höchsten konzentriert (siehe Einleitung), würden auch andere CaM Kinasen erkannt, müßten weitere, schwächere Banden zu sehen sein; zum Zweiten wurde ein Antikörper gegen die α -Isoform der CaM Kinase II aus der Ratte verwendet, die zu 75 % homolog zu dem Gen für CaM Kinase II aus *Drosophila melanogaster* ist (siehe Einleitung). Setzt man voraus, daß die Homologie dieses Gens unter den Insekten mindestes ebenso hoch ist wie die zwischen Fruchtfliege und Ratte, ist dies ebenfalls ein Argument für die Spezifität des Antikörpers zu CaM Kinase II; zum Dritten schließlich stammt das Substrat, das von isolierter CaM Kinase phosphoryliert wird, die im Western-Blot und bei Autophosphorylierungs-Assays eine Bande gleicher Größe er-

ERGEBNISSE

zeugt, aus der Autophosphorylierungsregion der CaM Kinase II und ist damit ebenfalls hochspezifisch.

Bei der bisherigen Charakterisierung der CaM Kinase II aus *Manduca* ist sowohl bei Western-Blots als auch bei Phosphorylierungs-Assays jeweils nur eine Bande aufgetreten, die der CaM Kinase II zugeordnet werden kann. Da bei der Charakterisierung der CaM Kinase II aus *Bombyx mori* im Western-Blot zwei CaM Kinase II Banden gefunden wurden besteht hier aufgrund der engen Verwandtschaft zwischen den beiden Spezies (beide *Lepidoptera*) ein Widerspruch. Da bei Shanavas *et al.* (1998) der Western-Blot mit phosphoryliertem Gewebes-Homogenat durchgeführt wurde lag die Vermutung nahe, daß eine der beiden Untereinheiten nur im phosphorylierten Zustand von dem Antikörper erkannt wird. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden Thorakalganglien in DEAE mit 1 mM EGTA homogenisiert. Das durch Zentrifugation von Geweberesten befreite Homogenat wurde dann mit 10 mM MgCl₂ und 10 µM ATP versetzt und danach in zwei gleiche Volumenteile aufgeteilt. Eine Hälfte wurde unter nicht aktivierenden Bedingungen belassen, bei der anderen wurden die im Homogenat befindlichen Kalzium-abhängigen Enzyme durch Zugabe von CaCl₂ im Überschuß (2 mM) aktiviert. Nach 2 min Reaktionszeit wurden dann Aliquots aus beiden Reaktionsansätzen in vorgelegten SDS-Probenpuffer pipettiert und die Phosphorylierungs-Reaktionen damit gestoppt. Die Proben wurden nach einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese einem Western-Blot mit dem Antikörper gegen CaM Kinase II α unterzogen. Wie in *Bombyx mori* (Shanavas *et al.*, 1998) zeigt phosphorylierte CaM Kinase II auch in *Manduca sexta* ansatzweise zwei Banden, die sehr dicht nebeneinander laufen (Abb. 10A). Shanavas *et al.* (1998) interpretieren diesem Befund dahingehend, daß beide im Nervensystem vertretenen Isoformen der CaM Kinase II, die α - und die β -Isoform, von dem Antikörper erkannt werden. Es bestand jedoch auch die alternative Interpretationsmöglichkeit, daß sich phosphorylierte CaM Kinase aufgrund veränderter sterischer und/oder elektrostatischer Eigenschaften bei der Elektrophorese bezüglich der Wanderungsgeschwindigkeit im elektrischen Feld anders verhält als nicht phosphorylierte und es sich somit bei dieser Beobachtung um einen Artefakt handelt. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden die Wanderungstrecke im Gel soweit wie möglich erhöht um eine möglichst hohe Auflösung bezüglich der Wanderungsgeschwindigkeit zu erreichen (Abb. 10B). Es ist deutlich zu erkennen, daß sich die Bande mit phosphorylierter CaM Kinase II schneller bewegt hat als die mit nicht-phosphorylierter. Dieses Ergebnis widerspricht der Interpretation von Shanavas *et al.* und gibt zu der Folgerung Anlaß, daß nur

ERGEBNISSE

eine Untereinheit der CaM Kinase II erkannt wird. Aufgrund der oben angeführten Homologie-Überlegungen könnte man annehmen, daß es sich hier um die α -Untereinheit handelt. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß in *Manduca* nur eine Isoform neuronaler CaM Kinase II existiert. Für diese Hypothese würde sprechen, daß auch bei der Autophosphorylierung nur eine Bande auftritt, obwohl sich beide Untereinheiten gegenseitig phosphorylieren können.

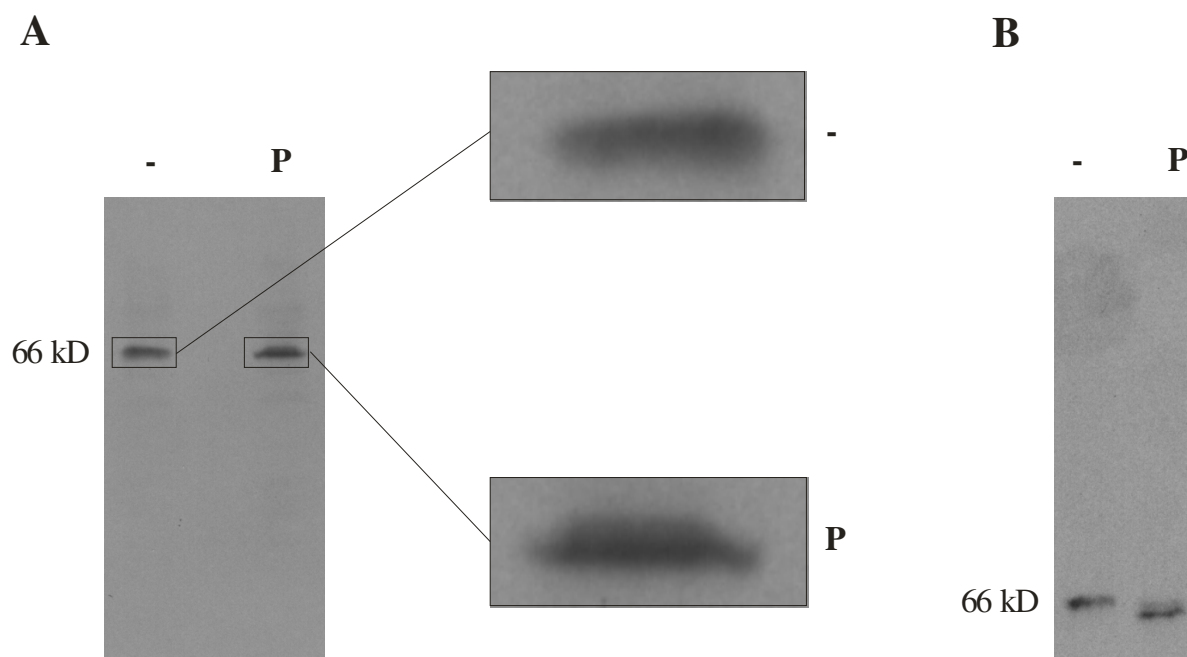


Abb. 10 Western-Blot mit phosphorylierter und nicht phosphorylierter CaM Kinase II. **A:** Nervengewebe-Homogenat von Thorakalganglien wurde unter nicht aktivierenden (-) und aktivierenden (P) Bedingungen 2 min inkubiert und dann einem Western-Blot mit anti-CaM Kinase II α unterzogen. Die Bande mit phosphorylierter CaM Kinase II (P) ist im Vergleich zu der mit nicht phosphorylierter (-) deutlich deformiert. **B:** Nach einer deutlich längeren Gel-Laufzeit ist erkennbar, daß dieser Effekt auf einer höheren Wanderungsgeschwindigkeit von phosphorylierter CaM Kinase II beruht.

3.2. Pharmakologische Inhibition von CaM Kinase II

Für die im Rahmen dieser Arbeit geplanten pharmakologischen Manipulationsexperimente wurde ein zuverlässiger und spezifischer CaM Kinase II Inhibitor benötigt. Nach Vergleich der unterschiedlichen in der Literatur beschriebenen Inhibitoren erschien das Methoxybenzen-sulfonamid KN-93 am besten geeignet. Die Inhibition erfolgt durch kompetitive Hemmung der Ca^{2+} /Calmodulin-Bindung. Gegenüber dem bei Shanavas *et al.* (1998) verwendeten KN-62, das sonst vergleichbare Eigenschaften hat, zeichnet sich KN-93 durch bessere Löslichkeit und eine höhere inhibitorische Wirksamkeit aus (Hudmon und Schulman, 2002). Die inhibitorische Wirksamkeit von KN-93 bei CaM Kinase II aus *M. sexta* wurde zunächst *in vitro* gete-

ERGEBNISSE

stet. Zu diesem Zweck wurde Nervengewebe-Homogenat unmittelbar nach dem Auftauen mit verschiedenen Konzentrationen KN-93 versetzt und dann sofort unter nicht aktivierenden Bedingungen phosphoryliert. Als Kontrolle diente jeweils Gewebe-Homogenat des selben Tieres, das nicht mit KN-93 versetzt wurde.

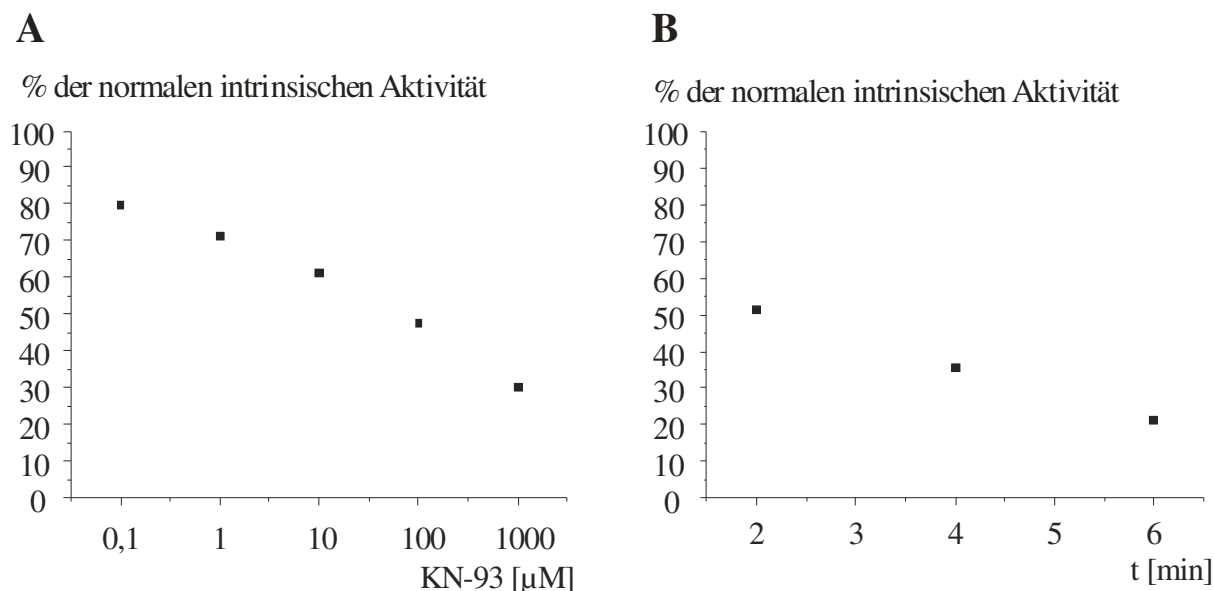


Abb. 11 *In vitro*-Test des CaM Kinase II Inhibitors KN-93. **A:** Homogenisiertes Nervengewebe wurde unmittelbar nach dem Auftauen mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors versetzt und die CaM Kinase II Aktivität per Substratphosphorylierung gemessen. Es zeigt sich eine Abhängigkeit der Aktivitätsreduzierung von der Konzentration des Inhibitors. **B:** Abhängigkeit der Wirksamkeit des CaM Kinase II Inhibitors KN-93 von der Einwirkungsdauer. Nervengewebe-Homogenat wurde verschieden lange mit 10 μM KN-93 inkubiert und dann phosphoryliert. Die Messungen ergaben eine Abhängigkeit der Inhibition von der Einwirkungszeit des Inhibitors.

Die Werte der Inhibitor-Messungen wurden durch die Kontrollwerte dividiert und in Prozent gegen die KN-93 Konzentration aufgetragen. Hierbei zeigte sich eine dosisabhängige Inhibition der CaM Kinase II (Abb. 11A). Bei einer Konzentration des Inhibitors von 10 μM wurde die Aktivität der CaM Kinase II um ca. 40 % reduziert. Da es sich um einen kompetitiven Inhibitor handelt ist jedoch auch die Einwirkungsdauer von entscheidender Bedeutung. Der Inhibitor muß den Aktivator $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ partiell von seiner Bindungsstelle verdrängen, bis sich das Gleichgewicht zwischen mit $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ und mit KN-93 komplexierter CaM Kinase II eingestellt hat. Daher wurde auch die Abhängigkeit der inhibitorischen Wirkung von der Einwirkungszeit des Inhibitors *in vitro* untersucht. Hierzu wurde Gewebehomogenat unmittelbar nach dem Auftauen mit 10 μM KN-93 versetzt und Aliquods nach verschiedenen Zeiten mit Probenpuffer versetzt um die Reaktion zu stoppen (Abb. 11B). Die Werte wurden wie bei der Messung der Konzentrationsreihe aufgetragen. Es zeigte sich in der Tat eine Abhängigkeit der

ERGEBNISSE

Kinase-Aktivität von der Einwirkungszeit des Inhibitors. Um die Wirksamkeit von KN-93 auch *in vivo* zu testen, wurde der Inhibitor mit einer Endkonzentration von 10 μM an aufeinander folgenden Tagen einmal pro Tag während der normalen Entwicklung in die Hämolymphe injiziert; bei den Kontrolltieren wurde Wasser injiziert. Hierzu wurden die Puppenstadien P4 und P5 ausgewählt, in denen die CaM Kinase II Aktivität normalerweise ansteigt (siehe unten). Es wurde dann an dem auf die letzte Injektion folgenden Tag, im Stadium P6, die intrinsische CaM Kinase II Aktivität per Phosphorylierungsassay gemessen. Die Pharmaka-Injektionen und die Kontrollinjektionen wurden an je fünf Tieren durchgeführt, um ein statistisch aussagekräftiges Ergebnis zu erhalten. Die Messungen ergaben eine signifikante Reduktion der intrinsischen Aktivität um ca. 30 % (Abb. 12). Dieses Resultat spricht für eine hohe Wirksamkeit, da die Substanz zunächst von außen in die Ganglien und in die Zellen eindringen muß. Zudem wird nur die Aktivierung durch Ca^{2+} / CaM-Bindung beeinflusst, nicht aber die Aktivierung durch Autophosphorylierung. Peptidinhibitoren, die beide Aktivierungswege inhibieren könnten, schieden von vorne herein aus, da sie die Zellmembran nicht durchdringen können.

relative intrinsische Aktivität

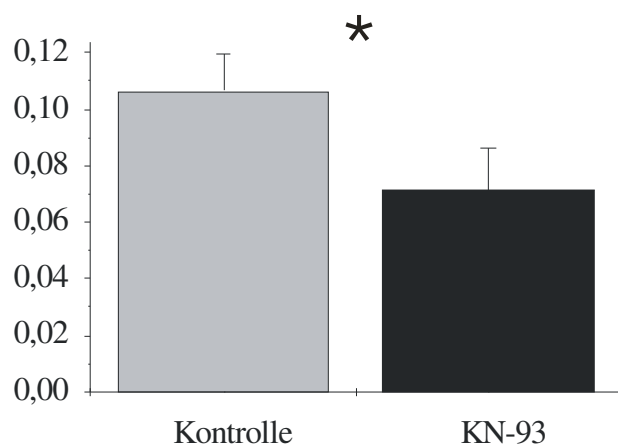


Abb. 12 *In vivo*-Test des CaM Kinase II Inhibitors KN-93. *M. sexta* wurde in den Puppenstadien P4 und P5 wie im Methodenteil beschrieben bis zu einer Endkonzentration von 10 μM mit KN-93 injiziert. Im Stadium P6 wurden die Thorakalganglien entnommen und die CaM Kinase II Aktivität gemessen. Im Vergleich zu den mit Wasser injizierten Kontrolltieren war die CaM Kinase II Aktivität signifikant um ca. 30 % reduziert.

3.3. Änderungen der CaM Kinase II Aktivität während der Entwicklung

Ein Ziel dieser Arbeit ist, die Aktivitätsentwicklung der CaM Kinase II im Laufe der Entwicklung zu untersuchen, um erste Schlüsse hinsichtlich einer möglichen Rolle der CaM Kinase II bei der Umgestaltung des Nervensystems während der Metamorphose zu ermöglichen. Um festzustellen, ob eine Korrelation zwischen dem dendritischen Kalzium-Einstrom, der Änderung des dendritischen Wachstumsverhaltens und der Entwicklung der CaM Kinase II Aktivität besteht, wurde diese in ausgewählten Stadien während der Metamorphose gemessen.

ERGEBNISSE

Es wurde sowohl die intrinsische als auch die Kalzium stimulierte Aktivität gemessen und diese als Anteile der gesamten CaM Kinase II Aktivität aufgetragen um relative Aktivitäten zu erhalten (siehe Methoden).

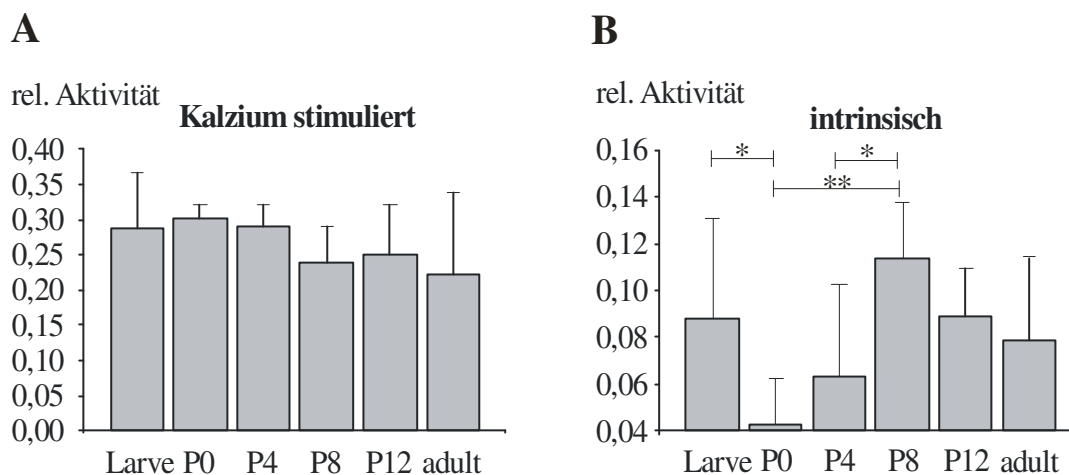


Abb. 13 Messungen der CaM Kinase II Aktivität in verschiedenen Entwicklungsstadien unter aktivierenden und nicht aktivierenden Bedingungen. **A:** Messung unter aktivierenden Bedingungen. Während der gesamten Meßreihe wird keine signifikante Änderung registriert. **B:** Messung unter nicht aktivierenden Bedingungen. Zu Beginn der Puppenentwicklung sinkt die intrinsische Aktivität drastisch ab und steigt dann wieder an, um ihr Maximum im Stadium P8 zu erreichen. Die Steigerung von P0 zu P8 ist hochsignifikant (**, $p \leq 0,01$). Danach sinkt die intrinsische Aktivität bis zum Adult-Stadium wieder signifikant ab (ANOVA mit Newman-Keuls posthoc test, $p = 0,05$).

Bei Stimulation mit zusätzlichem Kalzium, d.h. bei Zugabe von CaCl_2 zum Reaktionsansatz, gab es keine signifikanten Unterschiede der CaM Kinase II Aktivität zwischen den gemessenen Stadien während der Metamorphose (Abb. 13A). Daraus folgt, daß der Anteil an aktivierbarer CaM Kinase II an der Kinaseaktivität des gesamten Ganglions während der gesamten Metamorphose nahezu konstant bleibt und keine signifikanten Änderungen erfährt. Wird dagegen kein Kalzium zum Reaktionsansatz gefügt, also die intrinsische Aktivität gemessen (siehe Methoden), zeigen sich signifikante Änderungen der CaM Kinase II Aktivität während der Metamorphose (Abb. 13B): Am Tag der Verpuppung sinkt die CaM Kinase II Aktivität um mehr als 50 % (P0, Abb. 13B), im weiteren Verlauf der Puppenentwicklung steigt die Kinase Aktivität wieder an und erreicht im Stadium P8, d. h. nach ca. 50 % der Puppenentwicklung ihren Höhepunkt. Die zweite Hälfte der Puppenentwicklung ist durch ein signifikantes Absinken der intrinsischen CaM K II Aktivität bis zum Schlüpfen gekennzeichnet. Die relative intrinsische Aktivität in der Larve unterscheidet sich nicht signifikant von der im adulten Insekt. Wird die intrinsische CaM Kinase II Aktivität durch die Kalzium-stimulierte Aktivität dividiert und in Prozent aufgetragen (Abb. 14), ergibt sich ein ähnlicher Verlauf wie

bei der intrinsischen Aktivität (Abb. 13B), weil die stimulierte Aktivität weitgehend konstant bleibt.

% intrinsische von maximaler Aktivität

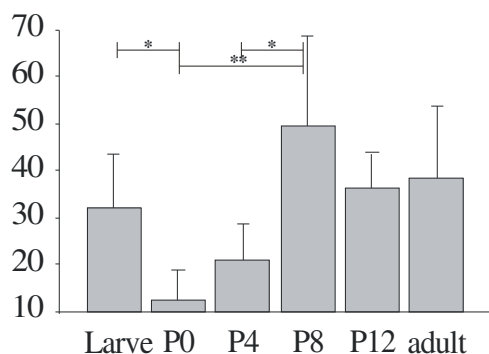


Abb. 14 Prozentualer Anteil der intrinsischen Aktivität an der maximalen Aktivität. Der Verlauf der Änderungen während der Metamorphose entspricht in etwa dem Verlauf der intrinsischen Aktivität.

Weiterhin kann festgestellt werden, daß das Maximum der intrinsischen CaM Kinase II Aktivität im Stadium P8, also in dem Stadium erreicht wird, in dem der Wechsel der Wachstumsphasen und die Erhöhung der dendritischen Kalzium-Konzentration stattfindet. Dieses Ergebnis ist somit eine erste Bestätigung der Arbeitshypothese, daß dendritischer Kalzium-Einstrom den Wechsel des dendritischen Wachstumsverhaltens im Stadium P8 einleitet. Um diesen ersten Hinweis weiter zu überprüfen, wurden im folgenden sowohl pharmakologische Manipulationsexperimente durchgeführt, deren Angriffspunkte Kalzium-Kanäle und die CaM Kinase II selbst waren, als auch weitere deskriptive Studien, die die Verteilung der CaM Kinase II im Ganglion, die Verteilung zwischen Prä- und Postsynapse und die Verteilung innerhalb eines Neurons betrafen. Zunächst wurde jedoch zusätzlich die Aktivität der durch cAMP, den zweiten in nahezu allen eukaryotischen Zellen anzutreffenden „second messenger“, aktivierbaren Proteinkinase A, die ebenfalls Einfluß auf die neuronale Plastizität hat (z.B. Miskovich *et al.*, 2002), in den selben Stadien wie bei der CaM Kinase II gemessen (Statistik: ANOVA mit Newman-Keuls post hoc test).

3.4. Änderungen der PKA-Aktivität während der Entwicklung

Um einen Eindruck zu gewinnen, ob alle Kinasen während der Entwicklung die gleiche Aktivitätsentwicklung verfolgen, wurde zusätzlich untersucht, ob sich die PKA-Aktivität im Laufe der Entwicklung signifikant ändert (Abb. 15). Die maximale, durch Stimulation mit zusätzlichem cAMP erreichbare PKA-Aktivität verhält sich ähnlich wie die maximale CaM Kinase II Aktivität: Es gibt während der gesamten Entwicklung keine signifikanten Änderungen (Abb. 15A). Die intrinsische PKA-Aktivität entwickelt sich dagegen grundsätzlich anders als die

ERGEBNISSE

intrinsische Aktivität der CaM Kinase II (Abb. 15B). Im Larvenstadium L5 ist die Aktivität am höchsten und sinkt am Tag der Verpuppung (P0) um ca. 50 % ab ($p \leq 0,01$). In der weiteren Entwicklung ändert sich die intrinsische PKA-Aktivität nicht mehr signifikant. Dieses Resultat läßt vermuten, daß Kalzium-abhängige Kinasen anders reguliert werden als andere, z. B. cAMP-regulierte Kinasen (Statistik: ANOVA mit Newman-Keuls post hoc test, $p=0,05$).

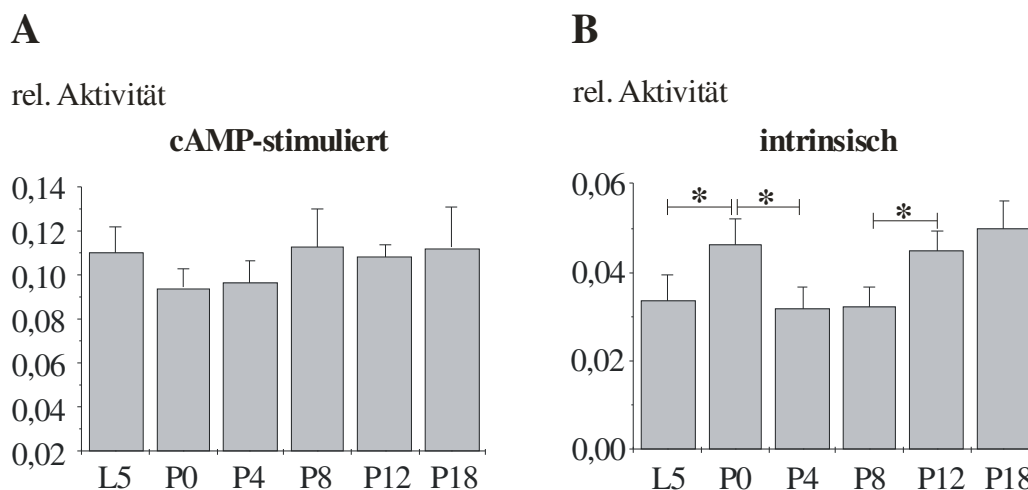


Abb. 15 Messungen der Proteinkinase A-Aktivität in verschiedenen Entwicklungsstadien. **A:** Messung der maximalen Aktivität unter aktivierenden Bedingungen, dem Reaktionsansatz sind $10 \mu\text{m cAMP}$ hinzugefügt worden. Zwischen den einzelnen Messungen können keine signifikanten Änderungen festgestellt werden. **B:** Messung der intrinsischen Aktivität ohne zusätzliches cAMP. Zu Beginn der Puppenentwicklung steigt die intrinsische Aktivität signifikant an und fällt bis zum Stadium P4 wieder signifikant ab auf ein Niveau, das dem von L5 gleicht. Dort bleibt sie auch im Stadium P8. Am Ende der Puppenentwicklung steigt die Aktivität wieder signifikant an (Statistik: ANOVA mit Newman-Keuls posthoc test, $p = 0,05$).

3.5. Inhibition von Ca^{2+} -Kanälen und ihr Effekt auf die CaM Kinase II Aktivität

Ausgehend von den oben beschriebenen Ergebnissen sollte als Nächstes *in vivo* untersucht werden, ob Änderungen der CaM Kinase II Aktivität während der Entwicklung Änderungen der neuronalen Aktivität widerspiegeln. In früheren Studien wurde gezeigt, daß sich die Amplitude der Kalzium-Membranströme von thorakalen Motoneuronen in *Manduca sexta* zwischen den Puppenstadien P0 und P8 erhöht (Duch und Levine, 2000; Grunewald und Levine, 1998). Weiterhin haben Kalzium-Imaging Experimente gezeigt, daß zumindest in dem Flug-Motoneuron MN5 solche entwicklungsbedingten Erhöhungen der Kalzium-Membranströme zu einer Erhöhung der intrazellulären Kalzium-Konzentration führen. Wie oben angedeutet, besteht hier eine zeitliche Korrelation zu der Beobachtung, daß die intrinsische CaM Kinase II Aktivität in P8 ebenfalls höher ist als in früheren Stadien.

ERGEBNISSE

Um nun zu testen, ob der beobachtete entwicklungsbedingte Anstieg der intrinsischen CaM Kinase II Aktivität während der ersten Hälfte der Puppenentwicklung auf entwicklungsbedingte Änderungen des Kalzium-Einstroms zurückzuführen ist, wurden die Kalzium-Membranströme während der normalen Entwicklung durch systemische Injektionen des Kalzium-Kanal Blockers Verapamil (Verapamil-Hydrochlorid, Alexis Biochemicals) blockiert. Das Phenylalkylamin Verapamil blockiert in niedrigen Konzentrationen in Vertebraten spezifisch den L-Typ spannungsabhängiger Kalzium-Kanäle (L-type voltage gated Kalzium channels, L-type VGCC's), nähere Informationen z. B. im Übersichtsartikel von Hockerman *et al.* (1997), und in höheren Konzentrationen von über 400 μM unspezifisch auch andere Kalzium-Kanäle in Insekten (Benquet *et al.* 2000). In Zellkultur konnten durch Depolarisation induzierte Kalzium-Ströme in *Manduca*-Gliazellen nahezu vollständig durch 400 μM Verapamil blockiert werden (Lohr *et al.* 2002).

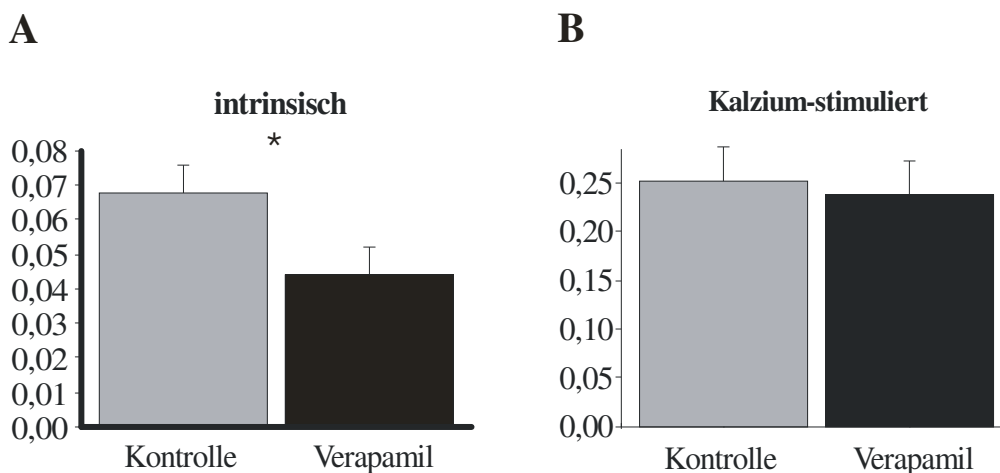


Abb. 16 *In vivo*-Test des Kalzium-Kanal Blockers Verapamil. In den Stadien P4, P5 und P6 wurde Verapamil in die Hämolymphe injiziert. **A:** Im Stadium P7 wurde die intrinsische CaM Kinase II Aktivität durch Phosphorylierungsassays gemessen. Die Messungen ergaben eine signifikante Verringerung der Aktivität im Vergleich zu den Kontrolltieren. **B:** Die maximale Aktivität wird durch systemische Verapamil-Injektionen nicht signifikant beeinflusst (Statistik: Student's T-Test, $p = 0,05$).

Verapamil wurde in den Puppenstadien P4 bis P7 täglich injiziert, was zu einer Konzentration in der Hämolymphe von ca. 500 μM geführt hat (siehe Methoden). In dieser Entwicklungsperiode steigt die Amplitude der Kalzium-Membranströme normalerweise signifikant an (Duch und Levine, 2000). Die Verapamil-Injektionen führten zu einer signifikanten Verringerung der intrinsischen CaM Kinase II Aktivität im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 16A, $p < 0,05$). Der zeitliche Verlauf der normalen Entwicklung wurde durch die Injektionen nicht beeinflusst und die Tiere hatten keine sichtbaren entwicklungsbedingten Defizite. Die Kal-

ERGEBNISSE

zium-stimulierte CaM Kinase II Aktivität war unverändert im Vergleich zu den Kontrolltieren (Abb. 16B). Um zu testen, ob sich Verapamil z.B. aufgrund allgemeiner Toxizität auf die Expression und Verteilung der CaM Kinase II im Nervensystem auswirkt, wurden Immunfärbungen von Mesothorakalganglien aus Verapamil-injizierten Tieren und Kontrolltieren angefertigt (Abb. 17). Sowohl die Verteilung als auch die Intensität der CaM Kinase II Immunreaktivität unterscheiden sich nicht zwischen manipulierten Tieren und Kontrolltieren; die gleichbleibende Kalzium-stimulierte CaM Kinase II Aktivität und auch die durch Verapamil nicht beeinflusste CaM Kinase II Immunreaktivität deuten darauf hin, daß die Expression der CaM Kinase II durch die Verapamil-Injektionen nicht beeinflusst wird.

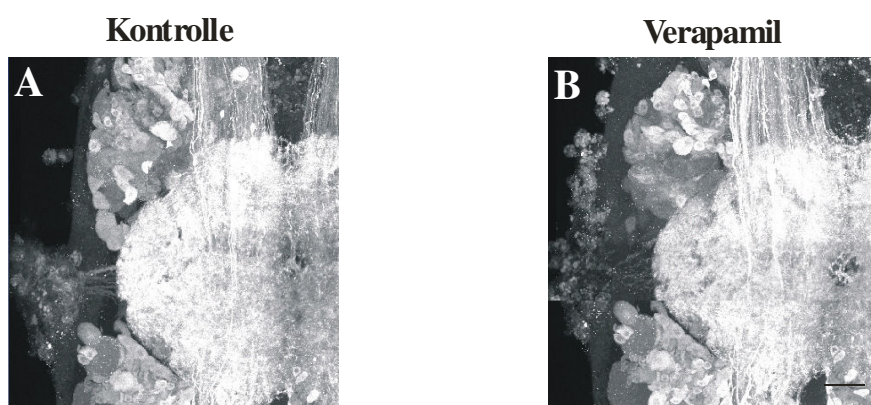


Abb. 17 Test, ob Verapamil-Injektion die CaM Kinase II Expression beeinflusst. **A:** Kontrolle. Tiere wurden in P4 und P5 mit Wasser injiziert. **B:** Verapamil-Injektion in P4 und P5. Es gibt keine erkennbaren Unterschiede in der CaM Kinase II Expression zwischen dem manipulierten Tier und der Kontrolle. Maßstab: 50 μ m.

Die mit Verapamil injizierten Tiere zeigten jedoch, wie oben erwähnt, bei Phosphorylierungs-Assays eine signifikant verringerte intrinsische CaM Kinase II Aktivität (Abb. 16A). Pharmakologische Inhibition von Kalzium-Kanälen führt also zu einer verringerten CaM Kinase II Aktivität ohne die Expression der Kinase zu beeinflussen. Damit wird noch einmal die oben aufgestellte These untermauert, daß entwicklungsbedingte Änderungen der CaM Kinase II Aktivität über den Kalzium-Einstrom gesteuert werden. Außerdem wird gezeigt, daß es mit dem hier verwendeten Kalzium Kanal-Blocker möglich ist, Kalzium-Membranströme soweit zu inhibieren, daß dies zu einer signifikanten Abnahme der CaM Kinase II Aktivität führt. Dies bedeutet auch, daß es während der Puppenentwicklung zu Kalzium-Einstrom durch spannungsabhängige Kalzium-Kanäle kommt, der die CaM Kinase II Aktivität betrifft (Statistik: Student's T-Test).

3.6. Änderungen der Verteilung der CaM Kinase II während der Metamorphose

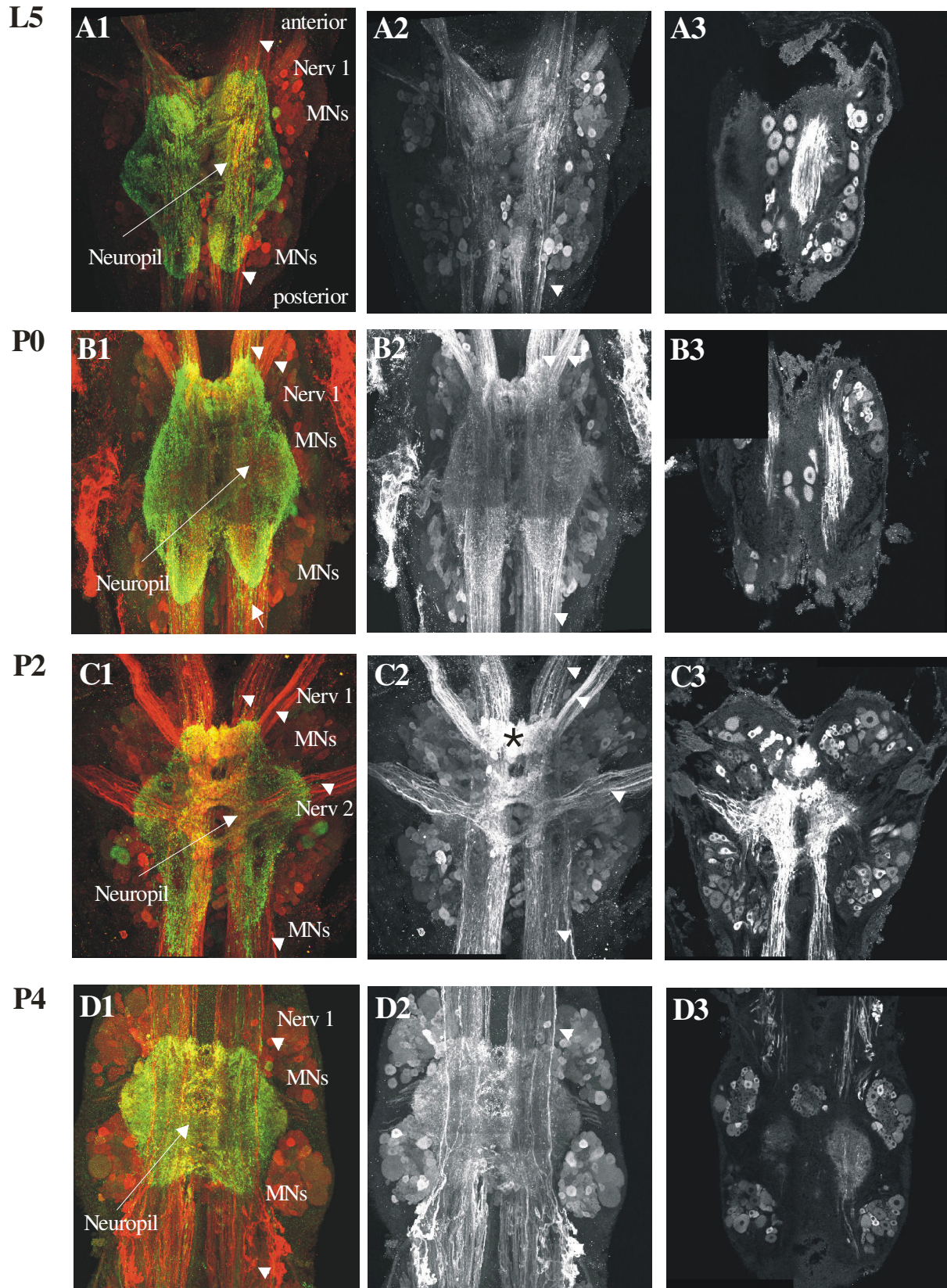
Die Substrat-Phosphorylierungen zur Messung der CaM Kinase II Aktivität wurden mit Homogenaten von Meso- und Metathorakalganglien durchgeführt. Daher konnte mit diesem Ansatz nicht festgestellt werden, ob die dort gemessenen entwicklungsbedingten Änderungen der intrinsischen CaM Kinase II Aktivität auf gleichmäßige Änderungen der Aktivität in allen Arten von thorakalen Nervenzellen zurückzuführen sind oder ob es sich um begrenzte Änderungen in bestimmten Populationen von Neuronen oder in bestimmten Bereichen des Ganglions handelt. Um die Verteilung der CaM Kinase II in den Thorakalganglien zu untersuchen wurden immunhistochemische Färbungen an Ganzpräparaten bzw. Agaroseschnitten von Meso- und Metathorakalganglien in ausgewählten Entwicklungsstadien durchgeführt. Agaroseschnitte mußten in älteren Stadien angefertigt werden, weil wegen der zunehmenden Größe der Ganglien eine ausreichende Eindringtiefe des Antikörpers nicht mehr gewährleistet war und z.B. die Neuropil-Region nicht mehr vollständig erreicht wurde.

Es wurden mehrere Antikörper gegen CaM Kinase II getestet, von denen nur einer im Western-Blot Immunoreaktivität gegen CaM Kinase II aus *Manduca sexta* zeigte (siehe oben). Es handelt sich hier um einen monoklonalen Maus-Antikörper gegen die α -Untereinheit der CaM Kinase II aus der Ratte. Es wurde bereits gezeigt, daß dieser Antikörper CaM Kinase II aus *Bombyx mori* erkennt (Shanavas *et al.* 1998).

Um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten, wurden alle Präparate in demselben Ansatz behandelt. Es wurde zudem eine Doppelmarkierung mit anti-Synaptotagmin (von Dr. Leslie Tolbert; Tucson, Arizona, USA) durchgeführt um die Neuropilregion zu markieren. Von den Präparaten wurden konfokale Aufnahmen angefertigt, wie im Methodenteil beschrieben. Anti-CaM Kinase II α wurde mit Cy3 markiert (rot), anti-Synaptotagmin mit Cy5 (grün).

Die Immunfärbungen an Ganzpräparaten (Abb. 18, 19 und 20) und Agaroseschnitten (Abb. 21 und 22) zeigen deutliche Änderungen der Expression und Verteilung der CaM Kinase II. Im Larven-Stadium (L5) wird CaM Kinase II in fast allen Neuronen exprimiert: Expression von CaM Kinase II wird in allen Zell-Kompartimenten detektiert und zudem im Neuropil, in den Axon-Trakten und in vielen Somata (Abb. 18A1, A2, A3). Fast alle Zellkörper zeigen etwas CaM Kinase II Immunoreaktivität, es gibt aber Unterschiede in der Färbungs-Intensität und damit in der Stärke der Expression (Abb. 18A1, A2). Es wurde hier nicht genauer unter

ERGEBNISSE



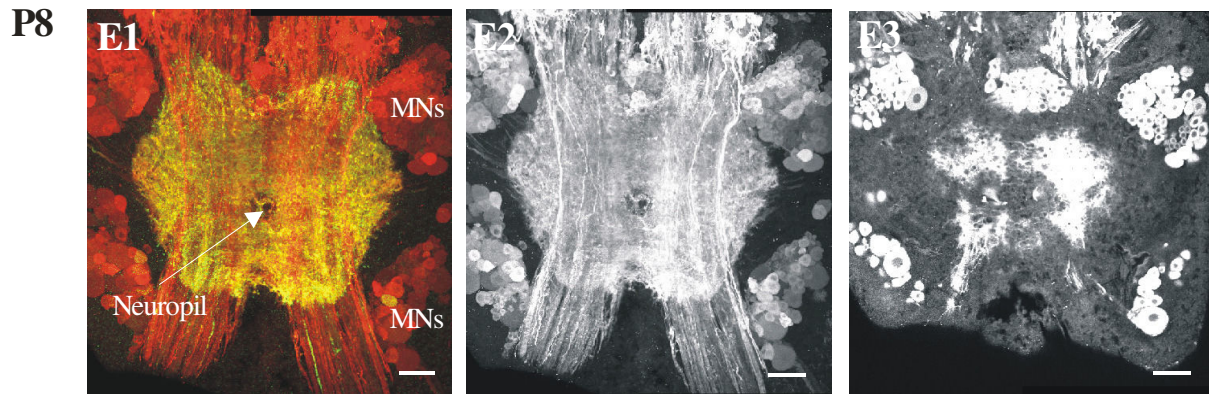


Abb. 18 Doppelmarkierung an ganzen Mesothorakalganglien mit anti-CaM Kinase II α (rot) und anti-Synaptotagmin (grün). Die Synaptotagminfärbung dient hier zur Markierung der Neuropilregion. Es werden Projektionsansichten beider Kanäle gezeigt (A1 bis E1), Projektionsansichten des CaM Kinase II α Kanals (A2 bis E2), da hier die Intensitätsunterschiede der Immunoreaktivität besser zu sehen sind und optische Einzelschnitte des CaM Kinase II α Kanals in 25 μm Tiefe (A3 bis E3). **A:** Larvenstadium L5, **B:** Puppenstadium P8, **C:** Puppenstadium P2, **D:** Puppenstadium P4, **E:** Puppenstadium P8. Maßstab: 50 μm .

sucht, ob bestimmte Typen von Neuronen gleiche Färbungs-Intensitäten zeigen. Zellkörper von Motoneuronen zeigen jedoch meistens eine CaM Kinase II Immunoreaktivität von mittlerer Intensität, wie man in einem repräsentativen optischen Schnitt sehen kann (Abb. 18A3). Hier sind die großen Zellkörper der intersegmentalen Interneurone (Sun *et al.*, 1995) entlang der dorsalen Mittellinie des Mesothorakalganglions zu erkennen.

Doppelfärbungen mit Synaptotagmin (Abb. 18A1, grün) zeigen deutlich erkennbare CaM Kinase II Immunoreaktivität (Abb. 18A1, rot, Überlappung mit Synaptotagmin gelb) in den thorakalen Neuropilregionen der Larve. Auch in optischen Einzelschnitten durch die dorsale mesothorakale Neuropilregion ist prominente CaM Kinase II Immunoreaktivität zu erkennen (Abb. 18A3, weißer Pfeil). Axone mit prominenter CaM Kinase II Immunoreaktivität können in den anterioren und posterioren Konnektiven des Mesothorakal-Ganglions und in Axonen, die in Nerv 1 laufen, lokalisiert werden (Abb. 18A1, A2, weiße Pfeile). Genauere Inspektionen der Bilderstapel lassen auch Immunoreaktivität in den axonalen Trakten innerhalb des Ganglions erkennen (Abb. 19).

Im Larvalstadium L5 wird CaM Kinase II Immunoreaktivität in den Somata, den Axon-Trakten und den Neuropilregionen der Thorakal-Ganglien detektiert. Am Beginn der Puppenentwicklung (Stadium P0, Abb. 18B1, B2, B3) sind nur geringe Änderungen bei Intensität und Verteilung der Immunoreaktivität zu beobachten, wobei die Intensität der Immunoreakti

ERGEBNISSE

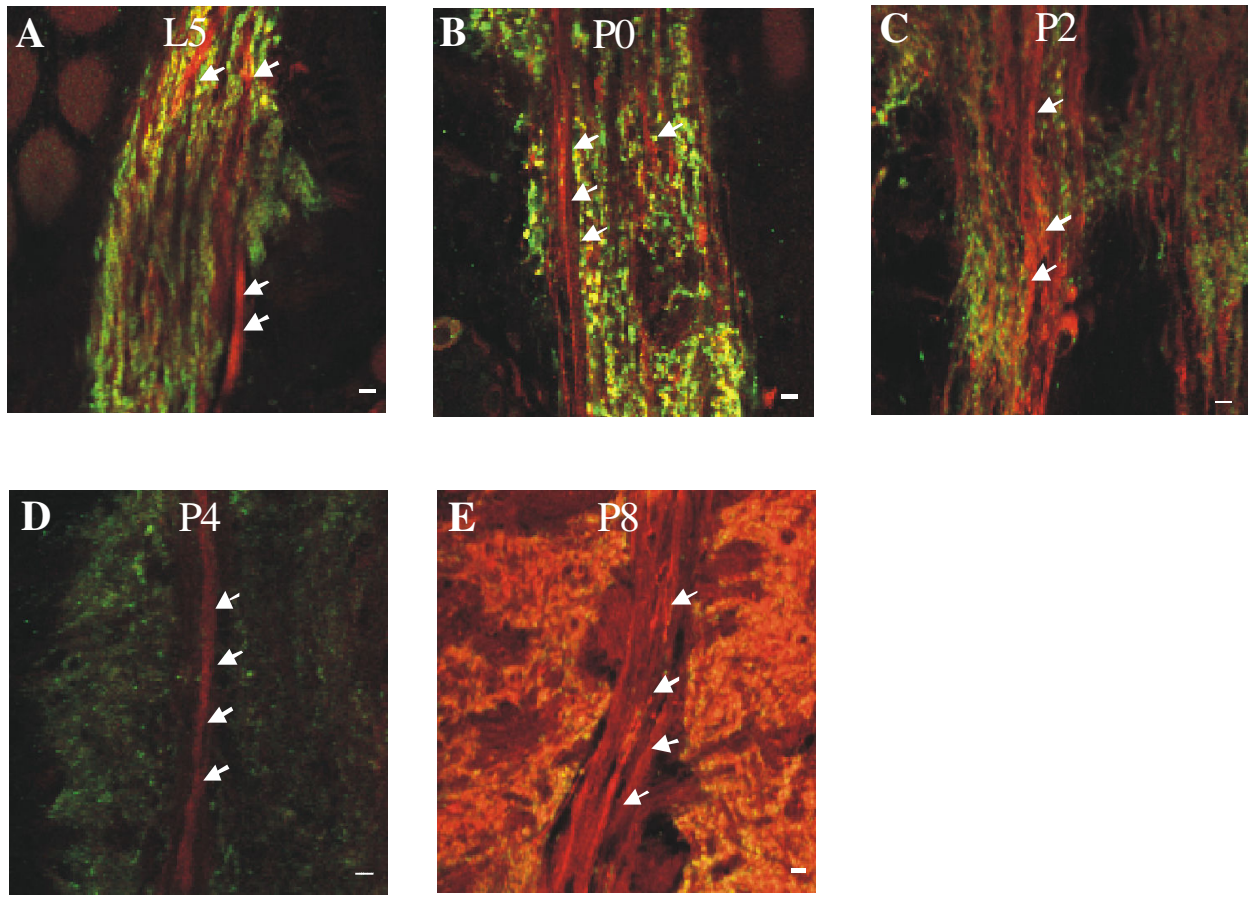


Abb. 19 CaM Kinase II Immunoreaktivität in den Axontrakten innerhalb des Neuropilgebietes. Es werden Ausschnitte aus optischen Einzelschnitten von anti-CaM Kinase II α / anti-Synaptotagmin doppelmarkierten Mesothorakalganglien gezeigt; gleiche Farbkodierung wie oben. In allen hier gezeigten Stadien ist Immunoreaktivität in den Axontrakten erkennbar (weiße Pfeilspitzen). **A:** Larvenstadium L5, **B:** Puppenstadium P0, **C:** Puppenstadium P2, **D:** Puppenstadium P4, **E:** Puppenstadium P8. Maßstab: 5 μ m.

vität in den Axonen zunimmt (Konnektive und Nerv 1 in Abb. 18B1, B2, weiße Pfeile) und viele Zellkörper eine weniger intensive Immunoreaktivität zeigen (Abb. 18B1, B2). Die CaM Kinase II Expression im Neuropil bleibt zwischen den Stadien L5 und P0 unverändert (Abb. 18A3, B3). Die folgenden zwei Tage der Puppenentwicklung sind durch eine signifikante Neu-Verteilung der CaM Kinase II Expression gekennzeichnet. Am dritten Tag der Puppenentwicklung, im Stadium P2, kann fast keine Immunoreaktivität in den Neuropil-Regionen detektiert werden (Abb. 18C1, C2, C3). Die Färbung in den Zellkörpern erscheint schwächer im Vergleich zu früheren Stadien, die axonale Immunoreaktivität ist dagegen intensiver als in früheren Stadien (Abb. 18C1, C2, weiße Pfeile). Besonders starke CaM Kinase II Immunoreaktivität wird in den axonalen Verzweigungen von sensorischen Fasern mit Endigungen im Mesothorakal-Ganglion detektiert (Abb. 18C2, *). Dies wird besonders deutlich in einzelnen optischen Schnitten durch die ventralen Axon-Trakte des Mesothorakal-Ganglions (Abb.

ERGEBNISSE

18C3). Die starke CaM Kinase II Expression in den Axonen verschwindet während den folgenden zwei Tagen der Puppenentwicklung. Im Puppenstadium P4 zeigen nur wenige Axone im Mesothorakalganglion CaM Kinase II Immunreaktivität (Abb. 18D1, D2, weiße Pfeile).

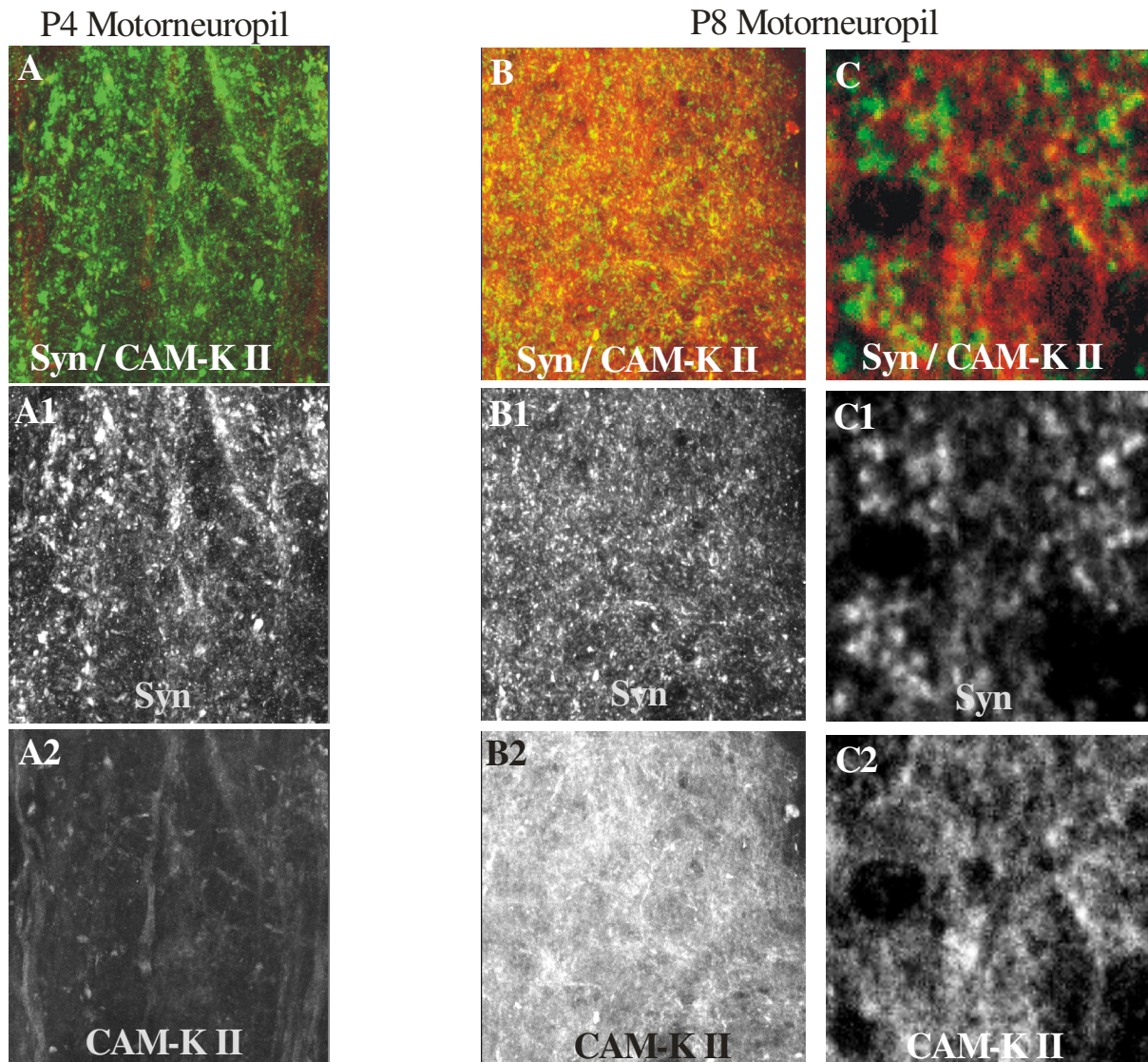
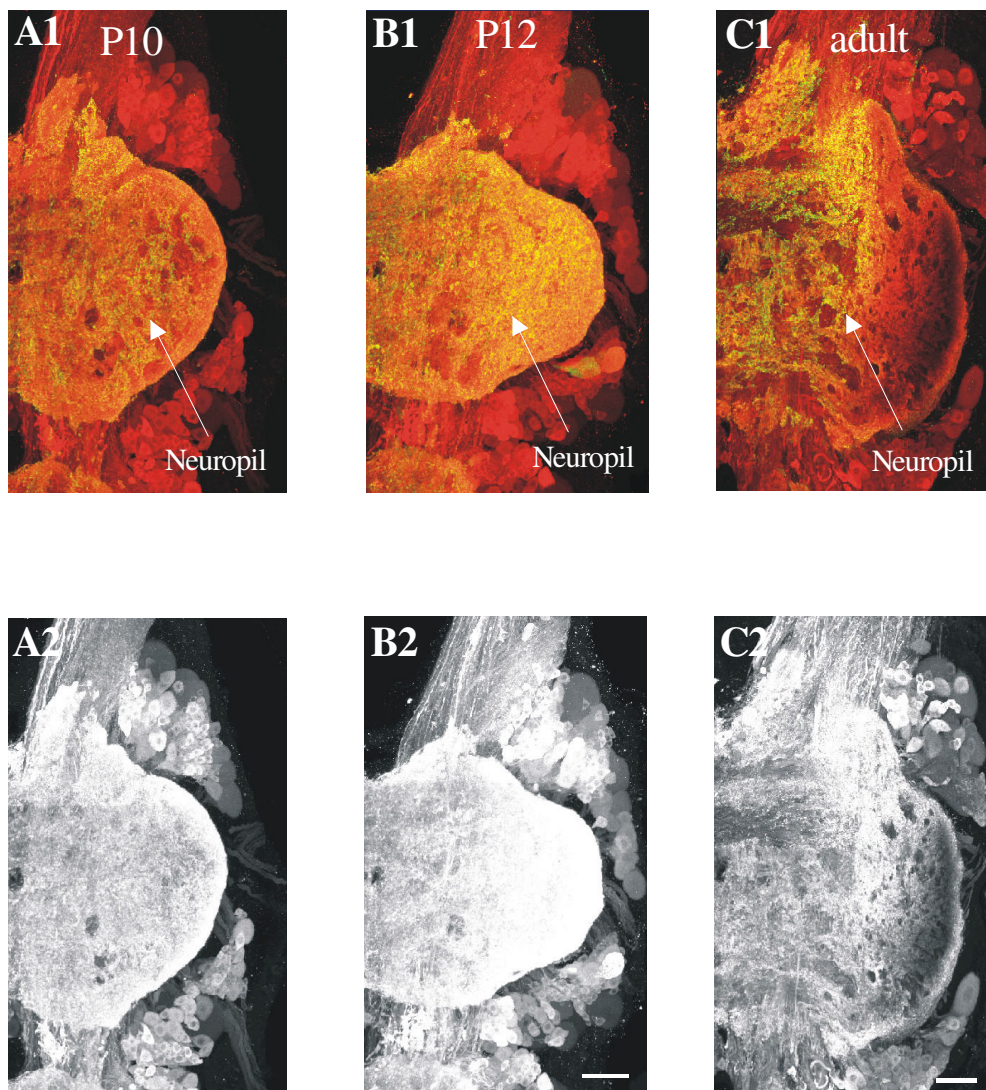


Abb. 20 CaM Kinase II- und Synaptotagmin-Immunreaktivität in vergleichbaren Neuropilregionen aus den Puppenstadien P4 und P7. **A:** Im Stadium P4 ist fast keine CaM Kinase II Immunreaktivität im Neuropil zu beobachten. **B:** In P8 ist dagegen deutliche CaM Kinase II Immunreaktivität im Neuropil zu erkennen. **C:** Bei stärkerer Vergrößerung erkennt man, daß CaM Kinase II- und Synaptotagmin-Immunreaktivität nicht kolokalisiert sondern benachbart auftreten. Da Synaptotagmin ein präsynaptisches Protein ist kann man daraus schließen, daß CaM Kinase II im Stadium P8 vorwiegend postsynaptisch exprimiert wird.

Die Neuropilregionen zeigen immer noch keine CaM Kinase II Immunreaktivität (Abb. 18D2, D3). Im Gegensatz dazu ist die Expression in manchen Zellkörpern im Stadium P4 (Abb. 18D2) stärker im Vergleich zu Stadium P2 (Abb. 18C2). Die folgenden zwei Tage der

ERGEBNISSE

Puppenentwicklung sind durch einen drastischen Anstieg der CaM Kinase II Immunoreaktivität in den Somata, in den Axon-Trakten und im Neuropil gekennzeichnet (Abb. 18E1, E2, E3, 17B). Zellkörper und Axone im Mesothorakalganglion zeigen eine sehr intensive Färbung (Abb. 18E1, E2), die sogar stärker ist als die im Larvenstadium L5 (Abb. 18A1, A2). Weiterhin erscheint die CaM Kinase II Immunoreaktivität im Neuropil erheblich stärker als in jedem früheren Stadium (Abb. 18E2, E3). Der signifikante Anstieg der CaM Kinase II Immunoreaktivität im Neuropil wird demonstriert durch die enge Assoziation von Synaptotagmin- und CaM Kinase II-Immunoreaktivität im Puppenstadium P7 (Abb. 20B) im Gegensatz zur fast völligen Abwesenheit von CaM Kinase II Immunoreaktivität in einer vergleichbaren Neuropil-Region im Puppenstadium P4 (Abb. 20A). Während der verbleibenden zehn Tage der Puppenentwicklung können nur geringe Änderungen der CaM Kinase II Immunoreaktivität im Mesothorakalganglion beobachtet werden.



ERGEBNISSE

Abb. 21 (vorige Seite) Projektionsansichten von Doppelmarkierung an Agaroseschnitten von Mesothorakalganglien älterer Stadien mit anti-CaM Kinase II α (rot) und anti-Synaptotagmin (grün). Die Synaptotagminfärbung dient auch hier zur Markierung der Neuropilregion. Es werden wie in Abb. 20 beide Kanäle gezeigt (A1 und B1) und nur der CaM Kinase II α Kanal (A2 und B2), da hier die Intensitätsunterschiede der Immunoreaktivität besser zu sehen sind. **A:** Puppenstadium P10, **B:** Puppenstadium P12, **C:** adultes Insekt. Maßstab: 50 μ m.

In Stadien älter als P7 können die immunhistochemischen Färbungen nicht mehr an Ganzpräparaten durchgeführt werden, da die Ganglien an Volumen zunehmen und die Antikörper nicht mehr tief genug eindringen. Daher wurden alle Immunfärbungen zwischen dem Stadium P7 und adulten Tieren mit Agaroseschnitten durchgeführt. Dies verringert zwar die Vergleichbarkeit mit den Färbungen für die früheren Stadien, die mit Ganzpräparaten in einem Ansatz durchgeführt wurden, erlaubt aber dennoch einen qualitativen Vergleich. Wie im Puppenstadium P7, zeigen Ganglien aus adulten Tieren starke CaM Kinase II Immunoreaktivität in den Axon-Trakten, den Zellkörpern und im Neuropil (Abb. 21C, 22C). Das gleiche ist der Fall in den Stadien P10 und P12 (Abb. 21A, B und 22A, B).

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die großen entwicklungsbedingten Änderungen in Verteilung und Expression der CaM Kinase in der ersten Hälfte der Puppenentwicklung auftreten, während spätere Stadien ein weitgehend gleichbleibendes Expressionsmuster der CaM Kinase II zeigen. Das larvale und das adulte Expressionsmuster erscheinen weitgehend ähnlich. Während der frühen Puppenentwicklung verringert sich die CaM Kinase II Expression leicht in den Somata und drastisch in den Neuropil-Regionen; in den Axonen dagegen erhöhte sie sich. Dies wird gefolgt von einer leichten Erhöhung der CaM Kinase II Expression in den Somata aber einer signifikanten Verringerung in den Axon-Trakten und einer weiteren Abnahme im Neuropil. Die Abnahme der CaM Kinase II Expression in den Neuropil-Regionen während der frühen Puppenentwicklung korreliert zeitlich mit einer signifikanten Abnahme der intrinsischen CaM Kinase II Aktivität im Ganglion (Abb. 13B). Der Abnahme der CaM Kinase II Expression zwischen dem Larvenstadium L5 und dem Puppenstadium P4 wird gefolgt von einer drastischen Zunahme in Somata, Axon-Trakten und Neuropil nach ungefähr 40 % der Puppenentwicklung, im Stadium P7. Danach bleibt die CaM Kinase II Expression bis zum Schlüpfen weitgehend unverändert. Der Anstieg der CaM Kinase II Expression bis zum Stadium P8 korreliert zeitlich mit einem Anstieg der intrinsischen CaM Kinase II Aktivität (Abb. 13B). Weiterhin korrelieren die drastischen Änderungen im Neuropil mit wichtigen Phasen des Dendritenwachstums und der Expression von Kalzium-Membranströmen in thorakalen Motoneuronen (Duch und Levine, 2000, 2002; Libersat und Duch, 2003). Daher

sollte als nächstes untersucht werden, ob die im Neuropil exprimierte CaM Kinase II postsynaptisch in den Dendriten bzw. den dendritischen Wachstumskegeln der Motoneurone lokalisiert ist oder in den Axon-Endigungen von präsynaptischen Neuronen.

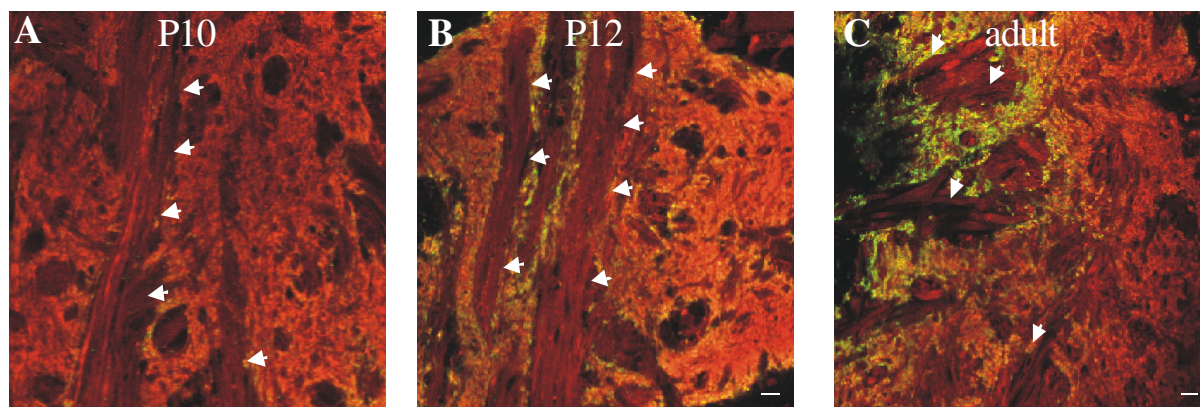


Abb. 22 Optische Einzelschnitte aus Neuropilregionen von älteren Stadien (Agaroseschnitte). In allen gezeigten Stadien findet sich starke CaM Kinase II Immunoreaktivität in den Axontrakten (weiße Pfeilspitzen). **A:** Puppenstadium P10, **B:** P12, **C:** adultes Insekt. Maßstab: 10 μm

Zwei Ansätze wurden genutzt um die Verteilung von CaM Kinase II im Neuropil detaillierter zu untersuchen: Erstens wurden viele einzelne optische Schnitte dahingehend ausgewertet, ob Synaptotagmin- und CaM Kinase II-Immunoreaktivität wirklich kolokalisiert sind oder sich nur in enger räumlicher Nähe zueinander befinden (Abschnitt 3.7.). Zweitens wurden exakte dreidimensionale Rekonstruktionen des dendritischen Feldes von MN5 erstellt und CaM Kinase II sowie Synaptotagmin Immunfärbungen auf das gefärbte Neuron projiziert, um zusätzlich zu untersuchen, wie die CaM Kinase II Immunoreaktivität innerhalb des Dendritenbaum es verteilt ist (Abschnitt 3.8., Methode nach Evers *et al.*, 2004).

3.7. Änderungen der prä- und postsynaptischen CaM Kinase II Lokalisation

CaM Kinase II wird sowohl postsynaptisch in der Postsynaptic Density als auch präsynaptisch in Assoziation mit Neurotransmitter-Vesikeln exprimiert und erfüllt an beiden Stellen unterschiedliche Aufgaben (siehe Einleitung). Da auch die intrazelluläre Lokalisation aktivitätsabhängig reguliert wird, lag die Vermutung nahe, daß sich auch diese während der Entwicklung ändert und damit die synaptische Übertragung beeinflusst. Daher wurde mit der oben schon beschriebenen Methode untersucht, ob sich die Verteilung der CaM Kinase II Immunoreaktivität zwischen Prä- und Postsynapse im Laufe der Metamorphose ändert.

ERGEBNISSE

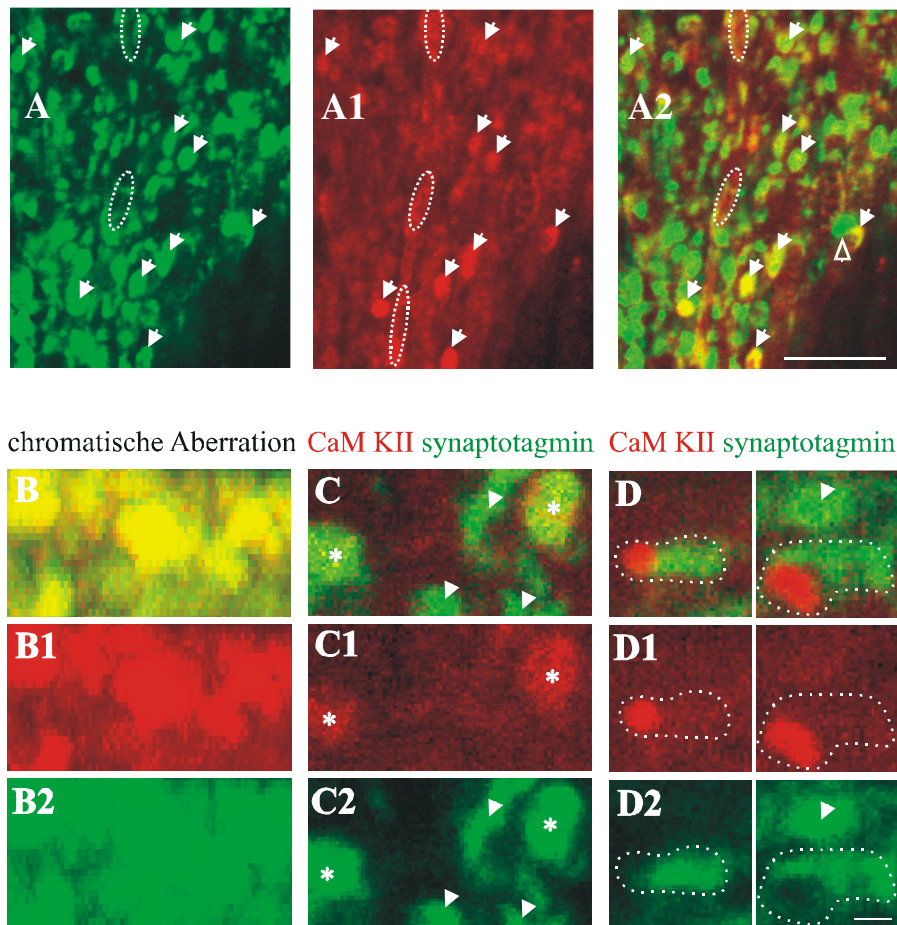


Abb. 23 Prä- und postsynaptische Lokalisation von CaM Kinase II. **A:** CaM Kinase II Immunoreaktivität tritt mit Synaptotagmin-Immunoreaktivität kolokalisiert auf. **B:** Um eine quantitative Auswertung der prä- und postsynaptischen Lokalisation von CaM Kinase II zu ermöglichen, wurde zunächst überprüft, ob chromatische Aberration in einem Ausmaß auftritt, das das Ergebnis verfälschen könnte. Hierzu wurde das Neuropil von Mesothorakalganglien mit anti Synaptotagmin markiert und der Antikörper mit Cy3 (rot, A1) und Cy5 (grün, A2) visualisiert. Legt man beide Kanäle übereinander (A) wird deutlich, daß sie sich genau überlappen. Es gibt somit keine störende chromatische Aberration. **C:** Das Neuropilgebiet von Mesothorakalganglien wurde mit anti CaM Kinase II α (rot) und anti Synaptotagmin (grün) als präsynaptischem Marker markiert. Es gibt Stellen, an denen beide Färbungen kolokalisiert sind, diese werden als Präsynapsen mit CaM Kinase II Lokalisation gewertet. **D:** An anderen Stellen treten die Färbungen eng benachbart auf. Die rot gefärbten Strukturen werden als Postsynapsen mit CaM Kinase II Lokalisation betrachtet.

Abbildung 23A zeigt, daß CaM Kinase II Immunoreaktivität mit Synaptotagmin-Immunoreaktivität kolokalisiert ist (Auflösung: 120 nm · 120 nm · 300 nm). Die meiste CaM Kinase II Immunoreaktivität besteht aus dichten und stark gefärbten Punkten (Abb. 23A, weiße Pfeile); zusätzlich wurde auch weniger dichte und damit auch weniger intensive, eher wolkenartige CaM Kinase II Immunoreaktivität detektiert (Abb. 23A, weißes Oval). Alle stark gefärbten CaM Kinase II Punkte waren auch für Synaptotagmin immunopositiv (Abb. 23A, A1, A2), woraus zu schließen ist, daß der größte Teil der in diesem Experiment detektierten CaM Kinase II in der Nähe von oder assoziiert mit präsynaptischen Vesikeln lokalisiert ist und nicht

ERGEBNISSE

postsynaptisch. Die weniger dichte sondern wolkenartige CaM Kinase II Immunoreaktivität konnte keiner spezifischen prä- oder postsynaptischen Struktur zugeordnet werden. Für diese CaM Kinase II Markierung konnte keine Kolokalisation mit Synaptotagmin beobachtet werden (Abb. 23A, A1, A2). Obgleich die gesamte in dichten Punkten lokalisierte CaM Kinase II Immunoreaktivität mit Synaptotagmin kolokalisiert ist, sind bei weitem nicht alle mit Synaptotagmin markierten präsynaptischen Vesikel für CaM Kinase II immunopositiv (Abb. 23A bis A2); nur eine kleine Fraktion von synaptischen Vesikeln ist mit CaM Kinase II kolokalisiert. Es wurden in 24 optischen Schnitten aus 6 unterschiedlichen Regionen des Neuropils die entsprechenden Punkte ausgezählt. Dies führte zu dem Ergebnis, daß ca. 25 % aller für Synaptotagmin immunopositiven Präsynapsen auch für CaM Kinase II immunopositiv sind. Da die Dendriten von MN5 keine oder nur sehr wenige nach außen gerichtete Synapsen besitzen, bedeutet starke Kolokalisierung von CaM Kinase II mit präsynaptischen Vesikeln, daß keine oder nur eine sehr geringe Menge an CaM Kinase II in den Dendriten der Motoneurone lokalisiert ist.

Um eine quantitative Auswertung zu ermöglichen, mußte zunächst überprüft werden, ob bei dem verwendeten Objektiv chromatische Aberration in einem solchen Ausmaß auftritt, daß sie das Ergebnis verfälscht und z.B. kolokalisierte Färbungen als benachbart gewertet werden könnten. Daher wurden zunächst einige Agaroseschnitte nur mit anti-Synaptotagmin markiert und die Markierung mit zwei verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen visualisiert: als sekundäre Antikörper wurden Cy3-anti-rabbit und Cy5-anti-rabbit verwendet, die beide an den primären Antikörper binden. Chromatische Aberration wäre daran zu erkennen, daß sich die Färbungen trotz der identischen Markierung nicht exakt überlappen. Von diesen Präparate wurden mit einem 40-fach Öl-Immersionsobjektiv bei einer Auflösung von $1024 \cdot 1024$ Pixel und einem Zoom-Faktor von 3,5 Aufnahmen der Neuropilgebiete erstellt (Abb. 23B, B1, B2). Es werden beide Kanäle simultan gezeigt (Abb. 23B), der Cy3-Kanal einzeln (Abb. 23B1) und der Cy5-Kanal ebenfalls einzeln (Abb. 23B2). Dieser Vorversuch ergab, daß sich die beiden Färbungen nahezu exakt überlappen und chromatische Aberration daher unter den gewählten Bedingungen keinen Einfluß auf das Versuchsergebnis haben kann.

Im eigentlichen Experiment sollte untersucht werden, ob sich die Verteilung der CaM Kinase II Immunoreaktivität zwischen Prä- und Postsynapse während der Metamorphose ändert. Zu diesem Zweck wurden Agaroseschnitte von Thorakalganglien verschiedener Entwicklungs-

ERGEBNISSE

stadien angefertigt und einer Doppelmarkierung mit anti-CaM Kinase II α (rot) und anti-Synaptotagmin (grün) unterzogen (Abb. 23C und D). Als Präsynapsen mit CaM Kinase II Lokalisation wurden solche Stellen gezählt, bei denen sich die beiden Signale direkt überlagerten (Abb. 23C). Im CaM Kinase II Kanal (Abb. 23C1) sind nur die beiden auch in Abb. 23C markierten (*) Stellen mit Kolo-kalisation der beiden Signale zu erkennen, während im Synaptotagmin Kanal (Abb. 23C2) weitere Färbungen außerhalb des kolokalisierten Bereiches zu erkennen sind (markiert durch weiße Pfeilspitzen). Aus diesen und auch weiteren Stellen kann geschlossen werden, daß nicht in allen Präsynapsen CaM Kinase II exprimiert wird. An anderen Stellen sind die beiden Signale unmittelbar benachbart (Abb. 23D), diese Stellen werden als Postsynapsen mit CaM Kinase II Lokalisation gezählt. Auch hier sind im CaM Kinase II Kanal (Abb. 23D1) nur die beiden als postsynaptisch gezählten Bereiche zu sehen, während im Synaptotagmin-Kanal (Abb. 23D2) zusätzliche Bereiche mit Immunoreaktivität auftauchen. Es fällt auf, daß die postsynaptischen CaM Kinase II Färbungen wesentlich dichter und von geringerer räumlicher Ausdehnung sind als die präsynaptischen, bei denen ein deutlich weniger intensives Signal über einen größeren Bereich verteilt ist.

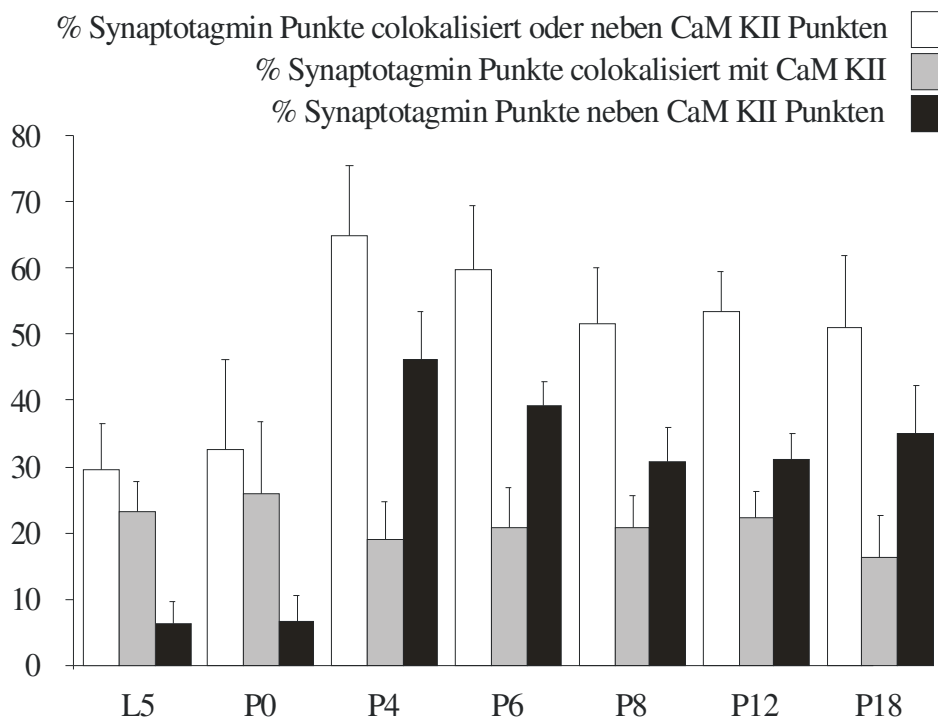


Abb. 24 Quantitative Darstellung der Änderungen der prä- und postsynaptischen Lokalisation von CaM Kinase II während der Metamorphose. In den Stadien L5 und P0 ist CaM Kinase II vorwiegend präsynaptisch lokalisiert. Im Stadium P4 kehrt sich das Verhältnis um, die CaM Kinase II Lokalisation bleibt dann im weiteren Verlauf bis zum adulten Insekt vorwiegend postsynaptisch.

ERGEBNISSE

Um Aufschluß über eventuelle Änderungen der prä- und postsynaptischen CaM Kinase II Lokalisation während der Entwicklung zu erhalten, wurden in den verschiedenen Stadien in vergleichbaren Neuropil-Regionen die Stellen mit synaptischer CaM Kinase II Lokalisation ausgezählt und als Balkendiagramm dargestellt (Abb. 24). Die weißen Balken zeigen den prozentualen Anteil von Synapsen mit CaM Kinase II Lokalisation (prä- wie postsynaptisch) an der Gesamtzahl von Synapsen in den ausgewerteten Bereichen; der Anteil von Präsynapsen mit CaM Kinase II an der Gesamtzahl der Synapsen mit CaM Kinase II ist als graue Balken dargestellt, der Anteil der Postsynapsen mit CaM Kinase II als schwarze Balken. Im Larvenstadium L5 und am Tag der Verpuppung (P0) ist die Verteilung nahezu gleich: der Anteil der Synapsen mit CaM Kinase II beträgt ca. 30 % und davon sind deutlich mehr Prä- als Postsynapsen (Verhältnis ca. 6:1). Im Stadium P4 jedoch ist der Anteil der CaM Kinase II Synapsen doppelt so hoch wie in P0 (ca. 65 %) und es ist in weniger Prä- als Postsynapsen CaM Kinase II lokalisiert (ca. 1:2). Im weiteren Verlauf der Entwicklung sinkt der Anteil der CaM Kinase II Synapsen geringfügig ab und die Verteilung zwischen Prä- und Postsynapse ist leichten Schwankungen unterworfen. An der vorherrschenden postsynaptischen Lokalisation ändert sich bis zum adulten Insekt jedoch nichts mehr.

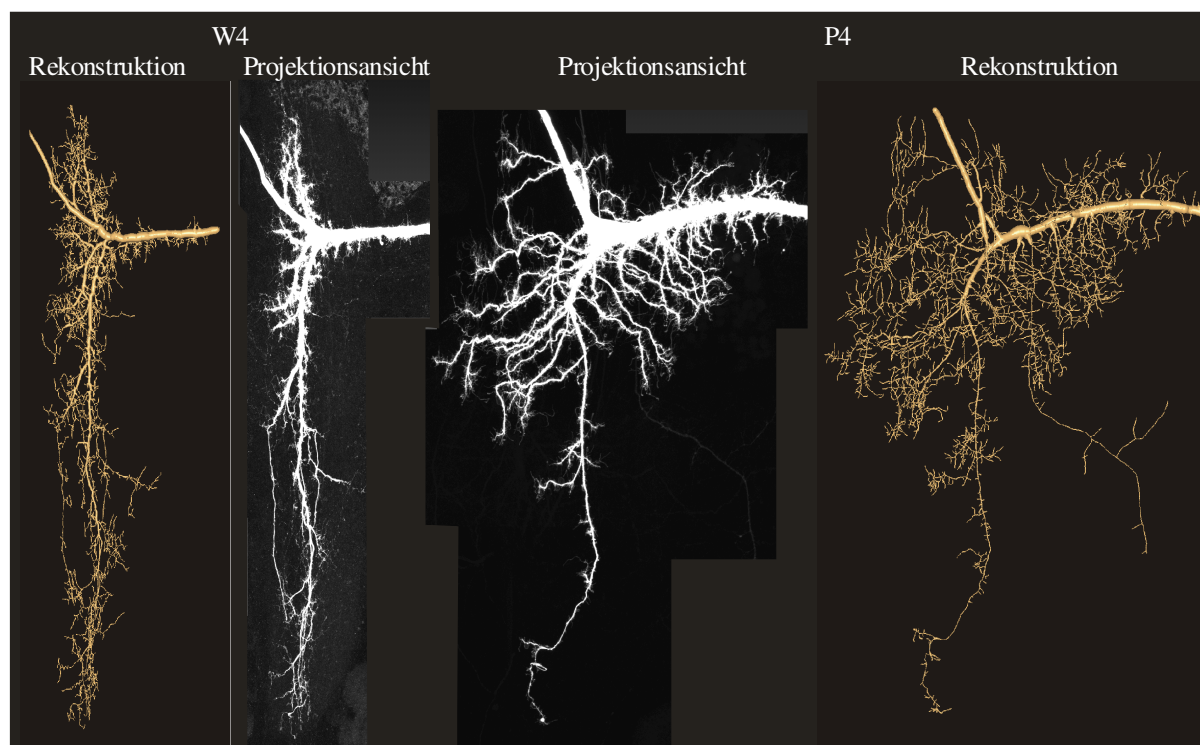


Abb. 25 Rekonstruktion des Dendritenbaumes von MN5 in den Stadien W4 und P4. Es werden Projektionsansichten von allen mit dem konfokalen Mikroskop aufgenommenen optischen Schnitten in eine Bildebene und die zugehörigen 3-dimensionalen Rekonstruktion der gefärbten Neurone gezeigt.

3.8. Intrazelluläre Verteilung der CaM Kinase II in den Stadien W4 und P4

Um die intrazelluläre Verteilung der CaM Kinase II genauer zu untersuchen, wurden dreifach-Färbungen des Motoneurons MN5, des vesikel-assoziierten Proteins Synaptotagmin und der CaM Kinase II angefertigt. Der Dendritenbaum von MN5 wurde dreidimensional rekonstruiert und die Immunfärbungen auf die Rekonstruktion projiziert (Methode nach Evers *et al.*, 2004), um die Verteilung dieser neuronalen Proteine innerhalb des Dendritenbaumes zu untersuchen. Für diese Experimente wurde das Wandererstadium W4 genutzt, das die Situation zu Beginn der Metamorphose repräsentieren soll und in dem sich die Dendriten von MN5 aus dem larvalen Netzwerk zurückziehen sowie das Puppenstadium P4, in dem die Dendriten von MN5 bereits in das adulte Flugmotornetzwerk einwachsen (Duch und Levine, 2000; Libersat und Duch, 2002) und wo eine Umkehrung von vorwiegend prä- zu postsynaptischer Lokalisation stattgefunden hat. Abbildung 25 zeigt Projektionsansichten von allen mit dem konfokalen Mikroskop aufgenommenen Schnitten des intrazellulär gefärbten Dendritenbaumes von MN5 in den Stadien W4 und P4 mit den zugehörigen 3-dimensionalen Rekonstruktionen der gefärbten Neurone.

An einem Ausschnitt aus dem Dendritenbaum in W4 soll das weitere Vorgehen kurz demonstriert werden (Abb. 26). Ein rechteckiger Ausschnitt aus dem rekonstruierten Dendritenbaum ist weiß umrandet (Abb. 26A) und wird vor einem optischen Schnitt einer parallelen Synaptotagminfärbung (Abb. 26B) bzw. vor einer CaM Kinase II Färbung (Abb. 26B1) gezeigt. Mit Hilfe neu in der Arbeitsgruppe entwickelter Methoden (Evers *et al.*, 2004; Schmitt *et al.*, 2004) wurden die Intensitäten der Synaptotagmin- und CaM Kinase II Färbung in unmittelbarer Nähe der dendritischen Oberfläche von MN5 als Farbcode auf die Oberfläche der Dendritenkonstruktion übertragen. An optischen Einzelschnitten durch die Rekonstruktion von MN5 mit den zugehörigen Immunofärbungen wird demonstriert, wie die Synaptotagminfärbung (Abb. 26C), die CaM Kinase II Färbung (Abb. 26C1) und beide Färbungen (Abb. 26C2) auf die Oberfläche des rekonstruierten Neurons übertragen werden. An den Stellen, an denen die Immunfärbungen innerhalb einer Entfernung von weniger als 300 nm von der Oberfläche der rekonstruierten Dendriten hohe Intensitäten aufweisen, erscheint die Oberfläche der Rekonstruktion in hellen Farben (siehe weiße Pfeilspitzen). Hohe Färbeintensitäten von Synaptotagmin codieren dabei für eine hohe Wahrscheinlichkeit von synaptischen Eingängen in den Dendritenbaum (Evers *et al.*, 2004; Duch und Mentel, 2004). Die hell-codierten Orte auf der Dendriten-Rekonstruktion weisen in beiden repräsentativen optischen Schnitten in Abbildung

ERGEBNISSE

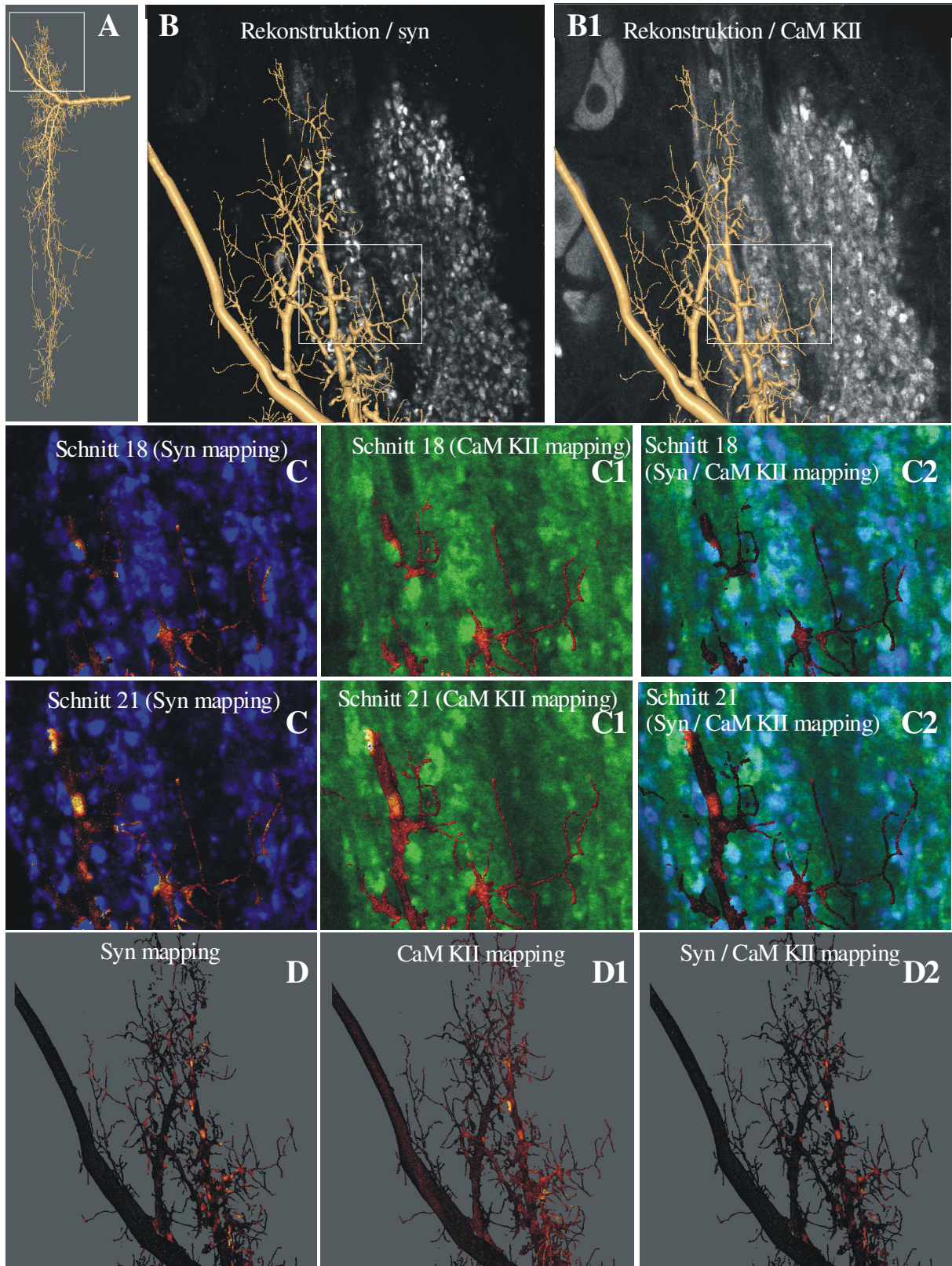


Abb. 26 Kolokalisation von CaM Kinase II und putativen synaptischen Eingängen in den Dendritenbaum des Motorneurons 5 (MN5). **A:** Rekonstruktion des Dendritenbaumes von MN5 im Entwicklungsstadium W4, das weiß umrandete Quadrat zeigt den Ausschnitt, der in B und B1 vergrößert dargestellt wird. **B:** Rekonstruktion eines Ausschnittes von MN5 vor einem optischen Schnitt einer parallelen Anti-Synaptotagmin Immunofärbung, bzw. vor einer Anti-CaM Kinase II Immunofärbung

ERGEBNISSE

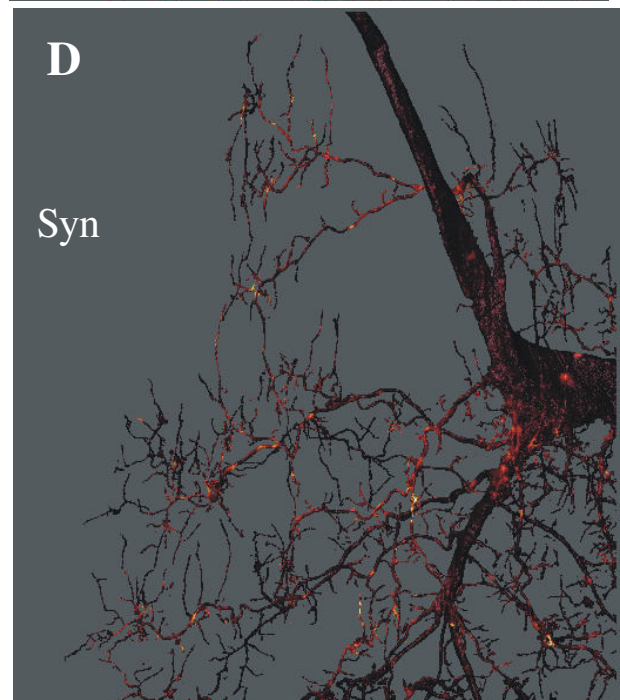
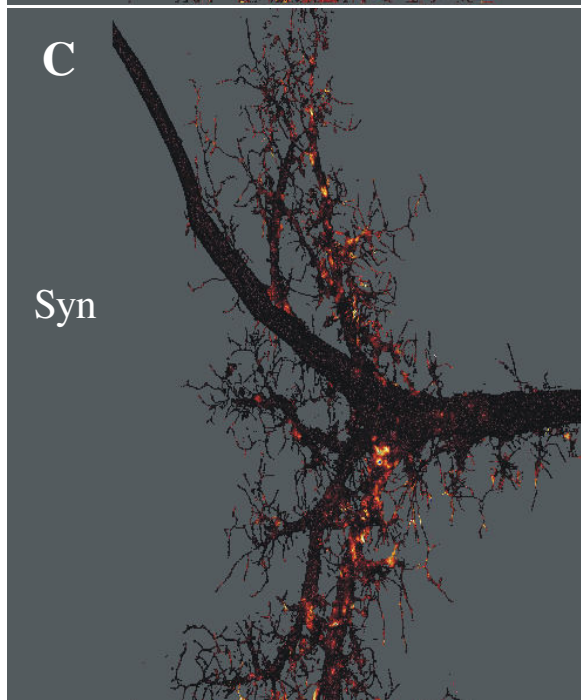
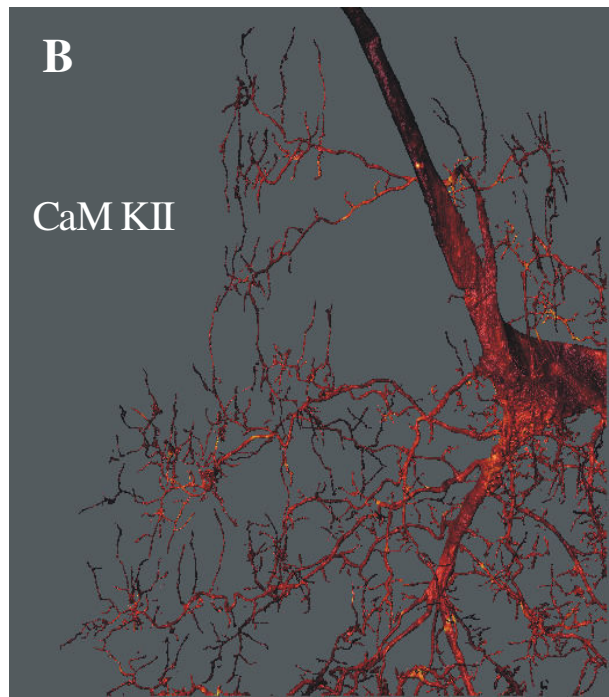
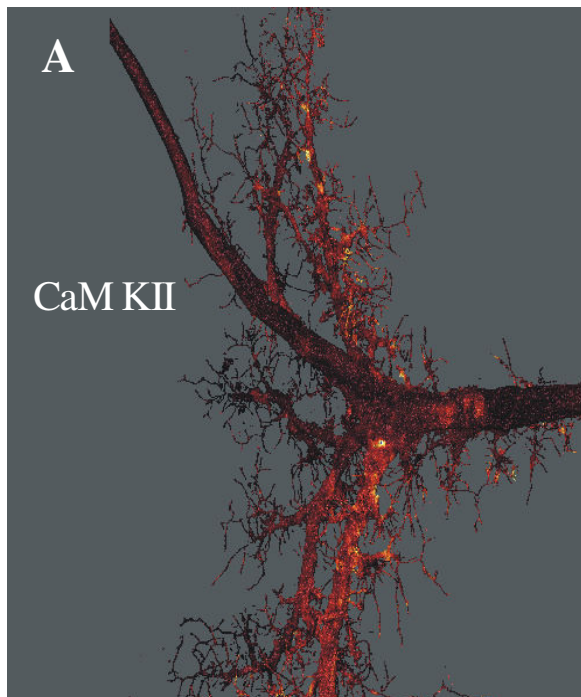
(B1) im selben Präparat, das weiß umrandete Rechteck ist in C vergrößert dargestellt. **C:** Einzelne optische Schnitte durch die Rekonstruktion von MN5 mit den dazugehörigen Immunofärbungen. Es werden zwei optische Schnitte (Schnitt 18 und 21) mit Synaptotagmin-Markierung (C), CaM Kinase II Markierung (C1) und mit beiden Markierungen (C2) gezeigt (Synaptotagmin: blau, CaM Kinase II: grün). Mit Hilfe neu in der Arbeitsgruppe entwickelter Methoden wurden die Intensitäten der Synaptotagmin- und der CaM Kinase II Färbung in unmittelbarer Nähe der dendritischen Oberfläche von MN5 als Farb-Code auf die Oberfläche der Dendritenrekonstruktion übertragen (Evers *et al.*, 2004; Schmitt *et al.*, 2004). An den Stellen, an denen die Immunfärbungen innerhalb einer Entfernung von weniger als 300nm von der Oberfläche der rekonstruierten Dendriten hohe Intensitäten aufweisen, erscheint die Oberfläche der Rekonstruktion in hellen Farben (siehe weiße Pfeilspitzen). Hohe Färbeintensitäten von Anti-Synaptotagmin kodieren dabei für eine hohe Wahrscheinlichkeit von synaptischen Eingängen in den Dendritenbaum (Evers *et al.*, 2004; Duch und Mentel, 2004). Die hell-kodierten Orte auf der Dendriten-Rekonstruktion weisen in beiden repräsentativen optischen Schnitten in C auch tatsächlich eine starke Kollokalisierung mit Synaptotagmin Färbung (blau) auf. Dementsprechend zeigen die hell-kodierten Orte auf der Dendriten-Rekonstruktion in beiden repräsentativen optischen Schnitten in C1 eine hohe Kollokalisierung mit CaM Kinase II Färbung. In C2 ist die Korrelation aus den Kodierungen für Synaptotagmin und für CaM Kinase II dargestellt. hell-kodierte Orte auf der Rekonstruktion stehen dann für eine hohe Färbeintensität beider Immunmarkierungen in weniger als 300 nm zur Oberfläche der Dendriten (Evers *et al.*, 2004). **D:** Projektion der Antikörperfärbungen auf den Dendritenbaum. Es wird ein Ausschnitt aus dem Dendritenbaum mit Synaptotagmin Kodierung (D), CaM Kinase II Kodierung (D1) und mit der Korrelation aus beiden Kodierungen (D2) dargestellt. Die Daten zeigen, daß eine hohe Korrelation zwischen beiden Kodierungen besteht, d.h. daß CaM Kinase II vornehmlich an Orten mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für einen synaptischen Eingang lokalisiert ist.

26C auch tatsächlich eine starke Kollokalisierung mit Synaptotagmin (blau) auf. Dementsprechend zeigen die hell codierten Orte auf der Rekonstruktion in beiden optischen Schnitten in 26C1 eine hohe Kollokalisierung mit CaM Kinase II Immunoreaktivität. In 26C2 wird die Korrelation aus den Farbcodierungen für Synaptotagmin und CaM Kinase II dargestellt. Um die Korrelation zu berechnen, wird das Produkt aus beiden Färbeintensitäten durch die Summe dieser Intensitäten dividiert. Hell codierte Orte auf der Rekonstruktion stehen dann für eine hohe Färbeintensität beider Immunmarkierungen in weniger als 300 nm Abstand zur Oberfläche der Dendriten (Evers *et al.*, 2004). Um die CaM Kinase II und Synaptotagmin Verteilung visuell für einen Teil des Dendritenbaumes darzustellen, wurden die Antikörperfärbungen auf die Rekonstruktion der Oberfläche des dendritischen Feldes projiziert (Methode nach Evers *et al.*, 2004). Auf den in Abbildung 26A gezeigten Ausschnitt aus dem Dendritenbaum wurde die Synaptotagminfärbung (Abb. 26D), die CaM Kinase II Färbung (Abb. 26D1) und die Korrelation beider Färbungen (Abb. 26D2) projiziert. Es wird erkennbar, daß eine hohe Korrelation zwischen beiden Codierungen besteht; daraus folgt, daß CaM Kinase II in diesem Beispiel vornehmlich an Orten mit einer hohen Wahrscheinlichkeit für synaptischen Eingang lokalisiert ist. Mit dieser Methode kann man nun die intrazelluläre Verteilung der CaM Kinase II und die Kollokalisierung mit Synaptotagmin in den beiden Stadien miteinander vergleichen (Abb. 27).

Die Codierungen der Antikörperfärbungen für CaM Kinase II und Synaptotagmin wurden auf repräsentative Ausschnitte des Dendritenbaumes von MN5 projiziert (Abb. 27). Dies geschah für die Stadien W4 (Abb. 27A, C, E) und P4 (Abb. 27B, D, F). Beide Dendritenbäume codie-

ERGEBNISSE

ren für eine hohe CaM Kinase II Lokalisation (Abb. 27A, B), wobei die Färbung in W4 granulärer ist als in P4, wo sie wesentlich gleichmäßiger verteilt ist. Die Synaptotagmin Färbung (Abb. 27C, D) ist in W4 in vorwiegend in zusammenhängenden Feldern konzentriert, während sie in P4 wesentlich gleichmäßiger besonders in den feineren Verzweigungen verteilt ist. Die Korrelation aus beiden Färbungen (Abb. 27E, F) fördert deutliche Unterschiede in der Kolo-kalisation von CaM Kinase II und Synaptotagmin zutage.



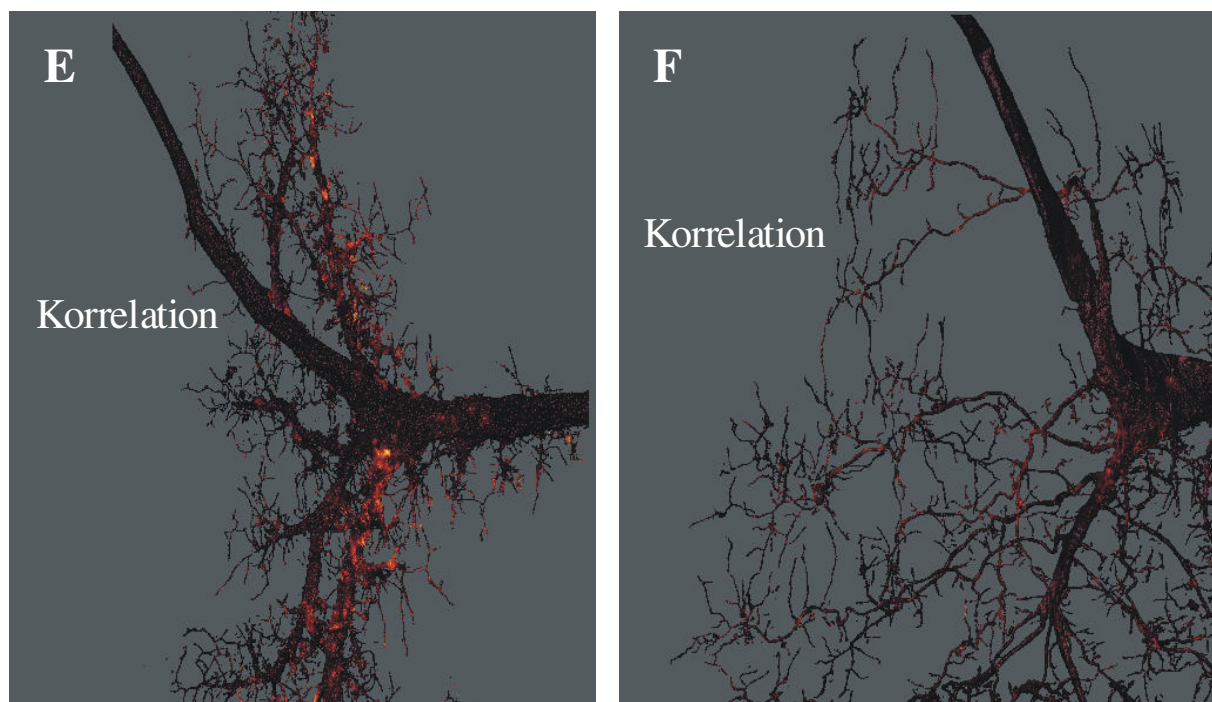


Abb. 27 Kodierungen der Antikörperfärbungen für Synaptotagmin und für CaM K II auf repräsentativen Ausschnitten des Dendritenbaums von MN5 in den Stadien W4 (A, C, E) und P4 (B, D, F) **A:** W4 Dendritenbaum kodiert für hohe Intensitäten von CaM Kinase II Färbung. **B:** P4 Dendritenbaum kodiert für hohe Intensitäten von CaM Kinase II Färbung. **C:** W4 Dendritenbaum kodiert für hohe Intensitäten von Synaptotagmin Färbung. **D:** P4 Dendritenbaum kodiert für hohe Intensitäten von Synaptotagmin Färbung. **E:** W4 Dendritenbaum kodiert für die Korrelation aus den Intensitäten beider Färbungen (siehe Abb. 26 und Evers *et al.*, 2004). **F:** P4 Dendritenbaum kodiert für die Korrelation aus den Intensitäten beider Färbungen. In W4 überlappen sich die Färbungen weitgehend, was auf eine synaptische Lokalisation der CaM K II schließen läßt, in P4 dagegen überlappen sie sich nur wenig, was darauf hindeutet, daß CaM Kinase II hier nicht vornehmlich an Synapsen lokalisiert ist.

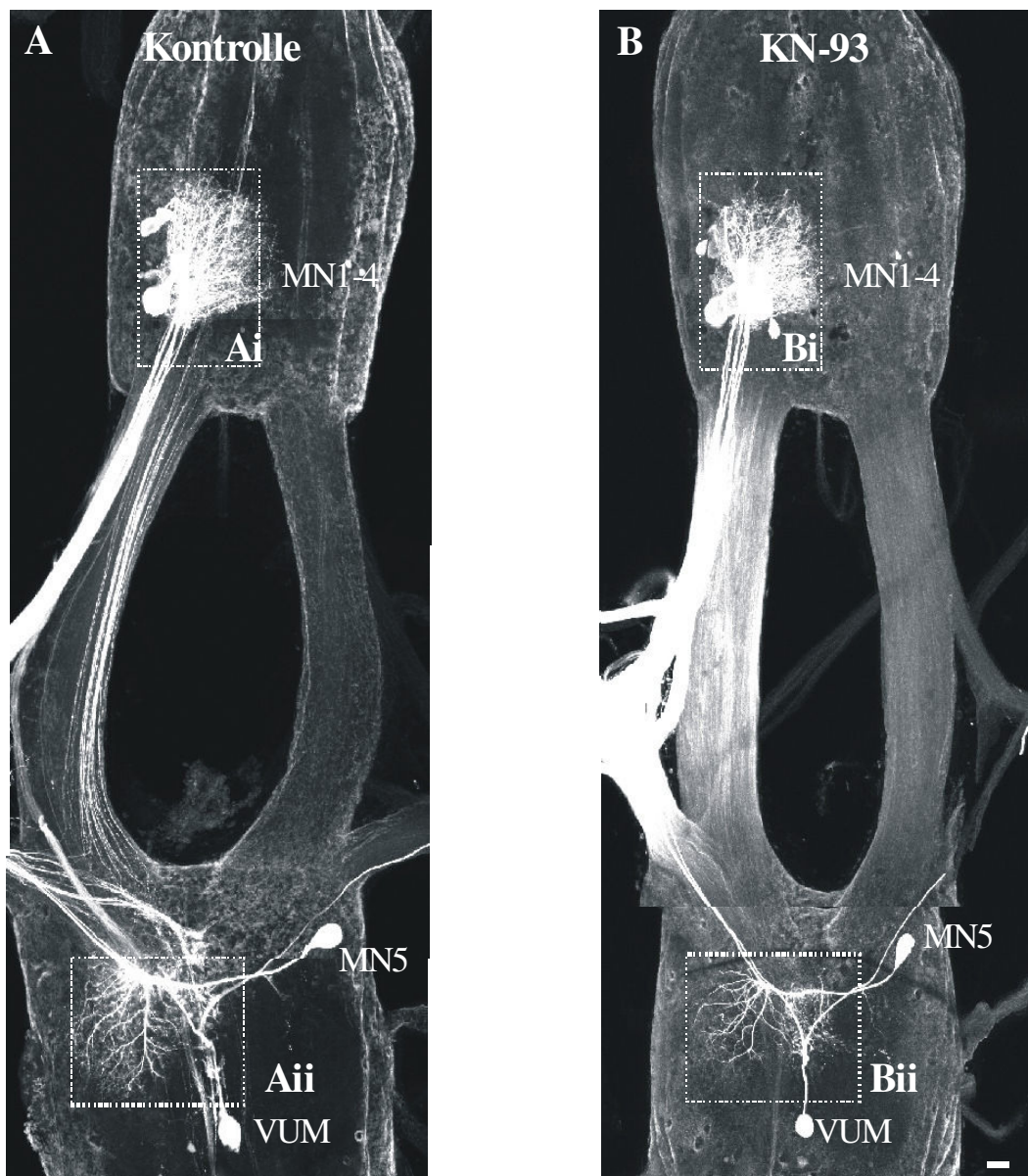
Während sich in W4 Helligkeitsverteilung und -intensität bei Synaptotagmin (Abb. 27C) und der Korrelation (Abb. 27E) weitgehend gleichen, ist der Dendritenbaum in P4 mit der Korrelation (Abb. 27F) wesentlich dunkler als mit der Synaptotagmin Codierung (Abb. 27D). Daraus folgt, daß sich in W4 die Färbungen weitgehend überlappen, was auf eine synaptische Lokalisation der CaM Kinase II schließen läßt, während sich in P4 die Färbungen nur wenig überlappen, was darauf hindeutet, daß hier CaM Kinase II vorwiegend nicht in den Synapsen lokalisiert ist.

3.9. Morphologischer Effekt von pharmakologischer Inhibition der CaM Kinase II

Es ist bereits in Abschnitt 3.3. gezeigt worden, daß sich der Anstieg der intrinsischen CaM Kinase II Aktivität bis zum Stadium P8 durch *in vivo*-Injektionen des Kalzium-Kanal-Blockers Verapamil verringern läßt. Die Blockade von Kalzium-Kanälen mit diesem Pharmakon wirkt sich ersten vorläufigen Ergebnissen aus intrazellulären Färbungen zufolge auch auf die

ERGEBNISSE

entwicklungsbedingten Änderungen der Dendritenstruktur von MN5 aus: Injiziert man in den Stadien P4 und P5, in denen normalerweise die intrazelluläre Kalziumkonzentration ansteigt (Duch und Levine, 2002) Verapamil, sind im Dendritenbaum der manipulierten Tiere wesentlich mehr filopodienartige Strukturen zu erkennen als bei den Kontrolltieren (Evers und Duch, 2004). Dies deutet auf eine Verzögerung des Überganges zur zweiten dendritischen Wachstumsphase infolge der Blockade von Kalziumkanälen hin. Hier sollte nun untersucht werden, ob pharmakologische Inhibition der CaM Kinase II zu vergleichbaren morphologischen Effekten führt.



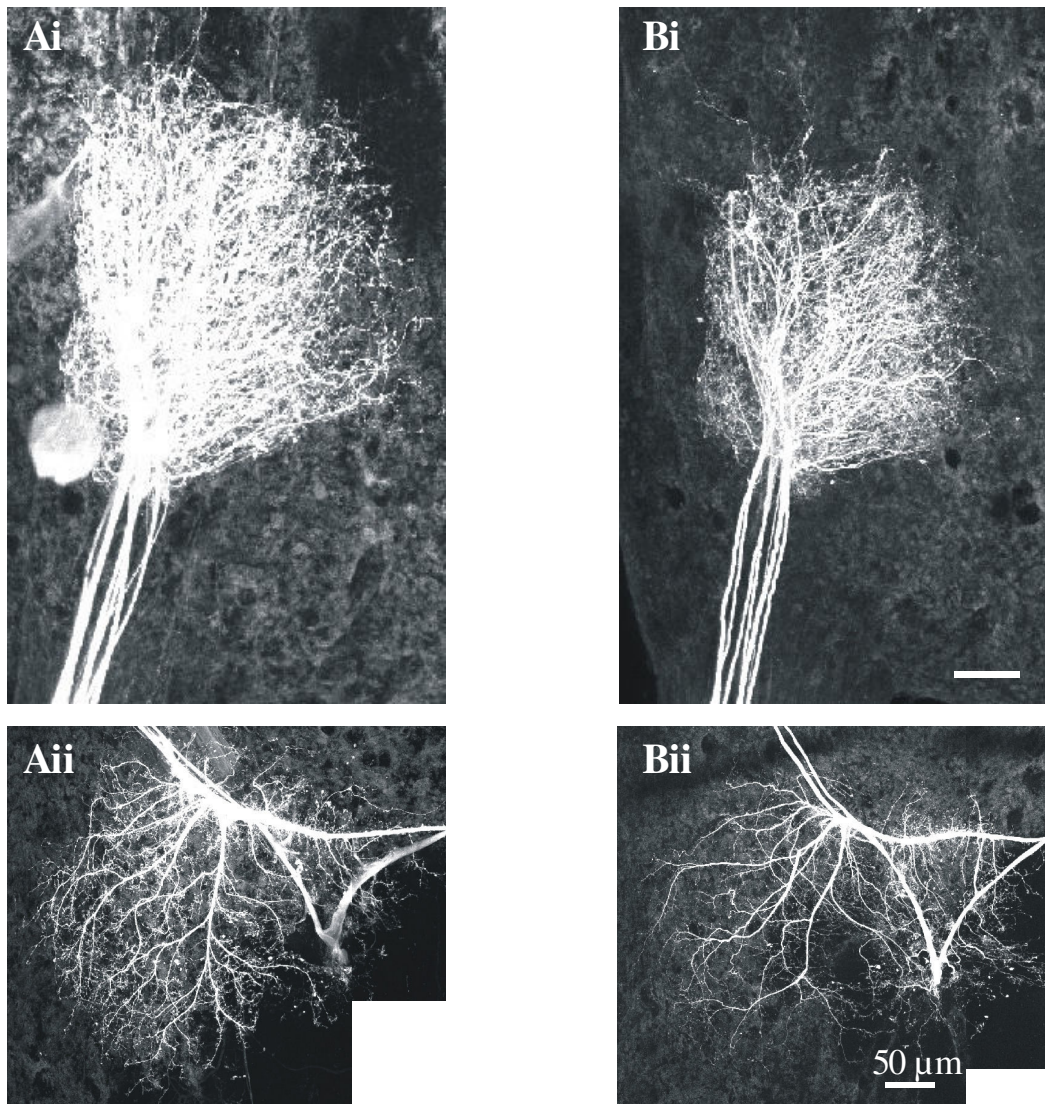


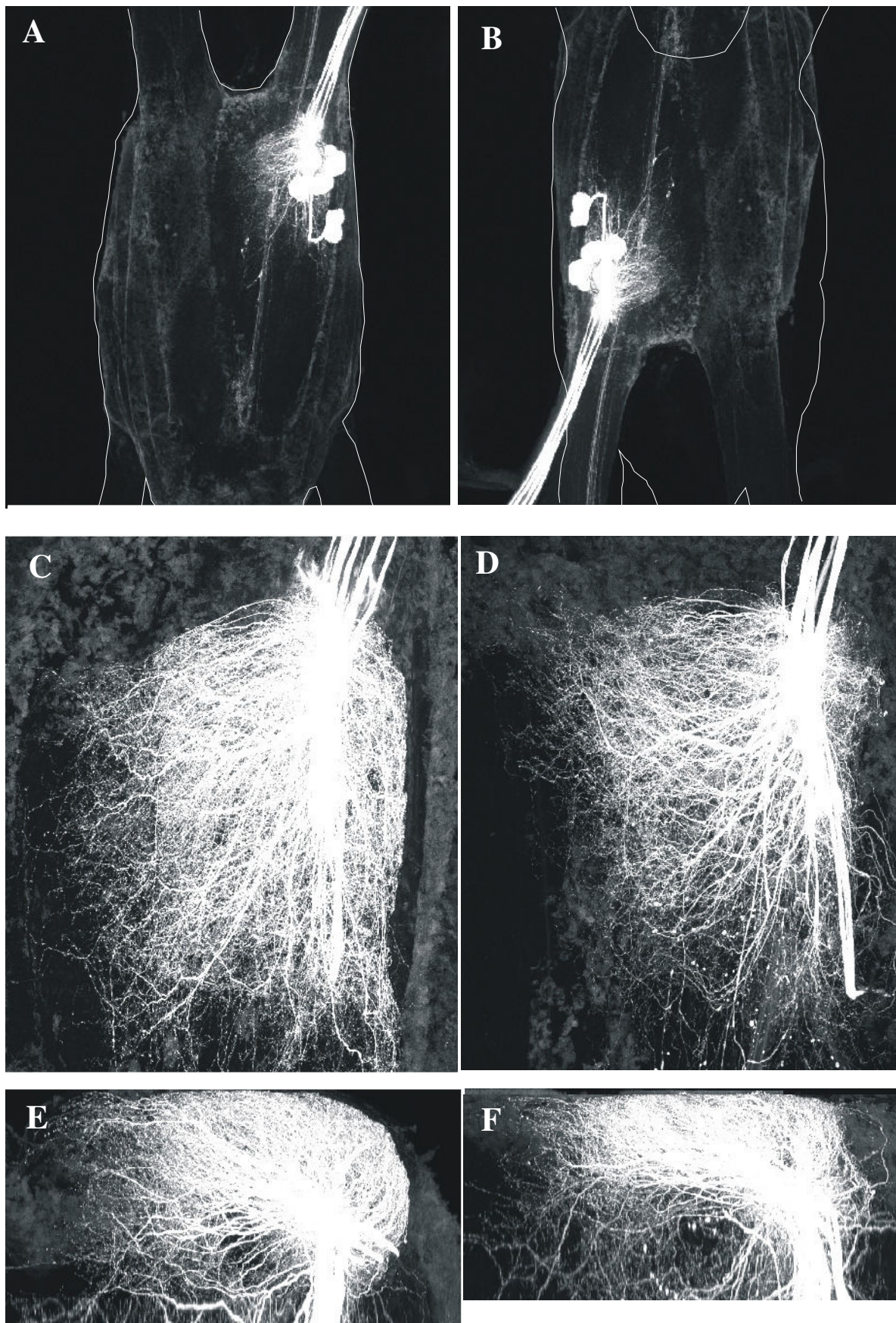
Abb. 28 Effekt von pharmakologischer CaM Kinase II Inhibition. Puppen wurden in den Stadien **P4**, **P5** und **P6** mit KN-93 injiziert und die Motoneurone im Stadium P16 über Nerv 1 retrograd gefärbt. **A:** Kontrollinjektionen mit H₂O. **B:** KN-93 Injektionen. In den Kontrolltieren sind die Dendritenbäume der Motoneuronen deutlich größer und dichter als in den KN-93 injizierten Tieren. Dieser auf den ersten Blick widersprüchliche Effekt könnte auf eine Überkompensation nach einer Verzögerung des Beginns der zweiten Wachstumsphase durch die Inhibition von CaM Kinase II oder aber auf unspezifische Toxizität des Inhibitors zurückzuführen sein.

Hierzu wurde der kommerziell erhältliche CaM Kinase II Inhibitor KN-93 verwendet, dessen Wirksamkeit in *Manduca sexta* im Rahmen dieser Arbeit bereits demonstriert wurde (Abschnitt 3.2.). Für die KN-93 Injektionen wurden zunächst die Entwicklungsstadien P4, P5 und P6 gewählt, in denen die intrazelluläre Kalzium-Konzentration normalerweise infolge einer Erhöhung der Amplitude der Kalzium-Membranströme ansteigt, was zwischen den Stadien P4 und P8 geschieht (Duch und Levine, 2002). Um die normale Entwicklung möglichst wenig zu stören, wurde nur an drei Tagen, in den Stadien P4, P5 und P6, die CaM Kinase II Aktivi-

ERGEBNISSE

tät durch Injektion von KN-93 gedrosselt. Der CaM Kinase II Blocker war mit einer Konzentration von 500 μM in aqua dest. gelöst. Das Injektionsvolumen betrug 100 μl , was zu einer Konzentration von KN-93 in der Hämolymphe von ca. 10 μM führte. Ebenso wurden Kontrolltiere unter gleichen Bedingungen mit Wasser injiziert. Die Injektionen wurden 1 mal am Tag durch die Flügeldecke mit einer 1 ml-Spritze und einer 0,4 mm · 20 mm Nadel durchgeführt. Die Öffnung wurde danach mit Wachs verschlossen um Auslaufen der Hämolymphe zu vermeiden. Zur Negativkontrolle wurden Tiere mit dem gleichen Volumen aqua dest injiziert. Um eine gleichmäßige Entwicklung zu gewährleisten, wurden die Tiere vom Stadium P0 bis zur intrazellulären Färbung in dem selben Inkubator bei einer konstanten Temperatur von 25 °C gehalten. Anders als die Tiere in den oben zitierten Verapamil-Experimenten wurden zunächst erst im Stadium P16 retrograde Färbungen der Motoneurone über Nerv 1 angefertigt. Auf diese Weise sollte zunächst getestet werden, ob überhaupt ein Effekt zu beobachten ist, der dann genauer untersucht werden kann. Abbildung 28 zeigt Pro- und Mesothorakalganglion eines Kontrolltieres (Abb. 28A) und eines mit KN-93 injizierten Tieres (Abb. 28B). Die Dendritenbäume der Motoneurone in den Kontrolltieren sind erheblich dichter und von größerer räumlicher Ausdehnung als in den KN-93 injizierten Tieren. Besonders deutlich wird dies im Mesothorakalganglion (Abb. 28Aii, Bii), da sich hier nicht, wie im Prothorakalganglion (Abb. 28Ai, Bi), vier Dendritenbäume überlagern, sondern der Dendritenbaum von MN5 separat betrachtet werden kann. Die Dendritenbäume in den manipulierten Tieren sind deutlich kleiner und weniger dicht als in den Kontrolltieren. Dieses Resultat zeigt einerseits, daß durch den CaM Kinase II Inhibitor ein beobachtbarer morphologischer Effekt erzielt werden kann; andererseits widerspricht dieser Effekt den Erwartungen. Nach Beobachtungen aus anderen Systemen zu urteilen (Zou und Cline, 1999), sollte CaM Kinase II das Dendritenwachstum limitieren und eine Inhibition der CaM Kinase II damit zu verstärktem Dendritenwachstum und mithin zu größeren und dichteren Dendritenbäumen führen. Für dieses Ergebnis kamen mehrere Erklärungsmöglichkeiten in Frage: Da CaM Kinase II in einer sehr hohen Konzentration im Nervensystem vorkommt und vielfältige Aufgaben wahrnimmt (siehe Einleitung), kann sich eine Inhibition dieses Enzyms auf zahlreiche Signalwege auswirken, was dann zu einer unspezifischen Toxizität führt, die sich in einer Störung der Neuralentwicklung äußern kann oder auch in einer Verlangsamung der Entwicklung. Es könnte sich jedoch auch um eine Überkompensation einer anfänglichen Verstärkung des Dendritenwachstums handeln.

ERGEBNISSE



ERGEBNISSE

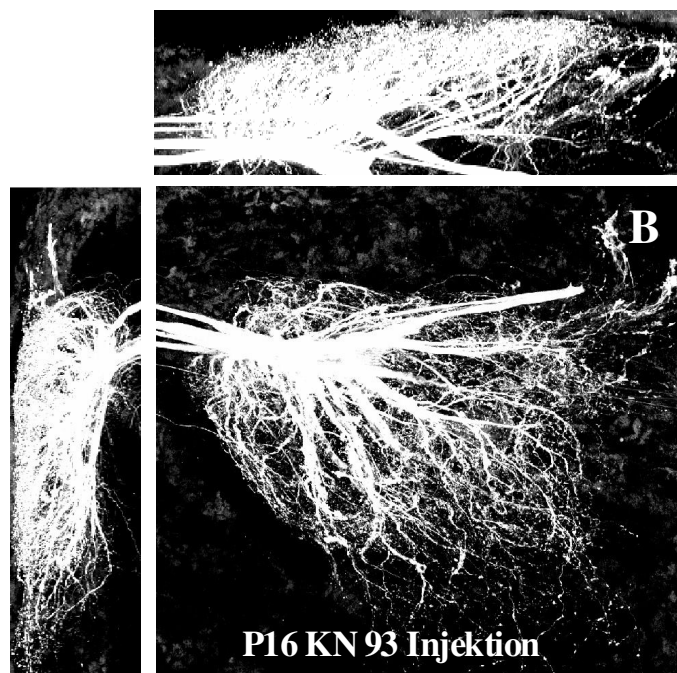
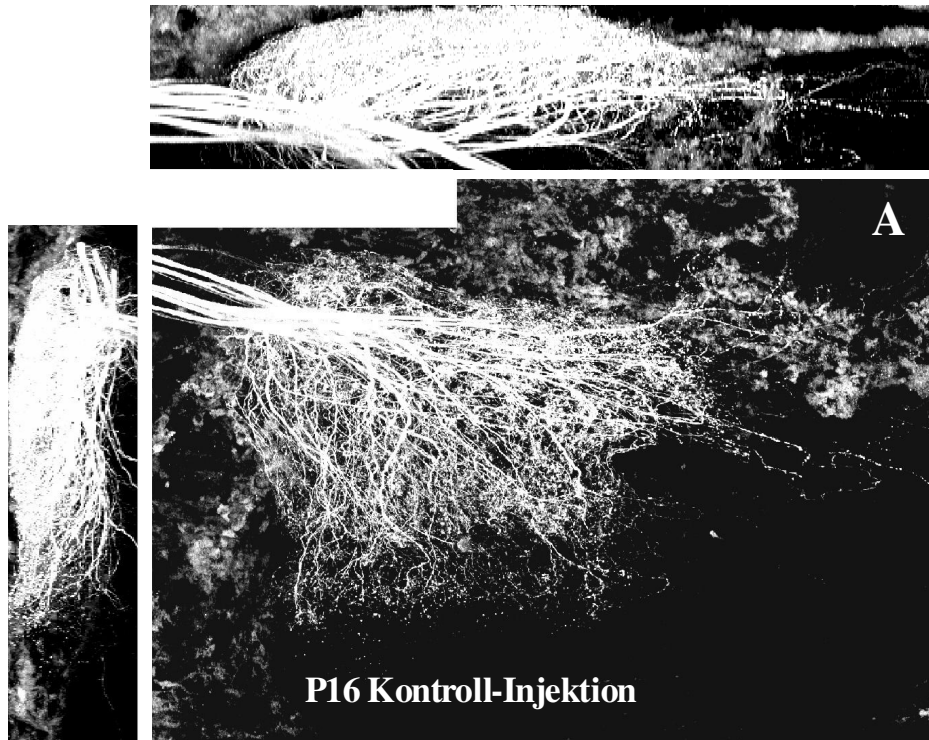
Abb. 29 (vorige Seite) Effekt von pharmakologischer CaM Kinase II Inhibition. Puppen wurden in den Stadien **P4**, **P5** und **P6** mit KN-93 injiziert und die Motoneurone im unmittelbar vor dem Schlüpfen („pharate adult“) über Nerv 1 retrograd gefärbt. Hier werden Dendritenbäume von Motoneuronen aus verschiedenen Perspektiven gezeigt. **A, C, E:** Kontrollinjektionen mit H₂O. **B, D, F:** KN-93 Injektionen. Auch hier ist aus allen gezeigten Perspektiven zu beobachten, daß die Dendritenbäume der KN-93 injizierten Tiere kleiner und weniger dicht sind als in den Kontrolltieren.

Um diese Erklärungsmöglichkeiten zu testen, wurden zunächst die DLM-Motoneurone in gleicher Weise manipulierter Tiere erst unmittelbar vor dem Schlüpfen („pharate adult“) über Nerv 1 retrograd gefärbt (Abb. 29). Zu diesem Zeitpunkt ist die Entwicklung abgeschlossen; bei einer von der sonstigen Entwicklung unabhängigen Störung der Neuralentwicklung müßte auch hier eine Verkleinerung des Dendritenbaumes infolge der KN-93 Injektion zu beobachten sein. Dies ist auch tatsächlich der Fall, wie man an der Abbildung eines ganzen Ganglions (Abb. 29A, B) und Vergrößerungen aus verschiedenen Perspektiven (Abb. 29C, D und E, F) erkennen kann. Andererseits sind die Ganglien annähernd gleichgroß (Abb. 29A, B), was darauf hindeutet, daß von der Störung der Neuralentwicklung nicht alle Nervenzellen gleichmäßig betroffen sind und es sich daher doch um einen für die Dendritenbäume der Motoneurone spezifischen Effekt handeln könnte. Bei den bisherigen Experimenten ist die CaM Kinase II zu Beginn der Entwicklungsphase inhibiert worden, in der ihre Aktivität normalerweise ansteigt. Um zu untersuchen, ob bei einer Inhibition am Ende dieser Entwicklungsphase vergleichbare Effekte auftreten, wurde unter ansonsten gleichen Bedingungen in den Stadien P6, P7 und P8 KN-93 injiziert und die Motoneurone im Stadium P16 retrograd gefärbt (Abb. 30). Auch bei diesem Ansatz sind die Dendritenbäume der manipulierten Tiere (Abb. 30A) erheblich kleiner als die der Kontrolltiere (Abb. 30B, C). Abschließend wurde noch getestet, ob in der Entwicklungsphase, in der die CaM Kinase II Aktivität normalerweise ansteigt, bei vorheriger Applikation des Inhibitors ein morphologischer Effekt festzustellen ist. Bei pharmakologischer Inhibition von Kalziumkanälen in einem vergleichbaren Versuchsansatz waren die Filopodien signifikant länger und es gab signifikant mehr Verzweigungen als in den Kontrolltieren (Evers und Duch, 2004).

Es wurden Dendritenbäume in den Stadien P3 und P4 sowie im späten Stadium P5 intrazellulär gefärbt (Abb. 31). In P3 und P4 ist kein signifikanter Unterschied zu nicht manipulierten Tieren zu beobachten (zum Vergleich siehe Evers und Duch, 2004). Im späten Stadium P5 ist nur zu konstatieren, daß der mit weißen Pfeilspitzen und der gestrichelten Linie markierte Abzweig in dieser Phase der Entwicklung normalerweise nicht mehr vorhanden ist; er verschwindet sonst im frühen Stadium P5 (Evers und Duch, 2004). Dies deutet auf eine gewisse

ERGEBNISSE

Verzögerung der Entwicklung durch das Pharmakon hin. Ansonsten können keine signifikanten Veränderungen festgestellt werden.



ERGEBNISSE

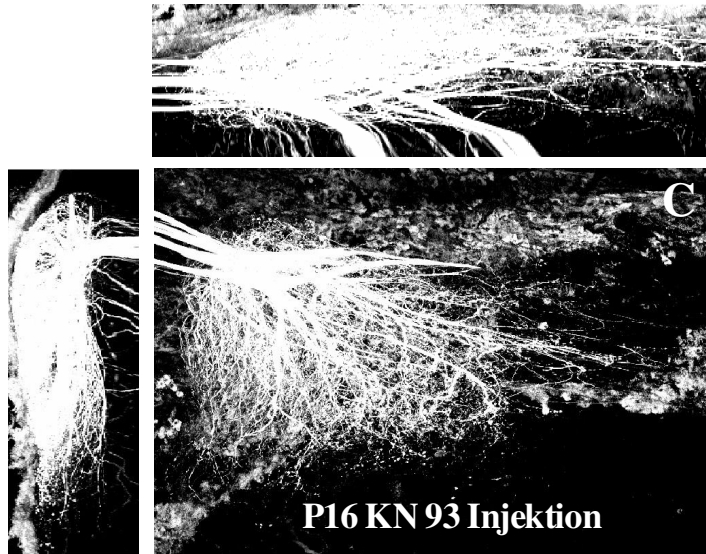


Abb. 30 Effekt von pharmakologischer CaM Kinase II Inhibition. Puppen wurden in den Stadien **P6**, **P7** und **P8** mit KN-93 injiziert und die Motoneurone im Stadium P16 über Nerv 1 retrograd gefärbt. Auch hier werden die Dendritenbäume aus verschiedenen Perspektiven gezeigt. Auch sind die Dendritenbäume in den KN-93 injizierten Tieren kleiner als in den Kontrolltieren. Dieser Befund deutet eher auf unspezifische Toxizität des Inhibitors hin.

Abb. 31 (nächste Seite) Effekt von pharmakologischer CaM Kinase II Inhibition. Puppen wurden mit dem CaM Kinase II Blocker KN-93 injiziert und das Motoneuron MN5 in verschiedenen Stadien intrazellulär gefärbt. **A:** Färbung in P3 **B:** Färbung in P4. In P3 und P4 ist kein signifikanter Unterschied zu nicht manipulierten Tieren des selben Entwicklungsstadiums zu erkennen (vergleiche z.B. Evers *et al.* 2004). **C:** Färbung im späten Stadium P5. Hier fällt auf, daß der durch die gestrichelte Linie und die weißen Pfeile gekennzeichnete Abzweig, der normalerweise im frühen Stadium P5 verschwindet, immer noch vorhanden ist.

