

4. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit ist die Rolle der CaM Kinase II bei der Entwicklung des Nervensystems *in vivo* am Beispiel der Umgestaltung des Zentralnervensystems während der Metamorphose eines holometabolen Insekts untersucht worden. Obwohl es über die Funktion der CaM Kinase II bei der neuronalen Plastizität bereits umfangreiche Literatur gibt, unterscheidet sich diese Arbeit in einigen Aspekten von den meisten anderen Studien. Die meisten Erkenntnisse über die Funktion der CaM Kinase II bei der neuronalen Plastizität sind in Zellkultur, vorwiegend mit Nervenzellen aus dem Hippocampus der Maus, gewonnen worden. Dies erlaubt zwar eine eingehende Untersuchung der intrinsischen Vorgänge auf zellulärer Ebene, auch unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Funktionen der Untereinheiten (Fink *et al.*, 2003), es kann jedoch nicht ohne weiteres davon ausgegangen werden, daß sich Nervenzellen in Kultur genauso verhalten wie im lebenden Organismus, wo sie mit dem umgebenden Gewebe (andere Nervenzellen, Glia) in Kontakt sind; daher stellt sich die Frage nach der Übertragbarkeit *in vitro* gewonnener Erkenntnisse auf den lebenden Organismus. Es ist somit erforderlich, daß Ergebnisse aus Zellkulturstudien daraufhin überprüft werden, ob sie auch *in vivo* ihre Gültigkeit haben. Solche Studien gibt es bisher nur in sehr begrenztem Umfang, vorwiegend im optischen Tektum von *Xenopus laevis* (Zou und Cline, 1999; Wu und Cline, 1998). In *Drosophila* ist die Rolle der CaM Kinase II bei der neuronalen Plastizität in Bezug auf Lernprozesse untersucht worden (siehe Einleitung; Griffith, 1997; Griffith *et al.*, 1993; Jin *et al.*, 1998). Neben der Übertragbarkeit von *in vitro*-Ergebnissen ist auch die Frage nach der Allgemeingültigkeit von in einer Spezies gefundenen Mechanismen der neuronalen Plastizität von erheblicher Bedeutung, daraus ergibt sich die Notwendigkeit von vergleichenden Studien mit phylogenetisch möglichst weit auseinanderliegenden Spezies.

Bei den Insekten ist die genetische Organisation der CaM Kinase II bisher nur in *Drosophila melanogaster* genau untersucht worden (GuptaRoy *et al.*, 2000) und es gibt eine Studie über die Änderungen von Expression, Verteilung und Aktivierung im ZNS von *Bombyx mori* (Shanavas *et al.*, 1998). Insekten sind aufgrund ihres im Vergleich zu Vertebraten relativ einfachen Nervensystems besonders gut geeignet, um die Morphologie und Physiologie einzelner identifizierter Neurone *in situ* zu untersuchen. Biochemische Untersuchungen der CaM Kinase II in *Manduca* erleichtern damit auch die Zusammenführung von biochemischen Da-

ten mit Ergebnissen aus morphologischen und physiologischen Untersuchungen in diesem Modellorganismus.

4.1. Eigenschaften der neuronalen CaM Kinase II aus *Manduca sexta*

Die Aufreinigung von CaM Kinase II aus *Manduca* Thorakalganglien mit Calmodulin-beschichteten „beeds“ ergab bei der Autophosphorylierung mit $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP eine Bande bei 66 kD. Dies entspricht in etwa der in *Bombyx mori* gefundenen Größe (Shanavas *et al.* 1998). Außerdem phosphoryliert das aufgereinigte Enzym das Substrat, das für die Aktivitätsmessungen verwendet wurde. Western Blots mit anti-CaM Kinase II führten zu einer gleich großen Bande. Dies deutet darauf hin, daß das gleiche Enzym sowohl in den Aktivitätsmessungen gemessen als auch vom Antikörper erkannt wird. Ein Widerspruch ist jedoch, daß im Rahmen dieser Arbeit bei *Manduca* nur eine CaM Kinase II Bande identifiziert wurde, während in *Bombyx mori* und anderen Systemen zwei Untereinheiten neuronaler CaM Kinase II bekannt sind (Shanavas *et al.*, 1998; Hudmon and Schulman, 2002). Hierzu ist zunächst anzumerken, daß bei den Versuchen mit *Bombyx* nur mit phosphorylierter CaM Kinase II zwei fast gleich große Banden auftreten, was unter dieser Voraussetzung in *Manduca* auch der Fall ist. Die Ergebnisse in dieser Arbeit lassen den Schluß zu, daß das scheinbare Auftreten von zwei Untereinheiten bei *Bombyx* und auch bei *Manduca* nur auf den unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten von phosphorylierter und nicht phosphorylierter CaM Kinase II im elektrischen Feld beruht. Zudem existiert in *Drosophila melanogaster*, dem einzigen Insekt, in dem bisher die genetische Organisation der CaM Kinase II genau bekannt ist, nur ein Gen für CaM Kinase II (Griffith und Greenspan, 1993). Die auch hier existierenden Isoformen sind Spleißvarianten dieses einen Gens. Möglich wäre, daß es in *Manduca* nur eine neuronale CaM Kinase II Isoform gibt. Dies würde das Auftreten von nur einer Bande sowohl im Western-Blot als auch in den Phosphorylierungsassays erklären; bei zwei Untereinheiten müßten zumindest bei den letzteren zwei Banden zu sehen sein, da sich die Isoformen auch gegenseitig phosphorylieren. Ein weiterer Vorzug der Hypothese von nur einer neuronalen Isoform in *Manduca* ist, daß unter Annahme der Existenz von zwei neuronalen Isoformen beide exakt gleich groß sein müßten. Dies ist unwahrscheinlich, da bei alternativem Spleißen, wie in *Drosophila*, nach der Transkription Teile der mRNA entfernt werden; man sollte also erwarten, daß sich die Spleißvarianten wenigstens geringfügig in ihrer Größe unterscheiden; die β -Isoform besitzt z.B. eine Aktinbindungsregion, die bei der α -Untereinheit nicht vorhanden ist. Ich sehe es daher als wahrscheinlicher an, daß im ZNS von *Manduca sexta* nur eine CaM Kinase II Iso-

form existiert. Die genetische Organisation der CaM Kinase II in *Manduca* würde sich damit von der in *Drosophila* nur dadurch unterscheiden, daß alternatives Spleißen bei der neuronalen CaM Kinase II unterbleibt. Falls es dennoch zwei neuronale CaM Kinase II Untereinheiten gibt, was angesichts der vorliegenden Daten als unwahrscheinlich betrachtet werden muß, ist aufgrund von Zellkulturexperimenten anzunehmen, daß der Antikörper beide Untereinheiten erkennt. Erste Ergebnisse aus immunzytochemischen Untersuchungen an kultivierten *Manduca*-Motoneuronen zeigen, daß auch in den Filopodien, in denen nur die Aktin-assoziierte β -Isoform lokalisiert sein sollte, CaM Kinase II Immunoreaktivität erkennbar ist (Till Puschmann, persönliche Mitteilung).

4.2. Änderungen von Aktivität und Expression der CaM Kinase II

Daß die Kalzium-stimulierte CaM Kinase II Aktivität über die gesamte Puppenentwicklung keine signifikante Änderung erfährt, während sich die intrinsische Aktivität signifikant ändert, deutet darauf hin, daß die CaM Kinase II Aktivität weitgehend über den Kalzium-Einstrom reguliert wird und nicht über die Expression. Ein weiteres Argument für diese Hypothese ist, daß die Aktivität der CaM Kinase II *in vivo* durch pharmakologische Inhibition von spannungsabhängigen Kalzium-Kanälen signifikant verringert werden kann (siehe 3.5.). Daraus folgt, daß die maximale Aktivierbarkeit und damit die Expression der CaM Kinase II relativ zur Größe des Ganglions unverändert bleibt, während entwicklungsbedingte Änderungen weitgehend über die intrinsische Aktivität und damit über den Anteil aktivierter CaM Kinase II an der Gesamtmenge der Kinase im Ganglion gesteuert werden. Dies impliziert, daß die Steuerung der CaM Kinase II Aktivität nahezu ausschließlich über Kalzium-Aktivierung erfolgt und nicht über Änderungen der CaM Kinase II Expression. Die intrinsische Aktivität sinkt zu Beginn der Puppenentwicklung zunächst drastisch ab um sich dann bis zum Stadium P8, das der Hälfte der Puppenentwicklung entspricht, wieder auf einen Wert zu steigern, der sich nicht signifikant von dem in der Larve unterscheidet. Diese Aktivitätsentwicklung deckt sich im Wesentlichen mit der im ZNS von *Bombyx mori* (Shanavas *et al.*, 1998). Im Stadium P8 erreichen die Kalzium-Membranströme und auch die intrazelluläre Kalzium-Konzentration in den Motoneuronen ihr Maximum (Duch und Levine, 2000; 2002) und auch der Wechsel der dendritischen Wachstumsphasen des Motoneurons MN5 tritt in dieser Phase der Entwicklung ein. Damit konnte eine zeitliche Korrelation zwischen der Entwicklung der CaM Kinase II Aktivität während der Metamorphose und wichtigen Ereignissen bei der Umgestaltung des Nervensystems gezeigt werden.

DISKUSSION

Die Messungen der CaM Kinase II Aktivität wurden mit ganzen Ganglien durchgeführt. Änderungen der Kinase-Aktivität sind daher auf eine Vielzahl von Prozessen innerhalb des Ganglions zurückzuführen, hierzu gehören Wachstum von Axonen und Dendriten sowie Synaptogenese; außerdem sterben Zellen ab (programmierter Zelltod) und es entstehen neue Zellen. Die Ergebnisse der CaM Kinase II Aktivitätsmessungen können daher nicht ohne weiteres auf strukturelle Änderungen einzelner Motoneurone bezogen werden. Um die Änderungen der Kinase-Aktivität bestimmten Bereichen im Ganglion oder auch einzelnen Neuronentypen zuordnen zu können, wurden zusätzlich immunhistochemische Färbungen mit einem kommerziellen CaM Kinase II Antikörper angefertigt, der wahrscheinlich die gesamte CaM Kinase II im ZNS von *Manduca sexta* erkennt, wie oben diskutiert wurde. Um die Neuropilregion zu markieren, wurden Doppelmarkierungen mit diesem Antikörper und einem Antikörper gegen das präsynaptische Protein Synaptotagmin angefertigt. Obwohl durch den Antikörper nur die Expression, nicht aber die Aktivierung der CaM Kinase II detektiert werden kann, ermöglichen diese Färbungen dennoch eine Aussage, welche Bereiche des Ganglions bzw. welche Zelltypen wahrscheinlich am stärksten zu Änderungen der gesamten CaM Kinase II Aktivität des Ganglions beitragen. Die hohe Aktivität im Larvenstadium L5 korreliert mit einer starken Expression in Somata, Axontrakten und Neuropil. Das Absinken der intrinsischen Aktivität zu Beginn der Verpuppung wird von keinen deutlichen Änderungen bei Intensität und Verteilung der Immunoreaktivität begleitet, was ein weiteres Indiz für eine aktivitätsbedingte Steuerung der CaM Kinase II Aktivität ist. Der Anstieg der CaM Kinase II Aktivität bis zum Stadium P8 wird jedoch von einer signifikanten Umverteilung der CaM Kinase II Expression begleitet. Im Stadium P2 hat die Expression in Zellkörpern und Neuropilregionen drastisch abgenommen, dagegen kann eine intensivere axonale Immunoreaktivität beobachtet werden, insbesondere an sensorischen Endigungen im Mesothorakalganglion. Die leichte Erhöhung der Aktivität bis zum Stadium P4 scheint vor allem auf CaM Kinase II in den Somata zurückzuführen sein, da ausschließlich hier die Expression im Vergleich zu P2 leicht erhöht ist. Der signifikante Aktivitätsanstieg zwischen P4 und P8 wird von einer drastischen Zunahme der Expression in Somata, Axontrakten und Neuropil begleitet. Dies steht nicht im Widerspruch zu der Hypothese, daß Änderungen der CaM Kinase Aktivität nicht auf Änderungen der Expression zurückzuführen sind, da bei den Aktivitätsmessungen die gemessene Aktivität in Form der Intensität der Substratbande durch die Intensität der übrigen Proteinbanden dividiert wird. Die Zunahme der CaM Kinase II Expression zwischen P4 und P8 korreliert also mit der ebenfalls deutlichen Größenzunahme der Ganglien in dieser Entwick-

DISKUSSION

lungsphase. In der zweiten Hälfte der Puppenentwicklung wurden die Färbungen an Agaroschnitten durchgeführt, so daß sie nur bedingt mit den Färbungen an ganzen Ganglien aus der ersten Hälfte der Puppenentwicklung verglichen werden können. Dennoch kann festgestellt werden, daß in der zweiten Hälfte der Puppenentwicklung eine starke CaM Kinase II Immunoreaktivität in Axonen, Zellkörpern und Neuropil zu beobachten ist, die bis zum Ende der Metamorphose noch geringfügig ansteigt; bei der maximalen Aktivität, die ebenfalls die Expression repräsentieren sollte, ist dagegen ein leichtes Absinken bis zum Ende der Puppenentwicklung zu beobachten. Es besteht also ein Widerspruch zu dem Ergebnis der Aktivitätsmessungen. Da die Ganglien in der zweiten Hälfte der Puppenentwicklung stark an Größe zunehmen, kommt hier sicher der oben diskutierte Unterschied zwischen den beiden Methoden zum Tragen, daß bei den Aktivitätsmessungen die relative Aktivität in Bezug auf den Gesamtphosphorylierung der übrigen neuronalen Proteine gemessen wird und die zunehmende Gangliengröße daher diese Diskrepanz erklären könnte. Es sind jedoch auch noch andere Aspekte bezüglich der Vergleichbarkeit zwischen Immunhistochemie und Aktivitätsmessungen zu beachten, die hier kurz umrissen werden sollen.

Die Messung in Bezug auf die Gesamtphosphorylierung macht das Ergebnis nicht nur von der Gangliengröße abhängig, sondern auch von den Kinaseaktivitäten, die für die Phosphorylierung der neuronalen Proteine verantwortlich sind; hierzu tragen alle im ZNS vorhandenen Kinasen bei und ihre Gesamtaktivität kann sich während der Entwicklung durchaus ändern. Als Erklärung kommt weiterhin infrage, daß die CaM Kinase II Lokalisation stark aktivitätsabhängig ist (siehe unten). Die zytoplasmatische Fraktion ist wahrscheinlich leichter aktivierbar und leichter zugänglich für Substrat. Auch die Expression ist aktivitätsabhängig und untereinheitenspezifisch, wie an kultivierten Hippocampus-Neuronen gezeigt wurde (siehe Einleitung, Thiagarajan *et al.*, 2002). Bei neuronaler Aktivität wird die Expression der α -Isoform heraufgeregelt, während die Expression der β -Untereinheit gleichermaßen reduziert wird. Die Gesamt-Expression ist daher wahrscheinlich von neuronaler Aktivität unabhängig. Die Diskrepanz könnte nun damit zu erklären sein, daß bei den Immunfärbungen nur die α -Isoform erkannt, das Substrat jedoch durch beide Isoformen phosphoryliert wird. Unter der Annahme, daß in *Manduca* nur eine neuronale Isoform der CaM Kinase II existiert, wäre die letztgenannte Erklärung in diesem System natürlich nicht relevant.

Betrachtet man die Expressionsentwicklung der CaM Kinase II in Somata, Axonen und Neuropil jeweils separat, können Korrelationen zu anderen Ereignissen der neuronalen Entwicklung festgestellt werden. Die Expression im Neuropil ist am Ende der Larvalentwicklung hoch, sinkt am Tag der Verpuppung deutlich ab und erhöht sich wieder nach der Hälfte der Puppenentwicklung, wenn sich die dendritische Kalziumkonzentration in den Motoneuronen erhöht und der Wechsel der Wachstumsphasen eintritt (Duch und Levine, 2000; 2002). Damit besteht eine Korrelation zwischen dem Anstieg der CaM Kinase II Expression und der Änderung des Wachstumsverhaltens der Dendriten einiger Motoneurone, die sich, neben zahlreichen anderen, im Neuropil befinden. Die Immunreaktivität in den sensorischen Axonen ist zu Beginn der Puppenentwicklung noch ähnlich hoch wie im letzten Larvenstadium, aber verringert sich bis zum Stadium P4, danach steigt sie wieder an und erhöht sich nochmal geringfügig ab dem Stadium P7, was ungefähr der Hälfte der Puppenentwicklung entspricht. Um das Stadium P4 herum vollzieht sich der Wechsel zwischen der Retraktion der Dendriten der DLM-Motoneurone und ihrem Einwachsen in das adulte Flugnetzwerk (Libersat und Duch, 2002). Diese Änderung der axonalen Expression korreliert ebenfalls mit dem Wechsel zwischen Retraktion und Integration der Motoneurone.

4.3. Änderungen der prä- und postsynaptischen Lokalisation von CaM Kinase II

Die Lokalisation der CaM Kinase II in Prä- und Postsynapse wurde ebenfalls über die Entwicklung untersucht. Hierbei tritt eine Umkehrung zwischen prä- und postsynaptischer Lokalisation zu Beginn der Metamorphose auf. Diese Umkehrung korreliert zeitlich mit Änderungen des dendritischen Wachstumsverhaltens einiger Motoneurone, die am Beispiel von MN5 beschrieben wurden (siehe Einleitung). Im Stadium P0, wo sich die Dendriten einiger Flugmotoneurone aus dem „langsamen“ larvalen Motornetzwerk zurückziehen, wie an MN5 gezeigt wurde, wird CaM Kinase II überwiegend präsynaptisch exprimiert, während P4, wo die Dendriten von MN5 in das Flugnetzwerk hineinwachsen, durch eine überwiegende postsynaptische Lokalisation gekennzeichnet ist, die bis zum Ende der Metamorphose anhält. Die Beobachtung, daß CaM Kinase II im adulten ZNS vorwiegend postsynaptisch lokalisiert ist, stimmt mit Beobachtungen aus anderen Systemen überein (Fox, 2003). Außerdem nimmt hier der Anteil der Synapsen, die überhaupt CaM Kinase II exprimieren, deutlich zu. Synaptische CaM Kinase II nimmt, abhängig von ihrer Expression in der Prä- oder Postsynapse, auf molekularer Ebene höchst unterschiedliche Funktionen wahr. Bei präsynaptischer CaM Kinase II handelt es sich um eine modifizierte α -Isoform, die mit Transmitter-Vesikeln assoziiert ist; an

DISKUSSION

diese CaM Kinase II ist Synapsin I gebunden, das durch die präsynaptische CaM Kinase II α phosphoryliert werden kann, diese Phosphorylierung führt zur Dissoziation des Synapsin I von den präsynaptischen Vesikeln, was die Transmitterfreisetzung erleichtert (Benfenati *et al.*, 1992). Die präsynaptische CaM Kinase II kann somit eine neuromodulatorische Funktion ausüben, was z.B. eine Rolle bei Lernprozessen ermöglicht. In der Tat ist durch Jin *et al.* (1998) gezeigt worden, daß präsynaptische CaM Kinase II eine Rolle bei nicht-assoziativen Lernprozessen spielt. Die Rolle präsynaptischer CaM Kinase II bei neuronaler Plastizität ist, im Gegensatz zur postsynaptischen Fraktion, noch nicht sehr intensiv untersucht worden. Ninnan und Arancio (2004) haben jedoch an Pyramidenzellen aus dem Mäusehippocampus gezeigt, daß präsynaptische CaM Kinase II essentiell für synaptische Plastizität ist. Bei postsynaptischer CaM Kinase II handelt es sich sowohl um die α - als auch um die β -Isoform, die im aktiven Zustand in der PSD lokalisiert ist. Sie übt ebenfalls eine neuromodulatorische Funktion durch Phosphorylierung von Glutamat-Rezeptoren des AMPA- und des NMDA-Typs aus. Dieses Ergebnis deckt sich mit Hinweisen aus der Literatur, daß postsynaptische CaM Kinase II für synaptische Plastizität von essentieller Bedeutung ist. Die Induktion von LTP erhöht die Expression CaM Kinase II α durch einen über NMDA-Rezeptoren und MAP-Kinase vermittelten Mechanismus. Hohe synaptische Aktivität führt zu erhöhter Lokalisation von CaM Kinase II α und β in der PSD. Geringe synaptische Aktivität verringert die Lokalisation beider Isoformen in der PSD (Colbran und Brown, 2004).

Die Untersuchung zur prä- und postsynaptischen Lokalisation ist an vergleichbaren Neuropilregionen durchgeführt worden, erlaubt jedoch keinen unmittelbaren Bezug zu bestimmten Nervenzellen. Daher wurden Dreifachmarkierungen durchgeführt (CaM Kinase II, Synaptotagmin, Neuron) und das Neuron dreidimensional rekonstruiert. Die beiden anderen Markierungen konnten dann auf das rekonstruierte Neuron projiziert werden. Damit konnte sowohl die intrazelluläre Verteilung der CaM Kinase II als auch die Korrelation (Überlappung) der beiden Signale innerhalb des dendritischen Feldes von MN5 untersucht werden. Die Situation in W4 kann weitgehend mit P0 verglichen werden, da sich die Tiere am selben Tag verpuppen. Man findet, daß die beiden Signale sich in W4 weitgehend überlappen, was auf Lokalisation der CaM Kinase II an Stellen mit hoher Wahrscheinlichkeit für synaptischen Eingang und damit auf eine synaptische Lokalisation der CaM Kinase II hindeutet. In P4 dagegen überlappen sich die Signale deutlich weniger, woraus man schließen kann, daß die CaM Kinase II hier vorwiegend nicht in den Synapsen lokalisiert ist.

4.4. Änderungen der Aktivität der Proteinkinase A

Die Verteilung der Proteinkinase A (PKA) konnte leider nicht untersucht werden, da ein Antikörper, der neuronale PKA in *Manduca* erkennt, nicht zu Verfügung stand. Eine Zuordnung der Enzymaktivität zu bestimmten Zelltypen und ein Vergleich mit der Lokalisation der CaM Kinase II war daher nicht möglich. Dies wäre sehr wünschenswert gewesen, um festzustellen, ob die beiden Kinasen gleichzeitig in den selben Zellen exprimiert werden oder gleichzeitig in verschiedenen Zellen bzw. zeitversetzt in den selben Zellen. In Bezug auf eventuelle Wechselwirkungen zwischen den Signalwegen, die im nächsten Abschnitt diskutiert werden, wäre diese Information von zentraler Bedeutung gewesen. Die Änderungen von maximaler und intrinsischer Aktivität wurden jedoch ebenfalls durch Phosphorylierung eines spezifischen Substrates gemessen. Die maximale PKA-Aktivität erfährt ebenfalls keine signifikanten Änderungen während der Metamorphose. Die intrinsische Aktivität entwickelt sich jedoch grundsätzlich anders als bei der CaM Kinase II. Am Tag der Verpuppung (P0) steigt sie signifikant um ca. 25 % an und fällt bis zum Stadium P4 um ungefähr den gleichen Anteil wieder ab. Daß sich die frühe intrinsische Aktivitätsentwicklung der PKA näherungsweise komplementär zur CaM Kinase II verhält, wirft die Frage nach einer Wechselwirkung zwischen den beiden Signalwegen auf, denkbar wäre eine negative Rückkopplung in der späten Larven- und frühen Puppenentwicklung. Die Unterschiedlichkeit der Änderungen der intrinsischen Aktivität bei beiden Kinasen läßt jedoch auf jeden Fall darauf schließen, daß entwicklungsbedingte Änderungen der intrinsischen Aktivität spezifisch für die jeweilige Kinase sind.

4.5. Wechselwirkungen zwischen CaM Kinase II und PKA

Tatsächlich gibt es Hinweise in der Literatur, die eine solche Hypothese stützen, diese sollen hier trotz der oben genannten Einschränkung im Zusammenhang mit der Aktivitätsentwicklung der beiden Proteinkinasen diskutiert werden. Tashima *et al.* (1996) haben in Zellkultur gezeigt, daß Aktivierung von PKA mit dem lipophilen cAMP-Analogen Dibutyryl-cAMP zu stabilem neuronalem Wachstum führt, während CaM Kinase II Aktivität neuronales Wachstum limitiert (siehe Einleitung). Sie diskutieren, neben der Phosphorylierung von Bestandteilen des Zytoskeletts, die Möglichkeit, daß CaM Kinase II Aktivität den cAMP-Signalweg stromaufwärts von der Aktivierung der PKA inhibiert und damit das, ansonsten durch PKA-Aktivität induzierte, neuronale Wachstum unterdrückt. Tatsächlich ist in *Drosophila* eine durch Ca^{2+} /Calmodulin aktivierbare Phosphodiesterase bekannt; es handelt sich um die Form I Phosphodiesterase (PDE Form I), die sowohl cAMP als auch cGMP (zyklisches Guanosin-

DISKUSSION

monophosphat) hydrolysiert. Die andere in *Drosophila* bekannte Phosphodiesterase, die vom *dunce*-Gen codierte und cAMP-spezifische Form II, zeigt keine Wechselwirkung mit Ca^{2+} /Calmodulin (Walter und Kieger, 1984). PDE Form I aus *Drosophila* gehört zur PDE1-Genfamilie Ca^{2+} /Calmodulin-abhängiger Phosphodiesterasen (Reed *et al.*, 1998; Conti *et al.*, 1995), Homologe sind bekannt und beschrieben z.B. im Huhn (Caniglia *et al.*, 1997; Giorgi *et al.*, 2002) und in der Maus (Yan *et al.*, 1996; Reed *et al.*, 1998). Ca^{2+} /Calmodulin-abhängige Phosphodiesterasen gehören zu den wichtigsten Enzymen, die die komplexen Interaktionen zwischen den auf Kalzium und auf zyklischen Nukleotiden basierenden „second messenger“-Signalwegen bestimmen (Kakkar *et al.*, 1999; Ludvig *et al.*, 1991). In Maus und Huhn sind mehrere Isoformen von PDE1 bekannt, die sich in ihrer Substratspezifität und ihrem Expressionsmuster unterscheiden; die Isoform PDE1B ist cAMP-spezifisch und wird in Neuronen exprimiert (Reed *et al.*, 1998; Giorgi *et al.*, 2002) und kommt damit am ehesten als Bindeglied zwischen der Aktivitätsentwicklung von CaM Kinase II und PKA in Betracht. Giorgi *et al.* (2002) haben die Änderungen von Expression, Lokalisierung und Aktivierung der PDE1-Isoformen im Rückenmark sich entwickelnder Hühnerembryonen untersucht, die PDE1-Aktivität wurde in zehn und achtzehn Tage alten Embryonen (E10 und E18) sowie in fünf Tage alten Küken (P5) für beide Substrate gemessen. Sie fanden einen ca. 5-fachen Anstieg der intrinsischen PDE1-Aktivität bei cAMP und cGMP zwischen den Stadien E10 und E18, während die Aktivität zwischen E18 und P5 konstant bleibt. Allerdings wurde hier die Aktivität pro Ganglion gemessen, wobei die Größenzunahme der Ganglien während der Entwicklung unberücksichtigt blieb; es ist daher anzunehmen, daß die relative Aktivität, bei der die Größenzunahme der Ganglien berücksichtigt wird, zwischen E10 und E18 deutlich weniger ansteigt und zwischen E18 und P5 um ca. 70 % zurückgeht. Damit würde die PDE1-Aktivität am Ende der Embryonalentwicklung ansteigen und zu Beginn der postembryonalen Entwicklung deutlich zurückgehen; dies korreliert mit der Aktivitätsentwicklung von CaM Kinase II in *Manduca*. Die intrinsische Aktivität ist hier am Ende der Larvalentwicklung relativ hoch und wird zu Beginn der Puppenentwicklung drastisch reduziert. Eine weitere interessante Wechselwirkung zwischen den Signalwegen ist, daß PDE1B durch CaM Kinase II phosphoryliert werden kann, wodurch die Aktivierbarkeit durch Ca^{2+} /Calmodulin abnimmt (Zhao *et al.*, 1997). Dies eröffnet die Möglichkeit einer gegenseitigen negativen Rückkopplung zwischen den beiden Signalwegen.

4.6. Andere Kalzium-abhängige Enzyme

Im Rahmen der Wechselwirkungen zwischen Signalwegen muß hier auch berücksichtigt werden, daß im Nervensystem neben CaM Kinase II auch noch andere Kalzium-abhängige Enzyme existieren, die Einfluß auf das dendritische Wachstumsverhalten haben. Hier ist insbesondere die Kalzium-abhängige Phosphatase Calcineurin (auch bekannt als Proteinphosphatase 2B, PP2B) zu nennen. Lautermilch und Spitzer (2000) haben in kultivierten spinalen Neuronen aus adulten *Xenopus laevis* gezeigt, daß Calcineurin das axonale Neuritenwachstum hemmt. Dies geschieht über die Dephosphorylierung des zytoskelettalen Proteins GAP-43 („growth associated protein 43“), auch bekannt als Neuromodulin, das in Wachstumskegeln konzentriert ist (Liu und Storm, 1989; Apel und Storm, 1992) und im nicht-phosphorylierten Zustand das Neuritenwachstum verlangsamt (He *et al.*, 1997). GAP-43 wird durch PKA (Schmidt *et al.*, 1998) und Proteinkinase C (PKC, Apel *et al.*, 1991) phosphoryliert, diese Phosphorylierung ist *in vivo* auf Wachstumskegel distaler axonaler Verzweigungen beschränkt.

In dieser Arbeit ist bereits mehrmals aufgefallen, daß Änderungen der Konzentration von intrazellulärem Kalzium widersprüchliche Wirkungen auf das Neuritenwachstum haben können. Im optischen Tektum von *Xenopus* Kaulquappen limitiert eine Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration das Dendritenwachstum (Zou und Cline, 1999), das gleiche scheint auch für die DLM-Flugmotoneuronen in *Manduca* zu gelten. An kultivierten *Aplysia* Neuronen wurde dagegen gezeigt, daß eine Verringerung der intrazellulären Kalziumkonzentration ebenfalls das Auswachsen von Dendriten unterdrückt (Goldberg, 1988). Offensichtlich kann intrazelluläres Kalzium abhängig von Neuronentyp, subzellulärer Lokalisation und Entwicklungsphase höchst unterschiedliche Wirkungen auf die dendritische Morphologie ausüben. In der Einleitung ist bereits die Hypothese erwähnt worden, daß Neuritenwachstum von einer bestimmten permissiven Kalzium-Konzentration begünstigt wird und ein Über- oder Unterschreiten dieser Konzentration jenseits eines gewissen Toleranzbereiches gleichermaßen zu einer Verlangsamung des Neuritenwachstums führt; diese permissive Kalziumkonzentration kann sich zwischen verschiedenen Zelltypen und verschiedenen Regionen innerhalb des Neurons unterscheiden und auch während der Entwicklung ändern (Kater und Mills, 1991). Es ist anzunehmen, daß die jeweilige Höhe der permissiven Kalziumkonzentration von der lokalen Konzentration und Aktivierbarkeit der kalziumsensitiven Enzyme abhängt, die neuronales

Wachstumsverhalten beeinflussen können. Calcineurin wird bei geringeren Kalziumkonzentrationen aktiviert als CaM Kinase II (Lisman, 1989).

4.7. Pharmakologische Inhibition der CaM Kinase II

Um die Arbeitshypothese, daß CaM Kinase II beim Wechsel der Wachstumsphasen von MN5 eine essentielle Rolle spielt, direkt zu testen, wurde ein CaM Kinase II Inhibitor während der normalen Entwicklung injiziert und die Dendritenstruktur von MN5 durch retrograde Färbungen visualisiert. Die Manipulationsexperimente mit der CaM Kinase II Aktivität zeigen zwar, daß die Applikation des Pharmakons einen Effekt auf die Morphologie der gefärbten Motoneurone hat, hinsichtlich der Art dieses Effektes sind die Ergebnisse jedoch höchst widersprüchlich. Unabhängig davon, ob die CaM Kinase II zu Beginn der Entwicklungsphase inhibiert wird, in der ihre Aktivität normalerweise ansteigt (Injektionen in P4, P5 und P6) oder an deren Ende (Injektionen in P6, P7 und P8), ist am Ende der Puppenentwicklung ein reduziertes Dendritenwachstum zu beobachten. Wenn zu Beginn Phase ansteigender Aktivität inhibiert wird (Injektionen in P4 und P5) und die Motoneurone noch vor ihrem Wiederabsinken intrazellulär gefärbt werden (Färbung in später P5), ist bis auf die verzögerte Rückbildung einer Verzweigung kein signifikanter Effekt zu beobachten. Bei einer Blockade des Kalziumeinstroms durch Verapamil sind dagegen Filopodienlänge und Zahl der Verzweigungen gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht (Evers und Duch, 2004). Wurde die Dosis des Pharmakons erhöht, starben die Tiere oder blieben in der Entwicklung stehen; dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß es sich hier um ein Signalmolekül von sehr zentraler Bedeutung handelt (siehe Einleitung), dessen Inhibition den Fortgang der gesamten Entwicklung stören kann. Es ist daher nicht möglich, einen eventuellen morphologischen Effekt zu verstärken, indem man die Dosis erhöht. Eine Inhibition eines derart wichtigen Signalmoleküls kann wahrscheinlich nur in sehr geringem Ausmaß durchgeführt werden, will man die normale Entwicklung nicht so sehr stören, daß für das neuronale Wachstum spezifische Effekte nicht mehr erkennbar sind. Daraus folgt, daß solche Effekte immer sehr gering sein werden. Um einen eventuellen Effekt dennoch zu registrieren, müßte man eine größere Zahl von Dendritenbäumen aus manipulierten Tieren und Kontrolltieren dreidimensional rekonstruieren und Dendrogramme erstellen, was den zeitlichen Rahmen dieser Arbeit gesprengt hätte. Ein anderer Ansatz wäre, die CaM Kinase II nur in einzelnen Neuronen, z.B. in MN5 zu inhibieren, wodurch dann auch eine interne Kontrolle möglich wäre, indem man auf einer Seite einen geeigneten Inhibitor intrazellulär injiziert und auf der anderen nicht. Man könnte

auch versuchen, intrazelluläre Substrate der CaM Kinase II zu identifizieren, die für die Beeinflussung des neuronalen Wachstumsverhaltens relevant sein könnten, und deren Phosphorylierung selektiv zu inhibieren. Damit würde man stromabwärts von der CaM Kinase II eingreifen und Auswirkungen auf andere Signalwege minimieren; zusätzlich würde ein solcher Ansatz zur Aufklärung des Wirkungsmechanismus der CaM Kinase II beitragen.

4.8. Wie beeinflusst CaM Kinase II das Wachstum von Nervenzellen?

Der Mechanismus, durch den CaM Kinase II Änderungen des dendritischen Wachstumsverhaltens bewirkt, ist noch nicht aufgeklärt. Vermutlich handelt es sich nicht nur um einen Mechanismus, sondern um mehrere ineinandergreifende Signalwege. Zum Einen sind die Änderungen des Wachstumsverhaltens sehr komplex, in *Manduca* unterscheiden sie sich innerhalb eines Dendritenbaumes abhängig von der Ordnung der Verzweigungen. Zum Anderen gibt es in der Literatur vielfältige, auch widersprüchliche, Hinweise zu dieser Frage. Es ist z.B. gezeigt worden, daß CaM Kinase II Bestandteile des Zytoskeletts direkt phosphoryliert und damit Änderungen des Wachstumsverhaltens von Neuronen bewirkt (Yamamoto *et al.*, 2002). Außerdem beeinflusst CaM Kinase II Filopodienwachstum und Synapsenbildung (Jourdain *et al.*, 2003) und kann intrazelluläre frequenzabhängige Kalziumsignale decodieren (De Koninck und Schulman, 1998). Die β -Isoform ist im inaktiven Zustand mit F-Aktin assoziiert (Shen und Meyer, 1999) und beeinflusst daher das dendritische Verzweigungsverhalten wahrscheinlich nicht durch Phosphorylierung von Aktin oder anderen zytoskelettalen Proteinen sondern durch sterische Wechselwirkungen. Andererseits haben Gaudilliere *et al.* (2004) an Nervenzellen aus dem Cerebellum vom Ratten in Zellkultur gezeigt, daß der Transkriptionsfaktor NeuroD von CaM Kinase II phosphoryliert wird und daraufhin Dendritenwachstum stimuliert. Dies widerspricht den bisherigen Aussagen, daß CaM Kinase II Aktivität dendritisches Wachstum hemmt. Es gibt weitere Hinweise in der Literatur, daß neuronale CaM Kinase II Aktivität nicht grundsätzlich eine Inhibition des Neuritenwachstums bewirkt, sondern daß der Einfluß dieser Kinase auf das neuronale Wachstumsverhalten wesentlich komplexer ist. Diese Frage ist oben diskutiert worden. Ein weiterer interessanter Aspekt ist, daß bei diesem Mechanismus das Dendritenwachstum über die Transkription reguliert wird (Gaudilliere *et al.*, 2004).

Obleich angenommen wird, daß im ZNS von *Manduca* nur eine Isoform von CaM Kinase II existiert, soll hier die Bedeutung der Isoformendiversität für die neuronale Plastizität kurz

diskutiert werden, da dies bei Organismen mit mehr als einer neuronalen Isoform von essentieller Bedeutung ist. Die beiden neuronalen Untereinheiten der CaM Kinase II üben höchst unterschiedliche Funktionen bei der Beeinflussung des neuronalen Wachstumsverhaltens aus, was in der Einleitung bereits beschrieben wurde (Fink *et al.*, 2003). Die intrazelluläre Verteilung der CaM Kinase II Untereinheiten ist nicht statisch sondern aktivitätsabhängig (Fink und Meyer, 2002; Colbran und Brown, 2004): In nicht aktivierten Zellen ist CaM Kinase II α diffus im Plasma verteilt, während sie bei Aktivierung zu den Synapsen transloziert wird. Hierzu ist Bindung von Ca^{2+} /CaM an die Kinase erforderlich. CaM Kinase II β ist mit F-Aktin assoziiert und wird bei Aktivierung zur PSD transloziert. In *Manduca* werden daher wahrscheinlich alle neuronalen Funktionen von nur einer Isoform wahrgenommen. Die genetische Organisation der CaM Kinase II ist bisher nur in sehr wenigen Organismen untersucht worden. Die Daten aus diesen Organismen zeigen jedoch mit einiger Sicherheit, daß die Aufspaltung der CaM Kinase II in verschiedene Isoformen erst relativ spät in der Evolution aufgetreten ist; sie vollzog sich zunächst durch alternatives Spleißen eines einzigen CaM Kinase II Gens; in *Drosophila* kommt die Isoformendiversität der CaM Kinase II auf diese Weise zustande (Gupta-Roy und Griffith, 1996). In Vertebraten existieren dagegen mehrere CaM Kinase II Gene, die die verschiedenen Untereinheiten codieren (Hudmon und Schulman, 2002b). Es ist daher möglich, daß in manchen Organismen mit nur einem CaM Kinase II Gen das alternative Spleißen unterbleibt oder weniger ausgeprägt ist und daher nur eine neuronale Isoform existiert, die sämtliche Aufgaben der neuronalen CaM Kinase II wahrnimmt; in anderen Gewebetypen könnten dennoch weitere Spleißvarianten vorhanden sein.

4.9. Schlußbetrachtung

In dieser Studie sollten die biochemischen Aspekte einer möglichen Rolle der CaM Kinase II bei der Umgestaltung des Nervensystems während der Metamorphose von *Manduca sexta* untersucht werden. Die Änderungen von Aktivität, Expression und Lokalisation der CaM Kinase II in den Thorakalganglien korrelieren mit wichtigen Ereignissen während der Entwicklung des Nervensystems. Weiterhin konnte gezeigt werden, daß pharmakologische Blockade von spannungsabhängigen Kalziumkanälen die intrinsische CaM Kinase II Aktivität meßbar reduziert. Da sich spannungsabhängige Kalziumkanäle bei neuronaler Aktivität öffnen, folgt daraus, daß die Aktivierung der neuronalen CaM Kinase II über neuronale Aktivität reguliert wird. Somit konnte *in vivo* gezeigt werden, daß es eine Korrelation zwischen neuronaler Aktivität, Änderungen der CaM Kinase II Aktivität und morphologischen Änderungen gibt. Die

pharmakologischen Manipulationsversuche mit dem CaM Kinase II Inhibitor geben einen ersten Hinweis darauf, daß es möglich ist, die CaM Kinase II durch regelmäßige Injektionen eines Pharmakons während der normalen Entwicklung zu inhibieren und die Auswirkungen auf die Entwicklung des Nervensystems *in situ* zu beobachten.

4.10. Ausblick

Nach Abschluß dieser Arbeit ergeben sich weiterführende Fragen. Es konnte nicht zweifelsfrei festgestellt werden, wieviele neuronale CaM Kinase II Untereinheiten es in *Manduca sexta* gibt, obgleich die Ergebnisse vermuten lassen, daß es sich um nur eine Untereinheit handelt. Eine Möglichkeit zur Klärung dieser Frage wäre die massenspektrometrische Auftrennung von isolierter CaM Kinase II. Allerdings müßte der Reinheitsgrad sehr hoch sein, damit man beim Auftreten von mehreren „peaks“ auch auf mehrere Untereinheiten schließen kann. Da *Manduca* ein hervorragend geeignetes System ist, um die Neuralentwicklung auf der Ebene einzelner Neurone *in situ* zu studieren, wäre es auch sinnvoll, einen molekularbiologischen Zugang zur CaM Kinase II in *Manduca* zu finden. Ein erster Schritt wäre die Klonierung des Gens. Dies würde die Anwendung weiterer Methoden ermöglichen, wie z.B. die Unterdrückung der Expression durch „dsRNA interference“. Diese Methode ist nicht nur wegen ihrer durch pharmakologische Inhibition unerreichbar hohen Spezifität interessant, sondern auch, weil durch Pharmaka lediglich eine kompetitive Hemmung erreicht werden kann, das heißt, daß die Aktivität infolge von Autophosphorylierung nicht inhibiert wird; dsRNAi hemmt dagegen die Genexpression und reduziert damit die Kinaseaktivität unabhängig vom Aktivierungsmechanismus. Bei den immunhistochemischen Färbungen konnte nicht zwischen aktivierter und nicht-aktivierter CaM Kinase II unterschieden werden, da für *Manduca* kein phosphospezifischer Antikörper zur Verfügung stand. Sollte sich dies ändern, wäre die gleiche Versuchsreihe mit dem phosphospezifischen Antikörper eventuell als Mehrfachmarkierung mit einem nicht-phosphospezifischen Antikörper wesentlich aussagekräftiger, da man Änderungen der intrinsischen Aktivität wesentlich präziser einzelnen Neuronentypen sowie Bereichen innerhalb des Neurons (Axone, Somata, Dendriten) zuordnen könnte. Die Ergebnisse der Manipulationsexperimente, in denen der morphologische Effekt einer Inhibition der CaM Kinase II untersucht wurde, sind, aus Gründen die oben diskutiert wurden, nur sehr vorläufiger Natur. Um hier zu eindeutigen Ergebnissen zu kommen, die auch den Einfluß der CaM Kinase II Inhibition auf das dendritische Wachstumsverhalten abhängig von der Verzweigungsordnung erkennen lassen, müßten dreidimensionale Rekonstruktionen der Dendri-

DISKUSSION

tenbäume von Motoneuronen aus Tieren, in die der Inhibitor injiziert wurde und Kontrolltieren erstellt werden; dies müßte mit einer größeren Zahl von Tieren geschehen, da sich Altersunterschiede von nur wenigen Stunden zwischen manipuliertem Tier und Kontrolle bereits auf das Ergebnis auswirken könnten. Da dieser Fehler in beiden Richtungen auf der Zeitachse auftreten kann (die manipulierten Tiere können älter sein als die Kontrolltiere oder umgekehrt), müßte er sich bei einer ausreichend großen Zahl von Versuchstieren wieder ausgleichen, wodurch dann der Effekt der CaM Kinase II Inhibition hervortreten würde. Anhand von Dendrogrammen könnte dann genau untersucht werden, welchen Einfluß die Inhibition der CaM Kinase II auf das Wachstum von Verzweigungen verschiedener Ordnungen hat. Wie oben erwähnt, wäre es in diesem Zusammenhang auch denkbar, stromabwärts von der CaM Kinase II einzugreifen. Interessant wäre auch eine immunhistochemische Untersuchung der Verteilung und Expression der Proteinkinase A über die Entwicklung, wofür ein geeigneter Antikörper während des experimentellen Teils dieser Arbeit ebenfalls nicht zur Verfügung stand. Besonders aussagekräftig wäre auch hier ein Antikörper, der spezifisch für aktivierte PKA ist, zusätzlich zu einem, der das aktivierte und nicht aktivierte Enzym gleichermaßen detektiert. Sollten CaM Kinase II und PKA in den selben Zellen exprimiert werden und sich ihre Aktivierung während der späten Larven- und frühen Puppenentwicklung komplementär zueinander verhalten, würde dies die oben diskutierte Hypothese einer negativen Rückkopplung zwischen CaM Kinase II und PKA Aktivität stützen.

5. Zusammenfassung/ Summary

5.1. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden die Änderungen von Verteilung, Expression und Aktivität der Ca^{2+} /Calmodulin-regulierten Proteinkinase II (CaM Kinase II) während der Metamorphose des Tabakswärmers *Manduca sexta* im Hinblick auf eine mögliche Rolle dieser Kinase bei der Umorganisation des Nervensystems untersucht, die für die Anpassung an das Verhaltensrepertoire des adulten Insekts erforderlich ist. Einige larvale Motoneurone persistieren die Metamorphose und erfahren im Rahmen dieser Umorganisation einen Funktionswechsel, der mit drastischen Änderungen ihrer morphologischen und physiologischen Eigenschaften einhergeht. Eine Gruppe von Motoneuronen, die in der Larve an Kriechbewegungen beteiligt sind, ziehen sich zu Beginn der Metamorphose aus dem larvalen Netzwerk zurück und wachsen in zwei Phasen in das adulte Nervensystem ein, wo sie als Flugmotoneurone fungieren. In der ersten, hormonell gesteuerten, Wachstumsphase wachsen Dendriten aller Ordnungen gleichmäßig während in der zweiten, aktivitätsgesteuerten, Phase das Wachstum auf besonders feine Dendriten hoher Ordnung beschränkt ist. Der Wechsel der Phasen geht mit aktivitätsbedingtem dendritischem Kalziumeinstrom einher. Aufgrund von Studien an anderen Systemen wurde es als sehr wahrscheinlich angesehen, daß CaM Kinase II diese Änderungen der dendritischen Kalziumkonzentration in morphologische Änderungen übersetzt oder zumindest an diesem Prozeß beteiligt ist. Daher wurden zunächst Experimente zur Charakterisierung der neuronalen CaM Kinase II in *Manduca sexta* durchgeführt. Die neuronale CaM Kinase II in *Manduca* besteht wahrscheinlich aus nur einer Untereinheit mit einem Molekulargewicht von ca. 66 kD. Es konnte gezeigt werden, daß die Aktivitätsentwicklung der neuronalen CaM Kinase II in den Thorakalganglien mit dem Wechsel der Wachstumsphasen und dem dendritischen Kalziumeinstrom korreliert. Pharmakologische Blockade von Kalziumkanälen während der Metamorphose führt zu einer Verringerung der CaM Kinase II Aktivität. Das bedeutet, daß die CaM Kinase II Aktivität *in vivo* durch neuronale Aktivität reguliert wird. Die Verteilung der CaM Kinase II innerhalb des thorakalen Nervensystems ändert sich während der Metamorphose. Am Ende der Larvalentwicklung kann eine starke Expression in Zellkörpern, Axonen und Neuropil beobachtet werden; die Verteilung am Ende der Metamorphose im adulten Insekt ähnelt der im letzten Larvenstadium. Während der Puppenentwicklung kommt es jedoch zu umfangreichen Änderungen bei der Verteilung der CaM Kinase II Expression, die mit den Änderungen des dendritischen Wachstumsverhaltens der DLM-

ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY

Motoneuronen korrelieren. Die Expressionsentwicklung im Neuropil korreliert mit dem Wechsel der Wachstumsphasen nach der Hälfte der Puppenentwicklung, die in den sensorischen Axonen mit dem Wechsel zwischen Retraktion aus dem larvalen Netzwerk und Integration in das adulte Flugnetzwerk. Im ersten Viertel der Puppenentwicklung findet auch ein Wechsel der synaptischen CaM Kinase II Lokalisation von zunächst vorwiegend präsynaptisch zu vorwiegend postsynaptisch statt, der ebenfalls mit dem Wechsel zwischen Retraktion und Integration korreliert. Im Motoneuron MN5, das zu den oben genannten persistierenden Motoneuronen gehört, ist im dendritischen Feld die CaM Kinase II zu Beginn der Metamorphose vorwiegend synaptisch lokalisiert, während sie nach einem Viertel der Puppenentwicklung vornehmlich außerhalb der Synapsen lokalisiert ist. Vorläufige Ergebnisse aus pharmakologischen Manipulationsexperimenten geben erste Hinweise darauf, daß Inhibition der neuronalen CaM Kinase II das Dendritenwachstum bei den oben genannten Motoneuronen beeinflusst.

5.2. Summary

In this study, changes in dispersion, expression and activity of calcium/ calmodulin dependent protein kinase II (CaM kinase II) during the metamorphosis of the tobacco hornworm *Manduca sexta* were investigated with regard to a putative role of this kinase in remodeling of the nervous system, which is necessary to accommodate the adult behaviour. Some larval motoneurons persist metamorphosis and are subject to a functional change, which is accompanied by drastic morphological and physiological changes. One group of motoneurons, which are involved in crawling movements in the larva, retract from the larval network at the beginning of metamorphosis and are integrated in the adult motor circuits, where they are flight motoneurons, innervating the dorsolongitudinal flight muscle (DLM). This integration is divided in two phases. In a first, hormonally controlled, growth phase dendrites of all orders grow evenly while in the second phase growth is limited to very fine high order dendrites. The change of these growth phases is accompanied by activity dependent dendritic calcium influx. Based on studies in other systems, it was hypothesized, that CaM kinase II may translate changes in dendritic calcium concentration into morphological changes, or is at least involved in this process. Hence, experiments were conducted to characterize neuronal CaM kinase II in *Manduca sexta*. Neuronal CaM kinase II in *Manduca* consists presumably of only one subunit with a molecular weight of approximately 66 kD. It was shown, that the development of neuronal CaM kinase II activity in the thoracic ganglia correlates with the change of growth phases and dendritic calcium influx. Pharmacological blockade of voltage dependent calcium channels during metamorphosis leads to a reduction of CaM kinase II activity. Therefore, the dispersion of CaM kinase II in the thoracic nervous system changes during metamorphosis. At the end of larval development, there is a strong expression in somata, axons and neuropil; the dispersion at the end of metamorphosis in the pharate adult insect is similar to the last larval stage. However, during pupal development there are general changes in dispersion of CaM kinase II expression, which correlate with the changes in dendritic growth modus of DLM flight motoneurons. In the neuropil, the changes in expression correlate in time with the change of dendritic growth phases in some motoneurons, in the axons they correlate with the change between retraction from the larval network and integration in the adult flight network. In the first quarter of pupal development, there is also a change of synaptic CaM kinase II localization from initially predominantly presynaptic to predominantly postsynaptic. This also correlates with the change between retraction and integration. In the motoneuron MN5, which belongs to the group of persisting neurons, CaM kinase II is localized at synaptic sites at the

ZUSAMMENFASSUNG/ SUMMARY

onset of metamorphosis, but extrasynaptically after the first quarter of pupal development. Preliminary results from pharmacological manipulation experiments give a first hint, that inhibition of neuronal CaM kinase II may influence dendritic growth behaviour of the DLM flight motoneurons.