

1. Einleitung

1.1. Axonale Wegfindung

Eine wichtige Voraussetzung für die Funktionalität eines Nervensystems ist die korrekte Etablierung neuronaler Verbindungen während der frühen Embryonalentwicklung. Bei der Bildung dieser spezifischen Nervenverbindungen müssen die Axone oft über lange Distanzen ihren Weg zum Zielort finden, dort die richtigen Partnerzellen erkennen und mit diesen synaptische Verbindungen aufnehmen. In den letzten Jahren sind eine Reihe von Molekülen gefunden worden, die bei der Weg- und Zielfindung der Axone eine Rolle spielen und z.B. zu den neuronalen Zelladhäsionsmolekülen der Immunglobulinsuperfamilie, Cadherinen, Netrinen, Slit-Molekülen, Semaphorinen, Ephrinen, Neurotrophen, extrazellulären Matrixmolekülen und BMPs („bone morphogenic proteins“) gehören. Per Diffusion oder membrangebunden wirken sie entweder attraktiv bzw. dulddend oder abstoßend bzw. hemmend auf den Wachstumskegel des Axons und beeinflussen ihn so bei seiner Wegfindung (Tessier-Lavigne and Goodman, 1996; Dickson, 2002). Viele Wachstumskegel müssen während des Auswachsens in der Lage sein ihre Antworteigenschaft auf ein Wegfindungsmolekül zu ändern z.B. wenn sie, um zu ihrem Endverzweigungsgebiet zu gelangen, durch Zwischenzielgebiete wachsen oder durch Zielregionen anderer Axonpopulationen. Entscheidend für die Reaktion eines Wachstumskegels auf ein extrazelluläres Wegfindungsmolekül ist der von der Zielzelle exprimierte Rezeptortyp. In Wirbeltieren wurden z.B. für die Netrine zwei Rezeptorgruppen identifiziert: DCC („deleted in colorectal carcinoma“) und UNC-5. Mitglieder der DCC-Unterfamilie vermitteln als Antwort auf Netrin ein attraktives Signal, bei gemeinsamer Expression mit einem Mitglied der UNC-5-Familie jedoch ein repulsives Signal (de, Jr. et al., 1997; Hong et al., 1999). Des Weiteren beeinflusst auch die intrazelluläre Konzentration an zyklischen Nukleotiden, wie cAMP (zyklisches Adenosin-3',5'-monophosphat) und cGMP (zyklisches Guanosin-3',5'-monophosphat), das Antwortverhalten eines Wachstumskegels auf ein extrazelluläres Wegfindungsmolekül. So konnte *in vitro* die repulsive Wirkung von Semaphorin 3A auf Wachstumskegel spinaler *Xenopus*-Axone durch Erhöhung der cGMP-Konzentration in eine attraktive Wirkung umgewandelt werden bzw. die attraktive Wirkung von Neurotrophin 3 durch Senkung des cGMP-Spiegels in eine repulsive (Song et al., 1998). Durch Senken des cAMP-Spiegels wurde indessen die attraktive Wirkung von Netrin-1 und BDNF („brain-derived neurotrophic factor“) auf diese Neurone in eine repulsive umgewandelt (Song et al., 1997; Ming et al., 1997; Caroni, 1998). Eine derartige Modulation scheint z.B. in *Xenopus* eine wichtige Rolle

bei der Wegfindung retinaler Axone zum Tectum zu spielen. Diese Axone werden zunächst beim Auswachsen aus der Retina von Netrin-1 angezogen, zeigen beim Durchwachsen des ventralen Diencephalon ein neutrales Antwortverhalten und werden schließlich nach Erreichen des Tectums von Netrin-1 abgestoßen. Die Antwortveränderungen korrelieren hierbei mit einer graduellen Abnahme der intrinsischen cAMP-Konzentration (Shewan et al., 2002). Indessen wirkt Semaphorin 3A im Cortex der Maus anziehend auf die apikalen Dendriten der Pyramidenzellen, jedoch abstoßend auf deren Axone. Nur die Dendriten exprimieren die lösliche Guanylatzyklase, was eine höhere vorherrschende Konzentration von cGMP in den Dendriten als in den Axonen impliziert (Polleux et al., 2000). Nishiyama und Kollegen konnten inzwischen *in vitro* zeigen, dass das intrazelluläre Konzentrationsverhältnis von cAMP zu cGMP für die von Netrin-1 induzierte axonale Wegfindung entscheidend ist. Ein Überschuss an cAMP führt zu einer attraktiven Wirkung, während ein Überschuss an cGMP eine repulsive Wirkung vermittelt (Nishiyama et al., 2003). Wachstumskegel sind also in der Lage plastisch auf intrinsische und extrinsische Faktoren zu reagieren. Die Wachstumskegel an den Spitzen auswachsender Axone sind hoch chemosensitive und motile Strukturen, die mit ihren fingerförmigen und lappenartigen Fortsätzen, den Filopodien und Lamellipodien, ihre Umgebung „abtasten“. Filamentöses Aktin (F-Aktin) und Mikrotubuli sind die zwei zytoskelettalen Hauptkomponenten der Wachstumskegel. Das durch extrazelluläre Wegfindungsmoleküle ausgelöste, veränderte Antwortverhalten der Wachstumskegel, wie verstärktes Auswachsen, Änderung der Wachstumsrichtung bzw. Zurückziehen erfordert dynamische Veränderungen im Zytoskelett, bei dem sich F-Aktin-Ansammlung in den Filopodien und retrograder Aktin-Filamentfluss die Wage halten (Lin and Forscher, 1993; Lin and Forscher, 1995; Suter and Forscher, 1998; Mallavarapu and Mitchison, 1999). Außerdem haben die Wachstumskegel und Axone die funktionale Voraussetzung für die Synthese und Degradierung von Proteinen (Davis et al., 1992; Campbell and Holt, 2001; Job and Eberwine, 2001). Untersuchungen an retinalen Wachstumskegeln zeigten, dass die Wegfindungsmoleküle Semaphorin 3A und Netrin-1 schnelle lokale Veränderungen in der Proteinexpression bzw. in der Protein-Degradierung auslösen, welche sowohl für das richtungsorientierte Auswachsen der Axone als auch für den Semaphorin 3A-induzierten Wachstumskegelkollaps wichtig sind (Campbell and Holt, 2001). Auch für spinale Axone, die entlang eines Chemogradienten auswachsen, ist nach der Adaption an das Wegfindungssignal die lokale Protein-Synthese wichtig für die Re-Sensitivierung der Wachstumskegel bei einer erneuten Konzentrationsveränderung (Ming et al., 2002).

Welche Signalwege und Proteine letztlich *in vivo* bei den Signaltransduktionsmechanismen im Wachstumskegel, vom Erkennen des Signals bis zur Reaktion auf dieses, eine Rolle spielen ist noch weitgehend unverstanden. Kandidaten sind insbesondere Proteine, die entweder direkt oder indirekt das Aktin-Zytoskelett beeinflussen können, wie z.B. kleine Guanosintriphosphat (GTP)-bindende Proteine der Rho-Unterfamilie, die in verschiedene Signalwege involviert sind sowie Myosine, welche u.a. den retrograden Aktinfilamentfluss regulieren (Lin et al., 1996; Mueller, 1999; Hall and Nobes, 2000; Dickson, 2002). Auch die Ena/VASP-Proteine sind als Regulatoren des Aktin-Zytoskeletts bekannt und vermitteln z.B. das durch Netrin-1 induzierte, filopodiale Auswachsen hippocampaler Neurone (Bear et al., 2002; Lebrand et al., 2004). Die wichtige regulatorische Funktion der zyklischen Nukleotide auf das Antwortverhalten des Wachstumskegels lässt zudem eine Involvierung cAMP- und cGMP-induzierter Signalwege vermuten.

1.2. cGMP

cGMP ist ein weit verbreiteter sekundärer Botenstoff, der seine zellulären und physiologischen Effekte durch mindestens drei Klassen von Rezeptorproteinen vermittelt: den cGMP-abhängigen Proteinkinasen I und II (cGK's), den durch zyklische Nukleotide gesteuerten Kationenkanälen (CNG-Kanäle) und den cGMP-regulierten Phosphodiesterasen (PDEs). cGMP kann sowohl durch lösliche als auch partikuläre Guanylatzyklen aus Guanosintriphosphat (GTP) generiert werden (Abb. 1). Die lösliche Guanylatzyklase (sGC) wird durch Stickstoffmonoxid (NO) aktiviert, welches wiederum aus L-Arginin unter Katalyse der Familie der NO-Synthasen (NOS) gebildet wird. Die membranständigen, so genannten partikulären Guanylatzyklen (pGC), von denen sieben verschiedene (pGC-A bis pGC-G) bekannt sind, werden durch Bindung natriuretischer Peptide wie ANP, BNP und CNP (*atrial, brain and C-type natriuretic peptides*) oder durch Guanylin aktiviert (Lucas et al., 2000).

Zum einen öffnet cGMP CNG-Kanäle, welche z.B. in den Photorezeptorzellen der Retina und in olfaktorischen Neuronen essentiell für die Signalübertragung in diesen sensorischen Systemen sind, aber auch in anderen neuronalen Zellen eine Rolle spielen (Kaupp and Altenhofen, 1992; Kaupp and Seifert, 2002). Außerdem ist cGMP in der Lage durch Aktivierung bzw. Inhibierung verschiedener PDEs die cAMP-Konzentration zu beeinflussen. Die Inhibierung der cAMP-spezifischen PDE3 führt z.B. zu einer Erhöhung des intrazellulären cAMP-Spiegels, hingegen führt die Aktivierung der PDE2 durch cGMP zu einer Abnahme der intrazellulären cAMP-Konzentration. Die Phosphodiesterasen sind auch

für die Degradierung von cGMP und cAMP verantwortlich. Zyklisches GMP wird z.B. von den cGMP-hydrolysierenden PDEs 1b, 5, 6 und 9 abgebaut, die dadurch Dauer und Amplitude des cGMP Signals regulieren (Beavo et al., 1994; Sonnenburg and Beavo, 1994; Rybalkin et al., 2002; Shimizu-Albergine et al., 2003). Schließlich aktiviert cGMP die cGMP-abhängigen Kinasen, die eine Vielzahl der cGMP-induzierten Prozesse vermitteln.

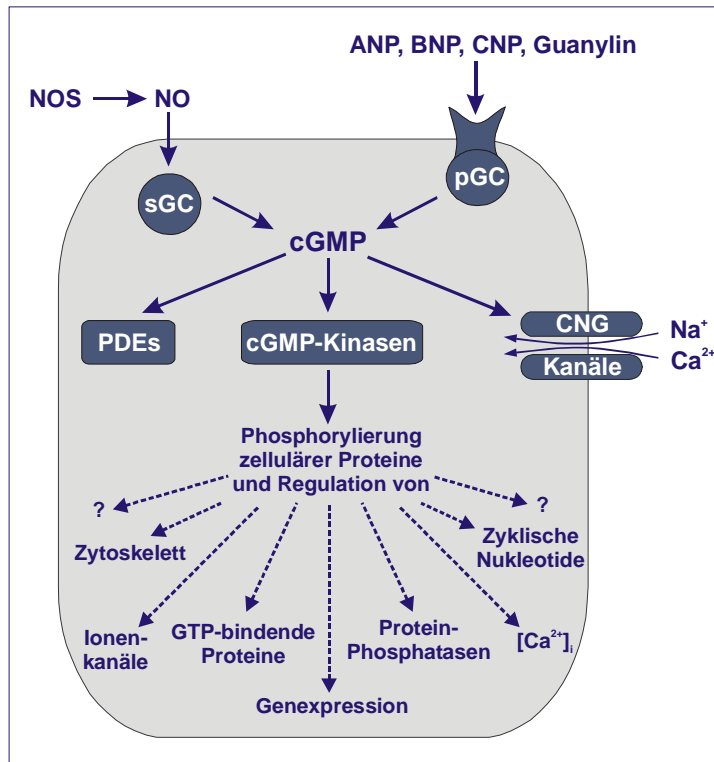


Abb. 1: Schematische Darstellung des cGMP/cGK-Signalwegs

Das Modell verdeutlicht die zwei bekannten Signalwege, die über die Aktivierung zwei verschiedener Typen von Guanylatzyklasen, zur Bildung von cGMP führen. Die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase (sGC) erfolgt über Stickstoffmonoxid (NO), welches selber durch NO-Synthasen (NOS) gebildet wird. Die Aktivierung der partikulären Guanylatzyklasen (pGC) erfolgt hingegen je nach Rezeptor durch verschiedene natriuretische Peptide wie ANP, BNP und CNP. Die Erhöhung der cGMP-Konzentration durch die Guanylatzyklasen kann je nach Zelltyp zur Aktivierung von CNG-Kanälen, zur Regulation von Phosphodiesterasen (PDEs) bzw. zur Aktivierung der cGMP-abhängigen Kinasen (cGKs) führen. Die Phosphorylierung verschiedener zellulärer Proteine durch die cGKs vermittelt verschiedene physiologische Funktionen von cGMP.

1.3. cGMP-abhängige Proteinkinasen

Die cGMP-abhängige Proteinkinase (cGK) wurde 1970 in der Muskulatur von Arthropoden entdeckt und konnte inzwischen in verschiedenen Invertebraten und Vertebraten identifiziert werden (Kuo and Greengard, 1970; Pfeifer et al., 1999).

In Säugetieren kodieren zwei verschiedene Gene für die cGMP-abhängigen Proteinkinasen, cGKI und cGKII (Hofmann and Sold, 1972; Uhler, 1993). Für den N-Terminus der cGKI kodieren zwei alternativ gespleißte Exone, wodurch die beiden Isoformen cGKI α und cGKI β entstehen (Wernet et al., 1989). cGKI und cGKII sind Homodimere, deren monomere Untereinheiten eine molare Masse von ~76 kD (cGKI) bzw. ~86 kD (cGKII) aufweisen. Die cGMP-abhängigen Proteinkinasen gehören zur Familie der Serin/Threonin-Kinasen und sind aus einer N-terminalen-, einer regulatorischen- und einer katalytischen Domäne aufgebaut. Dem N-Terminus werden folgende Funktionen zugeordnet: a) Dimerisierung der zwei monomeren Untereinheiten durch eine im N-Terminus lokalisierte

Leucinreißverschlussregion, b) Inhibierung der katalytischen Domäne in Abwesenheit von gebundenem cGMP, c) Autophosphorylierung, welche die katalytische Aktivität der Kinase steigern kann und deren Affinität für cAMP erhöht, d) Affinität der cGMP-Bindungsstellen sowie e) die intrazelluläre Lokalisierung des Enzyms. Die regulatorische Domäne enthält zwei cGMP-Bindungsstellen. Die Bindung von cGMP an beiden Bindungsstellen dieser Domäne führt zu einer Konformationsänderung, die zur Aufhebung der durch den N-Terminus bewirkten Inhibierung des katalytischen Zentrums führt und damit die Kinase von einem inaktiven in einen aktiven Zustand überführt, was schließlich die enzymatische Phosphorylierung des Substratproteins an den Aminosäuren Serin bzw. Threonin erlaubt (Abb. 2). Die katalytische Domäne enthält sowohl die Bindungsstelle für Mg^{2+} -ATP als auch für das Substratprotein und katalysiert die Übertragung des γ -Phosphates des ATP auf einen Serin bzw. Threonin-Rest des Substratproteins (Francis and Corbin, 1994a; Francis and Corbin, 1994b; Lohmann et al., 1997; Ruth et al., 1997; Pfeifer et al., 1999; Hofmann et al., 2000; Feil et al., 2005). Sowohl die cGKI als auch die cGKII werden im Nervensystem exprimiert. Für detailliertere Angaben zur Expression beider Kinasen wird auf die Kapitel 3.1. und 4.1. verwiesen.

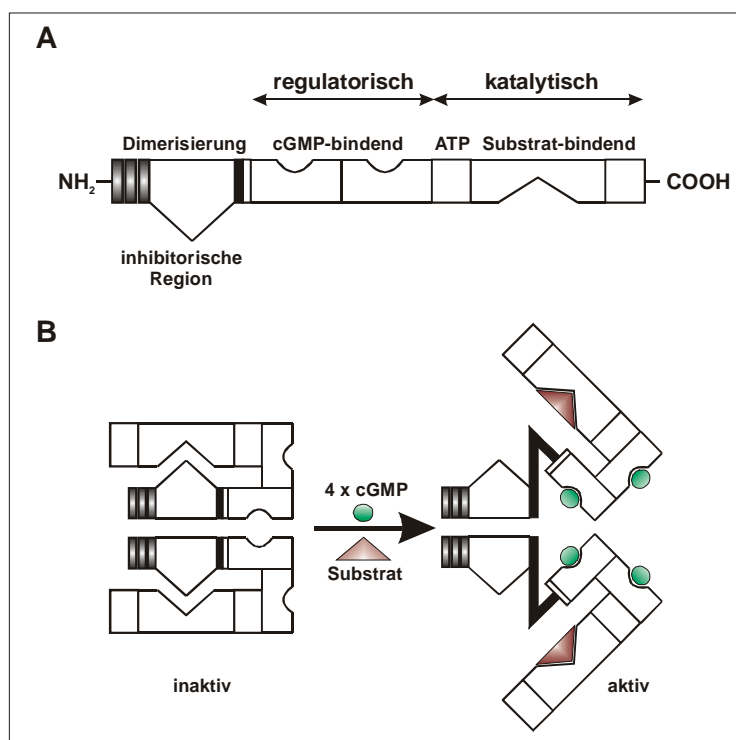


Abb. 2: Schematische Darstellung der Domänenstruktur der cGMP-abhängigen Proteinkinase

A: Der N-Terminus enthält neben einer Leucinreißverschlussregion, welche für die Dimerisierung der zwei monomeren Untereinheiten verantwortlich ist, eine Region, die in Abwesenheit von gebundenem cGMP inhibitorisch auf die katalytischen Domäne wirkt. Die regulatorische Domäne enthält die zwei Bindungsstellen für cGMP. Die katalytische Domäne enthält sowohl die Bindungsstelle für Mg^{2+} -ATP als auch für das Substratprotein. **B:** Die Bindung von vier cGMP-Molekülen führt zu einer Konformationsänderung, welche zur Aufhebung der durch den N-Terminus bewirkten Inhibierung des katalytischen Zentrums führt. Die Kinase wird damit von einem inaktiven in einen aktiven Zustand überführt, was schließlich die enzymatische Phosphorylierung des Substratproteins erlaubt.

1.4. Substrate und Funktion der cGKI im Nervensystem

Die katalytische Funktion der cGKI ist in vieler Hinsicht der der cAK ähnlich. Beide Enzyme transferieren das γ -Phosphat des ATP auf einen Serin- bzw. Threonin-Rest des Substratproteins. Der phosphorylierte Aminosäurerest ist gewöhnlich in einer typischen Konsensussequenz **RRXS/TX** bzw. **RKXS/TX** angeordnet, mit zwei N-terminalen Argininresten bzw. einem Arginin- und Lysinrest, gefolgt von einer beliebigen Aminosäure und schließlich dem Serin- bzw. Threoninrest. Die meisten der bislang identifizierten Substrate der cGKI enthalten diese so genannte cAK/cGK-spezifische Phosphorylierungskonsensussequenz, (Glass and Krebs, 1979; Tegge et al., 1995; Pfeifer et al., 1999). Neben der Konsensussequenz spielen jedoch noch andere, z.T. unbekannte Faktoren bei der Substratspezifität der cGKI eine Rolle. Insbesondere die N-terminale Domäne, in der sich beide cGKI-Isoformen unterscheiden, scheint für die subzelluläre Lokalisation der Kinasen und deren unterschiedliche Substratspezifität wichtig zu sein. Die meisten der bisher bekannten Substrate der cGKI wurden in nicht-neuronalem Gewebe wie glatter Muskulatur, Blutplättchen, Lunge und Herz identifiziert. Einige dieser Proteine oder deren Isoformen werden jedoch auch im Nervensystem exprimiert. Als erstes neuronales Substrat der cGKI konnte das G-Substrat in den Purkinje-Zellen des Cerebellums beschrieben werden (Aswad and Greengard, 1981), einige andere sind im Laufe der Jahre hinzugekommen. Insgesamt lassen sich die Substrate der cGKI grob in verschiedene funktionale Gruppen einteilen (Abb. 1), welche an der Regulation von Ionenkanälen, zyklischen Nukleotiden, des Zytoskeletts, Proteinphosphatasen, der intrazellulären Kalziumkonzentration, GTP-bindender Proteine und der Genexpression beteiligt sind (Wang and Robinson, 1997; Pilz and Casteel, 2003). Bislang konnte jedoch nur für wenige der *in vitro* identifizierten Substrate der cGKI auch eine physiologisch relevante Funktion *in vivo* gezeigt werden. Für ein besseres Verständnis der physiologischen Funktion der cGKI wurden cGKI-defiziente Mäuse (cGKI-KO-Mäuse) generiert sowie Gewebe-spezifische Mutanten, in denen das cGKI-Gen in bestimmten Zelltypen des Hippocampus und des Cerebellums inaktiviert wurde. Im Gegensatz zu den konditionellen cGKI-KO-Mäusen haben die konventionellen cGKI-KO-Mäuse eine reduzierte Lebensspanne, 50 % der Mäuse werden nicht älter als 5-6 Wochen. Die Tiere zeigen diverse kardiovaskuläre und gastrointestinale Defekte (Pfeifer et al., 1998; Feil et al., 2003b; Schlossmann et al., 2005). Bezüglich des Nervensystems konnten in den cGKI-defizienten Mäusen Wegfindungsfehler sensorischer Axone im Rückenmark beobachtet werden, eine reduzierte Nozizeption sowie migratorische Defekte kortikaler Pyramidenzellen (Schmidt et al., 2002; Tegeder et al., 2004; Demyanenko

et al., 2005). Die lokale Defizienz der cGKI in den Pyramidenzellen des Hippocampus führte in adulten Tieren zur Beeinträchtigung der Protein-Synthese-abhängigen Langzeitpotenzierung, während die Abwesenheit der cGKI in den Purkinje Zellen adulter, konditioneller KO-Tiere zu einer Störung der Langzeitdepression führte (Kleppisch et al., 2003; Feil et al., 2003a).

1.5. Funktion der cGKI in der Wegfindung sensorischer Axone

Wie bereits erwähnt, konnten *in vitro*-Untersuchungen zeigen, dass eine Erhöhung der intrazellulären cGMP-Konzentration zu einer Aufhebung der repulsiven Wirkung von Semaphorin 3A auf Wachstumskegel spinaler Axone führt (Song et al., 1998). Diese Experimente zu Grunde legend untersuchten Schmidt und Kollegen die Wirkung von cGMP an Spinalganglienaxonen cGKI-defizienter Mäuse, welche im Wildtyp die cGKI α exprimieren. Während im Wildtyp Semaphorin 3A zum Kollabieren der Wachstumskegel führte und die Erhöhung der cGMP-Konzentration dies verhinderte, kollabierten die Wachstumskegel der cGKI-defizienten-Spinalganglienaxone sowohl bei Semaphorin 3A-Zugabe als auch bei Erhöhung der cGMP-Konzentration (Schmidt et al., 2002). Das legte den Schluss nahe, dass die Schutzfunktion vor dem Kollabieren der Wachstumskegel letztendlich durch die aktivierte cGKI α vermittelt wird und die Kinase vermutlich während der axonalen Wegfindung bei der Signaltransduktion im Wachstumskegel beteiligt ist. *In vivo* Untersuchungen der zentralen Projektion der Spinalganglienaxone in cGKI-defizienten Embryonen, konnten schließlich eine Funktion der cGKI α bei der axonalen Wegfindung bestätigen. Während der Embryonalentwicklung wachsen die Axone der sensorischen Spinalganglienneurone Richtung Rückenmark aus. Dort angekommen verzweigen sie sich T-förmig in einen caudalen und rostralen Ast und bilden den dorsalen Funiculus. Innerhalb des dorsalen Funiculus wachsen sie über mehrere Segmente in longitudinale Richtung, bevor sie nach einer Warteperiode von ca. 48 Stunden Kollaterale in spezifische Schichten der grauen Substanz des Rückenmarks entsenden (Ozaki and Snider, 1997). In cGKI-defizienten Embryonen konnte mit DiI-Markierungen und Antikörperfärbungen gegen trkA („tropomyosin related kinase A“, ein Marker für nozizeptive Neurone) eine Störung der T-förmigen Verzweigung in einen caudalen und rostralen Ast festgestellt werden, wobei sowohl Axone beobachtet wurden, welche entweder in rostrale oder caudale Richtung wuchsen als auch Axone, welche eine Art überschießendes Wachstum in Richtung Zentralkanal zeigten und direkt in die graue Substanz wuchsen (Schmidt et al., 2002). Die Abb. 3 zeigt eine schematische Zusammenfassung der Wegfindungsfehler.

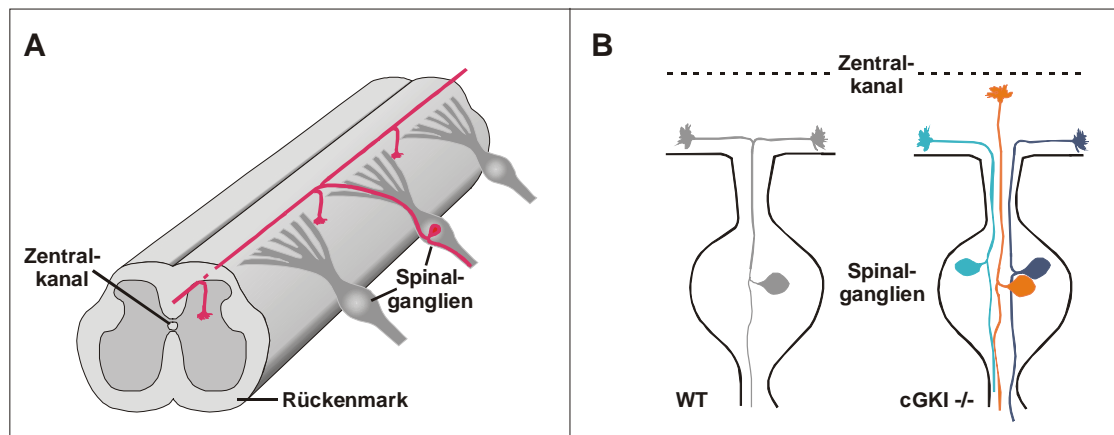


Abb. 3: Schematische Darstellung der zentralen Projektion sensorischer Spinalganglienaxone

A: Die zentrale Projektion eines einzelnen Spinalganglienneurons ist in rot dargestellt. Nach Eintritt des Axons ins Rückenmark, verzweigt es sich T-förmig in einen caudalen und rostralen Ast und wächst über mehrere Segmente in longitudinale Richtung. Nach einer Warteperiode bildet es Kollateralen aus, die schichtspezifisch in die graue Substanz des Rückenmarks projizieren. **B:** Vergleich der Zentralprojektion der Spinalganglien im WT mit der im cGKI-KO. Die Spinalganglienaxone im WT verzweigen sich im dorsalen Funiculus T-förmig in einen caudalen und rostralen Ast. Hingegen ist bei den cGKI-defizienten Spinalganglienaxonen die T-förmige Verzweigung gestört und die Axone wachsen entweder in caudale oder rostrale Richtung bzw. direkt Richtung Zentralkanal.

Die Spinalganglien der Vertebraten enthalten die Zellkörper verschiedener sensorischer Neuronenpopulationen, die mechanosensorische, nozizeptive oder propriozeptive Signale aus der Körperperipherie erhalten und diese ins Zentralnervensystem weiterleiten. Die verschiedenen Zellpopulationen projizieren in spezifische Schichten des Rückenmarks, wo sie auf andere Neurone verschaltet werden. Die cGKI α wird sowohl von nozizeptiven als auch von propriozeptiven Neuronen exprimiert. Die Wegfindungsfehler im KO führten zu einer deutlichen Reduktion dieser Axonpopulationen im dorsalen Funiculus und der Kollateralen in den entsprechenden Schichten im Rückenmark. Des Weiteren konnte in postnatalen KO-Tieren eine Störung in der Nozizeption festgestellt werden (Schmidt et al., 2002; Tegeder et al., 2004)

1.6. Aufgabenstellung

Wie oben ausgeführt, konnten Mitglieder unserer Arbeitsgruppe eine Beteiligung der cGKI α an der Wegfindung sensorischer Spinalganglienaxone zeigen. Bislang ist jedoch nichts über den von der cGKI α vermittelten Signalweg in diesen Neuronen bekannt, d.h. welche Substrate der cGKI α an der Wegfindung der Spinalganglienaxone beteiligt sein könnten und ob deren beeinträchtigte Funktion, bei Abwesenheit der cGKI α , zu den Wegfindungsfehlern beitragen würde. Des Weiteren ist unklar ob die cGKI α auch in anderen sensorischen Axonsystemen für deren korrekte Wegfindung essentiell ist. Schließlich ist die Identifizierung

bekannter und unbekannter Substrate der cGKI α sowohl in den Spinalganglienneuronen als auch in anderen Neuronenpopulationen interessant, um die Funktion der Kinase im Nervensystem besser verstehen zu können. In dieser Arbeit sollen daher folgende Schwerpunkte bearbeitet werden:

- a) nähere Charakterisierung der Expression der cGKI α im embryonalen und postnatalen Nervensystem mit isoformspezifischen Antikörpern
- b) Analyse diverser cGKI α -positiver Strukturen auf mögliche Wegfindungsfehler in cGKI-defizienten Mäusen
- c) Untersuchung von potentiellen Substraten der cGKI α hinsichtlich einer Beteiligung an den Wegfindungsfehlern der sensorischen Spinalganglienaxone (Analyse der entsprechenden KO-Mäuse und Phosphorylierungsstudien)
- d) Suche nach neuen bzw. bekannten Substraten der cGKI bzw. der cGKI α im Nervensystem mit Hilfe der Zweidimensionalen Gelelektrophorese (Vergleich der Proteinexpression und des Phosphorylierungsmusters im Cerebellum cGKI-defizienter und WT-Mäuse) und dem Zweihybriden Hefesystem (Suche nach Interaktionspartnern der cGKI α mit Hilfe einer embryonalen cDNA-Bibliothek)