

4. Diskussion

Frühere *in vitro* Studien identifizierten zyklische Nukleotide, wie cAMP und cGMP, als wichtige Modulatoren des axonalen Wachstums- und Lenkungsverhalten (Song et al., 1997; Ming et al., 1997; Song et al., 1998; Nishiyama et al., 2003). Die cGKI α als cGMP-Rezeptorprotein konnte *in vitro* diese Effekte vermitteln und ist *in vivo* essentiell für das korrekte Wachstum sensorischer Spinalganglienneurone im Rückenmark (Schmidt et al., 2002). Um mehr über die Funktion der cGKI α beim axonalen Wachstum sensorischer Neurone zu erfahren, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Expression der cGKI α im embryonalen und postnatalen Nervensystem näher untersucht. Des Weiteren wurden einige ausgewählte cGKI α -immunpositive Strukturen in cGKI-defizienten Mäusen hinsichtlich möglicher Wachstumsfehler untersucht.

Im Folgenden sollen einige der aus diesen Untersuchungen gewonnenen Informationen mit Literaturdaten verglichen und hinsichtlich einer möglichen Funktion der Kinase diskutiert werden.

4.1. Expression der cGMP-abhängigen Kinasen im Nervensystem

Obwohl es bereits Untersuchungen zur mRNA- und Protein-Expression der cGKI und cGKII im Nervensystem gibt, differenzieren diese häufig nicht die Isoformen der cGKI. Durch die Entwicklung isoformspezifischer Antikörper durch Keilbach und Kollegen und durch die Untersuchung hauptsächlich nicht-neuraler Gewebe wurde deutlich, dass die cGKI α und cGKI β ein doch recht unterschiedliches Expressionsmuster aufweisen (Keilbach et al., 1992). Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die bisher beschriebene Expression der cGKI und cGKII im Nervensystem der Ratte und der Maus, inklusive der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse.

Lokalisation	Tierart	Alter	Typ/Isoform	Referenz
Cerebellum	Ratte	E17-E20, P0-P3, P5, adult	cGKI	(Lohmann et al., 1981; Wassef and Sotelo, 1984; Qian et al., 1996)
	Ratte	adult	cGKI α	(Keilbach et al., 1992)
	Maus	adult	cGKI α	(Geiselhoringer et al., 2004; Feil et al., 2005)
	Maus	P0-adult	cGKI α	<i>diese Arbeit</i>
	Ratte	adult	cGKII (mRNA) cGKII	(El Hussein et al., 1995; El Hussein et al., 1998; de Vente et al., 2001)

Lokalisation	Tierart	Alter	Typ/Isoform	Referenz
Hippocampus	Ratte	P1, adult	cGKI	(Qian et al., 1996; Arancio et al., 2001)
	Maus	adult	cGKI (mRNA) cGKI	(Kleppisch et al., 1999; Feil et al., 2005)
	<i>Maus</i>	<i>P0-adult</i>	<i>cGKIα</i>	<i>diese Arbeit</i>
	Maus	adult	cGKI β (mRNA)	(Geiselhoringer et al., 2004)
	Ratte	adult	cGKII (mRNA) cGKII	(El Husseini et al., 1995; de Vente et al., 2001)
	Maus	adult	cGKII (mRNA) cGKII	(Kleppisch et al., 1999)
Cortex	Maus	E13,5; E14,5; E17,5; P0, P28	cGKI	(Demyanenko et al., 2005)
	<i>Maus</i>	<i>P0-P32</i>	<i>cGKIα</i>	<i>diese Arbeit</i>
	Maus	adult	cGKI α	(Feil et al., 2005)
	Maus	adult	cGKI β	(Feil et al., 2005)
	Ratte	adult	cGKII (mRNA) cGKII	(El Husseini et al., 1995; El Husseini et al., 1998; de Vente et al., 2001)
	Maus	adult	cGKII (mRNA)	(Geiselhoringer et al., 2004)
Thalamus	Ratte	adult	cGKI	(El Husseini et al., 1999; Revermann et al., 2002)
	Ratte	adult	cGKII (mRNA) cGKII	(El Husseini et al., 1995; El Husseini et al., 1998; de Vente et al., 2001)
	Maus	adult	cGKII (mRNA)	(Geiselhoringer et al., 2004)
Hypothalamus	Maus	adult	cGKI	(Feil et al., 2005)
	<i>Maus</i>	<i>P0-P32</i>	<i>cGKIα</i>	<i>diese Arbeit</i>
	Ratte	adult	cGKII (mRNA) cGKII	(El Husseini et al., 1995; de Vente et al., 2001)
	Maus	adult	cGKII (mRNA) cGKII	(Oster et al., 2003)
Bulbus olfactorius	<i>Maus</i>	<i>E13,5; P0-adult</i>	<i>cGKIα</i>	<i>diese Arbeit</i>
	Maus	adult	cGKI β (mRNA) cGKI β	(Geiselhoringer et al., 2004; Feil et al., 2005)
	Ratte	adult	cGKII (mRNA) cGKII	(El Husseini et al., 1995; El Husseini et al., 1998; de Vente et al., 2001)
	Maus	adult	cGKII (mRNA)	(Geiselhoringer et al., 2004)
Spinalganglien und Spinalnerven	Ratte	E15, adult	cGKI	(Qian et al., 1996)
	<i>Maus</i>	<i>E10-E15</i>	<i>cGKIα</i>	(Schmidt et al., 2002), <i>diese Arbeit</i>
Rückenmark (Laminae I und II)	Ratte	E15, adult	cGKI	(Qian et al., 1996)
	Maus	adult	cGKI	(Tegeger et al., 2004)
	<i>Maus</i>	<i>E10-E15</i>	<i>cGKIα</i>	(Schmidt et al., 2002), <i>diese Arbeit</i>

Lokalisation	Tierart	Alter	Typ/Isoform	Referenz
Präganglionäre Neurone	<i>Maus</i>	<i>E13, E14</i>	<i>cGKIα</i>	(Schmidt et al., 2002), <i>diese Arbeit</i>
Tractus spinalis nervi trigemini	Ratte	E16-E19	cGKI	(Wassef and Sotelo, 1984)
	Maus	adult	cGKI	(Feil et al., 2005)
	<i>Maus</i>	<i>E13,5</i>	<i>cGKIα</i>	<i>diese Arbeit</i>
	Ratte	adult	cGKII	(de Vente et al., 2001)
Hirnnerven III-XII				
Zellen und Fasern des Hirnnerven VIII	Ratte	E16-E19	cGKI	(Wassef and Sotelo, 1984)
Tractus mesencephalicus n. trigemini (Zellen und Fasern)	Ratte	E16 bis P15	cGKI	(Wassef and Sotelo, 1984)
	<i>Maus</i>	<i>E9,5-E13,5</i>	<i>cGKIα</i>	<i>diese Arbeit</i>
Zellen und Fasern der Hirnnerven III, V, VII, VIII, IX, X, XI	<i>Maus</i>	<i>E9,5-E13,5</i>	<i>cGKIα</i>	<i>diese Arbeit</i>
Diverse Kerne der Hirnnerven V, VII, VIII, IX, X, XI, XII	Ratte	adult	cGKII	(de Vente et al., 2001)
Notochord (Chorda dorsalis)	<i>Maus</i>	<i>E9,5-E14</i>	<i>cGKIα</i>	<i>diese Arbeit</i>
Neurone im Plexus myentericus und Plexus submucosus	Ratte	adult	cGKI	(Huber et al., 2000; Salmhofer et al., 2001)
Retina	Maus	adult	cGKI cGKI α (mRNA) cGKI β (mRNA)	(Gamm et al., 2000; Snellman and Nawy, 2004; Feil et al., 2005)
	<i>Maus</i>	<i>P3, P11, P22</i>	<i>cGKIα</i>	<i>diese Arbeit</i>
	Maus	adult	cGKII (mRNA)	(Gamm et al., 2000)

4.1.1. Hirnnerven

In dieser Arbeit konnte in Ganzkörperfärbungen von Embryonen eine Expression der cGKI α in den Zellen und Fasern der Hirnnerven III, V, VII, VIII, IX, X und XI gezeigt werden (siehe Kap. 3.1.1.1.). Keine Expression der Kinase wurde in den Hirnnerven IV und XII detektiert. Über eine Expression im Hirnnerven VI konnte keine Aussage getroffen werden, da dieser mit dieser Methode nicht lokalisiert werden konnte.

Die Ganglien der Hirnnerven III-XII gehören wie die ebenfalls cGKI α -positiven Spinalganglien zu den kraniospinalen Ganglien, welche pseudounipolare Nervenzellen besitzen. Eine Ausnahme bilden die Ganglien des N. vestibulocochlearis, mit bipolaren Nervenzellen. Eine eindeutige Zuordnung, welche Fasertypen der Hirnnerven die cGKI α exprimieren, war mit der Färbung nicht möglich und erfordert aufgrund der meist gemischten Nerven Doppelfärbungen mit geeigneten Markern für die jeweiligen Fasertypen. Tendenziell wurden, wie auch in den Spinalganglien (siehe Kap. 4.1.2.), eher sensorische (somatoafferente und viszeroafferente) Fasern des nozizeptiven bzw. propriozeptiven Typus gefärbt als

motorische Fasern und innerhalb der motorischen Fasern eher viszeroefferente Fasern als somatoefferente Fasern. So konnte die cGKI α nicht in den als vorwiegend motorisch geltenden Hirnnerven IV (N. trochlearis) und XII (N. hypoglossus), welche die Augenmuskulatur bzw. die Zungenmuskulatur somatoeffe­rent innervieren, detektiert werden. Andererseits wurde die Kinase im ebenfalls motorischen Nerven XI (N. accessorius) exprimiert, der jedoch hauptsächlich viszeroefferente Fasern enthält. Auch der Nerv III (N. oculomotorius), der wie Nerv IV und VI zu den motorischen Augenmuskelnerven zählt, war cGKI α immunpositiv, führt aber neben somatomotorischen Fasern auch viszeroefferente Fasern. Eine Expression der cGKI in viszeroeffe­renten Neuronen wurde bereits im vegetativen Nervensystem im Sympathikus (präganglionäre Neurone) und im Darmnervensystem (Plexus myentericus) beschrieben und könnte daher auch im Zentralnervensystem gültig sein (Salmhofer et al., 2001; Schmidt et al., 2002).

Beispiele für cGKI α -positiv detektierte sensorische Nerven sind der vorwiegend afferente Sinnesnerv VIII (Gleichgewichts- und Hörnerv) und der relativ wenige somatomotorische Anteile enthaltene Trigeminusnerv (V), mit seinen rein sensiblen Anteilen des N. ophthalmicus und N. maxillaris. Ebenfalls zum Trigeminussystem gehörend und cGKI α -immunpositiv waren der Tractus spinalis nervi trigemini, welcher die absteigenden Axone der ersten Neurone des Ganglion trigeminale enthält und der Weiterleitung der Schmerz- und Temperaturempfindung dient sowie Zellen und Fasern des Nucleus bzw. Tractus mesencephalicus n. trigemini, die für die Leitung propriozeptiver Signale, vor allem von den Muskelspindeln des Kauapparates verantwortlich sind. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass neben dem Gleichgewichts- und Hörnerv (Nerv VIII) und dem Nerv III alle zu den Branchialnerven gehörenden Hirnnerven (V, VII, IX, X und Teile von XI) cGKI α -positiv waren. Letztere innervieren die aus den Anlagen der Branchialbögen stammenden Muskeln, sowie äußere Haut und Schleimhaut des Kopfdarms.

Die Expression in den Hirnnerven I und II ließ sich in Ganzkörperfärbungen ebenfalls schlecht auswerten und wurde in Schnitten näher untersucht. Beide Nerven sind Abkömmlinge des Vorderhirns und reine Sinnesnerven und unterscheiden sich somit von den anderen Hirnnerven. In dieser Arbeit konnte eine Expression der cGKI α nur im Riechnerv (Nerv I) detektiert werden, jedoch nicht im Sehnerv (Nerv II). Eine Expression der cGKI β konnte in den untersuchten Altersstadien nicht in den Hirnnerven III-XII detektiert werden, demnach ist auch hier, wie in den Spinalganglien, die α -Isoform die vorherrschende cGKI.

Eine Expression der cGKI im Nerv VIII (N. vestibulocochlearis) sowie im Tractus spinalis nervi trigemini und Tractus mesencephalicus n. trigemini konnte bereits von Wassef und

Sotelo in Ratten der Embryonalstadien E16-E19 gezeigt werden (Wassef and Sotelo, 1984). Auch die cGKII wurde in adulten Ratten in einigen Hirnnervenkernen der Nerven V, VII, VIII, IX, X, XI und XII beobachtet, sowohl in sensorischen (wie z.B. dem Nucleus mesencephalicus n. trigemini) als auch in vielen motorischen Kernen (de Vente et al., 2001).

Die vergleichenden Untersuchungen der Hirnnerven in cGKI-defizienten Embryonen vs. Wildtyp-Embryonen mit Neurofilament-Ganzkörperfärbungen zeigten keine morphologischen Unterschiede (siehe Kap. 3.2.3.) in den Hirnnerven bei Abwesenheit der cGKI. Aufgrund der beschriebenen Expression der cGKII in einigen Hirnkernen adulter Tiere, wäre evtl. eine Untersuchung von cGKI/cGKII-defizienten Mäusen sinnvoll.

4.1.2. Spinalganglien und Rückenmark

Eine Expression der cGKI bzw. cGKI α in nozizeptiven und propriozeptiven Neuronen der Spinalganglien und deren Axonen und Kollateralen in den Laminae I und II des Rückenmarks wurde bereits in früheren Arbeiten gezeigt (Qian et al., 1996; Schmidt et al., 2002). Auch in den Spinalganglien des Medaka-Fisch konnte die cGKI-mRNA detektiert werden (Yamamoto et al., 2003).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Expression der cGKI α in Ganzkörperfärbungen zuerst im Alter E10 in den zervikalen Spinalganglien detektiert werden, weitete sich aber in den folgenden Entwicklungsstadien auf weiter caudal gelegene Spinalganglien aus. Auch die peripheren Spinalnerven, die u.a. die Extremitäten innervieren, exprimierten die Kinase. Der motorische Anteil der Spinalnerven wurde kaum gefärbt, wie vergleichende Färbungen gegen Neurofilament zeigten; auch in Querschnitten des Rückenmarks zeigte die ventrale Wurzel eine deutlich geringere Färbung der Kinase. Einige Motoneurone im Rückenmark exprimieren jedoch die cGKI α (Schmidt et al., 2002).

Der von Schmidt und Kollegen in cGKI-defizienten Mäusen gezeigte Wegfindungsfehler der trkA-immunpositiven nozizeptiven Spinalganglienzellen im dorsalen Funiculus des Rückenmarks konnte auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Ganzkörperfärbungen der Embryonen mit Antikörpern gegen Neurofilament beobachtet werden (siehe Kap. 3.2.1.). Einige Unklarheiten bestehen jedoch noch bei der Art der Störung der T-förmigen Verzweigung der Axone in einen rostralen und caudalen Ast. Von Schmidt und Kollegen durchgeführte DiI-Markierungen der Spinalganglienneurone zeigten eine tendenzielle Präferenz der gefärbten Fasern innerhalb des Hinterstranges in rostrale Richtung zu wachsen (Schmidt et al., 2002). Die Neurofilament-Färbungen der Spinalganglienneurone in dieser

Arbeit konnten innerhalb eines Spinalganglions sowohl Axone von Neuronen färben, die tendenziell mehr nach rostral wuchsen als auch Fasern, die hauptsächlich in caudale Richtung wuchsen. Einzelzellmarkierungen mit Farbstoffen könnten helfen, den Fehler genauer zu charakterisieren. Sowohl DiI-Markierungen als auch Neurofilament-Färbungen der Spinalganglienneurone erlauben jedoch keine genaue Differenzierung der Fasersubtypen innerhalb der Spinalganglien. Versuche, die Spinalganglien mit trkA-Ganzkörperfärbungen zu untersuchen, waren aufgrund der starken Hintergrundfärbung wenig aussagekräftig und wurden daraufhin verworfen. Weiterhin wurde in dieser Arbeit die periphere Innervation der Extremitäten und des Rumpfes durch die Spinalnerven in cGKI-defizienten und Wildtyp Mäusen verglichen (siehe Kap. 3.2.2.). In den untersuchten Altersstadien konnten keine Unterschiede zwischen KO und WT in der peripheren Projektion der Spinalnerven festgestellt werden. Die Abwesenheit der cGKI beeinträchtigt daher offensichtlich nur die zentrale Projektion der sensorischen Spinalganglienneurone.

Eine funktionale Rolle der cGKI α bei der Nozizeption konnte durch elektrophysiologische Untersuchungen und Verhaltenstests an cGKI-defizienten Mäusen gezeigt werden. Schmidt und Kollegen fanden in frühen Postnatalstadien cGKI-defizienter Mäuse eine Reduktion des nozizeptiven Reflexverhaltens (Schmidt et al., 2002). Untersuchungen von Tegeder und Kollegen an 3-4 Wochen alten cGKI-defizienten Mäusen zeigten eine reduzierte Nozizeption im Formalin-Assay und eine reduzierte, durch Zymosan induzierte, inflammatorische Hyperalgesie. Die Reaktion auf taktile und thermale Reize war jedoch in den KO-Tieren nicht beeinträchtigt (Tegeder et al., 2004). Diese Ergebnisse sind stimmig mit Untersuchungen von Lewin und Walters an der Molluske *Aplysia*, die die Erforderlichkeit des NO/cGMP/cGK-Signalweges bei der durch zellschädigende Reize verursachten transkriptionsabhängigen Langzeit-Übererregbarkeit nozizeptiver, sensorischer Neurone zeigten (Lewin and Walters, 1999). Des Weiteren konnten Tegeder und Kollegen in postnatalen, cGKI-defizienten Mäusen morphologische Veränderungen in der Schichtung des Rückenmarks finden. Im Vergleich zum Wildtyp waren die Laminae I-III in den KO-Tieren deutlich schmaler ausgeprägt und enthielten weniger Neurone. Interessanterweise war die Dichte von Substanz P-positiven Neuronen und Fasern im KO signifikant reduziert. Substanz P ist ein für die Vermittlung der Schmerzempfindung wichtiges Neuropeptid nozizeptiver Nervenzellen.

4.1.2.1. Gibt es Mausmodelle die ähnliche Wegfindungsfehler sensorischer Axone aufweisen?

Eine entscheidene Rolle bei der korrekten Ausbildung der zentralen Verschaltung nozizeptiver Spinalganglienaxone spielt der Transkriptionsfaktor DRG11. DRG11 wird während der Phase des Einwachsens der nozizeptiven Neurone ins Rückenmark sowohl in den Spinalganglien als auch im Rückenmark in den entsprechenden Zielregionen (Laminae I und II) exprimiert. In DRG11-defizienten Mäusen konnte ein zeitlich verzögertes Einwachsen der nozizeptiven Fasern ins Rückenmark, deren latero-medial verschobene Verteilung im dorsalen Horn sowie eine erhöhte Anzahl von trkA-positiven Fasern, welche die Mittellinie überquerten, beobachtet werden. Im Rückenmark konnte in KO-Tieren früher Postnatalstadien in der Lamina II die Abwesenheit der Proteinkinase C γ festgestellt werden sowie in adulten Tieren eine deutliche Reduktion in der Expression von u.a. Substanz P, CGRP („Calcitonin gene-related peptide“) und Calretinin. Adulte DRG11-defiziente Tiere wiesen neben einer verminderten Anzahl von Neuronen und Fasern auch eine veränderte Morphologie im dorsalen Horn auf. Verhaltenstests zeigten für DRG11-KO-Tiere eine reduzierte Nozizeption im Formalin und Capsaicin-Assay und eine verminderte Sensitivität auf mechanische und thermale Reize (Chen et al., 2001; Patapoutian, 2001). DRG11 wiederum wird vermutlich von dem LIM-Homöobox-Gen *Lmx1b* reguliert (Ding et al., 2004).

In trkA- und NGF-defizienten Mäusen wurde der totale Verlust aller nozizeptiven Neurone in den Spinalganglien beobachtet sowie Defekte in sensorischen und sympathischen Neuronen des peripheren Nervensystems (Klein, 1994; Huang and Reichardt, 2001; Farinas et al., 2002). Für die Ausbildung der zentralen Projektion propriozeptiver Spinalganglienneurone ist Runx3, ein Transkriptionsfaktor der Runx Familie entscheidend. In Runx3-defizienten Mäusen konnte eine Störung der monosynaptischen Verbindung zwischen den propriozeptiven Afferenzen und den Motoneuronen beobachtet werden (Inoue et al., 2003). Einen ähnlichen Phänotyp zeigen Mäuse defizient für Neurotrophin 3 (NT3) oder dessen Rezeptor trkC (Klein, 1994; Farinas et al., 1994). Grund hierfür ist jedoch das Absterben der NT3-abhängigen Parvalbumin-positiven propriozeptiven Neurone, während in Runx3-KO-Mäusen kein Absterben dieser Neurone beobachtet werden konnte. Interessanterweise reguliert NT3 in propriozeptiven Neuronen die Expression von ER81, einem Mitglied der ETS-Familie von Transkriptionsfaktoren, welches ebenfalls an der Kontrolle der zentralen Verbindung der propriozeptiven Afferenzen beteiligt ist (Patel et al., 2003). In ER81-

defizienten Mäusen konnte der gleiche Defekt in der zentralen Projektion beobachtet werden, jedoch in einer etwas mildereren Form als in Runx3-KO-Tieren (Arber et al., 2000).

Als entscheidend für das Neurotrophin-abhängige Auswachsen sensorischer Axone wurde auch der NFAT-Transkriptionskomplex beschrieben. In für NFATc2, c3 und c4- defizienten Mäusen waren die sensorischen Axone der Spinalganglienneurone nicht oder nur begrenzt in der Lage ins Rückenmark einzuwachsen und den dorsalen Funiculus zu bilden (Graef et al., 2003). Eine fehlerhafte Zentralprojektion einer nicht näher identifizierten Gruppe sensorischer Spinalganglienneurone wurde auch in Noggin-defizienten Mäusen beobachtet. Ähnlich wie in der cGKI-KO-Maus, zeigten die sensorischen Axone ein in Richtung Zentralkanal überschießendes Wachstum (Dionne et al., 2002). Noggin wurde als Antagonist verschiedener BMP's („bone morphogenetic proteins“) beschrieben, der die Aktivierung der BMP-Rezeptoren durch Bindung an BMP verhindert (Zimmerman et al., 1996). Außerdem ist Noggin essentiell für die Entwicklung der Somiten und des Neuralrohres (McMahon et al., 1998).

Mäuse, defizient für Semaphorin 3a oder für die Sema 3-Rezeptoren Neuropilin1 bzw. 2, wiesen Fehler in der peripheren Innervation sensorischer Spinalganglien auf, jedoch nicht in der Zentralprojektion. Auch diverse Hirnnerven waren betroffen und zeigten eine vermehrte Verzweigung und Defaszikulation der Fasern (Taniguchi et al., 1997; Kitsukawa et al., 1997; Ulupinar et al., 1999; White and Behar, 2000; Chen et al., 2000; Chilton and Guthrie, 2003). Einen sehr ähnlicher Phänotyp konnte in Mäusen, die für den Transkriptionsfaktor Brn3a defizient sind, gefunden werden (Eng et al., 2001). Des Weiteren ist der Transkriptionsfaktor CREB („CRE-binding protein“) für das Überleben und das Wachstum Neurotrophin-abhängiger peripherer Neurone, wichtig. Die peripheren Spinalnerven zeigten eine verminderte Innervation der Zielgebiete aufgrund kürzerer und weniger verzweigter Nervenäste (Lonze et al., 2002).

4.1.3. Präganglionäre sympathische Neurone

Die zum vegetativen Nervensystem gehörenden, präganglionären sympathischen Nervenzellen sind viszeroeffere Neurone. Ihre Zellkörper liegen in der intermediären Zone vom Thorakalmark (Brustmark) und oberem Lumbalmark (Lendenmark). Die präganglionären Axone projizieren durch die ventralen Wurzeln und die weißen Rami zu den sympathischen Ganglien, die im Bereich der Brust-, Lenden- und Kreuzwirbelsäule rechts und links in den Grenzsträngen als paravertebrale Ganglien segmental angeordnet sind. Ferner projizieren die präganglionären Neurone zu den postganglionären Neuronen in den unpaaren

Bauch- und Beckenganglien (prävertebrale Ganglien) und innervieren letztlich vor allem glatte Muskelzellen und Drüsen (Schiebler et al., 1999).

Wie in Kapitel 3.1.1.3. beschrieben, konnte die cGKI α in den Zellkörpern und Axonen der präganglionären Neurone sowie in den paravertebralen Ganglien detektiert werden. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen die neuronale NO-Synthase (nNOS), welche ebenfalls von den Zellen exprimiert wird (Bruning and Mayer, 1996), wurden die präganglionären Neurone hinsichtlich ihres Migrationsverhaltens und ihrer Projektion in cGKI-defizienten Mäusen des Embryonalstadiums E13 untersucht. Es konnten keine Unterschiede zum Wildtyp festgestellt werden (siehe Kap. 3.2.4.).

Eine Expression der cGKI α in den präganglionären sympathischen Neuronen konnte bereits von Schmidt und Kollegen gezeigt werden (Schmidt et al., 2002). Die cGKI α -immunpositiven Hirnnerven III, VII, IX und X lassen vermuten, dass auch die präganglionären Neurone des Parasympathikus die Kinase exprimieren, obwohl eine eindeutige Zuordnung nicht möglich war. Auch im Darmnervensystem, dem dritten Bestandteil des vegetativen Nervensystems, konnte die cGKI in Neuronen des Plexus myentericus und Plexus submucosus detektiert werden (Huber et al., 2000; Salmhofer et al., 2001).

4.1.4. Notochord (Chorda dorsalis)

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ab dem Embryonalstadium E9,5 eine Expression der cGKI α in der Chorda dorsalis gezeigt werden. Sie wird als primitives Stützskelett angelegt und bildet sich dann bei höheren Wirbeltieren zurück. Sie induziert die Bildung des Neuralrohres und die Differenzierung des paraxialen Mesoderms und hat somit eine wichtige Funktion in der Embryonalentwicklung. Die Funktion der cGKI α in der Chorda dorsalis ist jedoch unklar. Obwohl nicht weiter explizit untersucht, konnte zumindest in cGKI-defizienten Mäusen mit nNOS- und trkA-Antikörperfärbungen von Schnitten des Embryonalstadiums E13 keine Beeinträchtigung der Chorda dorsalis beobachtet werden.

4.1.5. Bulbus olfactorius

In der vorliegenden Arbeit konnte die cGKI α im Embryonalstadium E13,5 im olfaktorischen Epithel und auf den aus dem Bulbus olfactorius auswachsenden Axonen der Mitralzellen, welche den Traktus olfactorius bilden detektiert werden. Postnatal wurde die cGKI α in den Mitralzellen, einigen periglomerulären Zellen, im akzessorischen Bulbus olfactorius und im lateralen olfaktorischen Trakt detektiert (siehe Kap. 3.1.1.4.). Lysate der Bulbi olfactorii

verschiedener postnataler Entwicklungsstadien zeigten eine leichte Expressionszunahme der Kinase ab ca. P6 bis zum adulten Stadium. In cGKI-defizienten Mäusen beschränkte sich die Untersuchung des Bulbus olfactorius auf das Postnatalstadium P23, in dem im Vergleich zum WT keine morphologischen Unterschiede beobachtet werden konnten (siehe Kap. 3.2.6.).

Untersuchungen von El Husseini und Kollegen zeigten eine starke Expression der cGKII im Bulbus olfactorius (El Husseini et al., 1995; El Husseini et al., 1999). Auch die mRNA der cGKI konnte detektiert werden, wobei die cGKI β eine bedeutend stärkere Expression aufwies (Geiselhoringer et al., 2004). Erstaunlicherweise gibt es meines Wissens nach jedoch kaum Arbeiten, welche die genaue zelluläre Lokalisation der cGKI bzw. cGKII beschreiben. Feil und Kollegen zeigten kürzlich eine Expression der cGKI in der externen und internen plexiformen Zellschicht im Bulbus olfactorius adulter Mäuse, wobei unerwähnt blieb, auch eine Färbung in der Mitralzellschicht detektiert werden konnte.

4.1.6. Hippocampus

Im Hippocampus adulter Ratten bzw. Mäuse wurde sowohl die Expression der cGKI als auch der cGKII beschrieben, wobei die cGKI deutlich stärker exprimiert wurde und in den Pyramidenzellen und in den Körnerzellen des Gyrus dentatus lokalisiert werden konnte (Qian et al., 1996; Kleppisch et al., 1999). In situ Hybridisierungen zeigten die cGKI β als die vorherrschende Isoform im Hippocampus (Geiselhoringer et al., 2004). Die im Vergleich zu anderen Hirnregionen relativ schwache Expression der cGKII wurde im Stratum radiatum, Stratum oriens und Stratum lacunosum moleculare und in einigen Pyramidenzellen beobachtet (El Husseini et al., 1995; de Vente et al., 2001).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die cGKI α im Hippocampus exprimiert wird (siehe Kap. 3.1.1.7.). Die Pyramidenzellen der Cornu ammonis regio inferior (CA1) und der Cornu ammonis regio superior (CA3) sowie die Körnerzellen des Gyrus dentatus und die Fimbria hippocampi waren immunpositiv für cGKI α . Lysate vom Hippocampus verschiedener postnataler Entwicklungsstadien zeigten ab dem Postnataltag P13 bis zum Postnataltag P21 eine Zunahme der cGKI α -Expression, in adulten Mäusen (älter als 6 Wochen) jedoch wieder eine Abnahme der Expression.

Vergleichende Untersuchungen zur allgemeinen Morphologie des Hippocampus in postnatalen WT und cGKI-defizienten Mäusen der Alterstadien P12 und P23 zeigten weder Unterschiede in der Hippocampusstruktur noch im Expressionsmuster von Calbindin zwischen KO und WT (siehe Kap. 3.2.5.).

Eine Beteiligung der cGK wurde an möglichen molekularen Mechanismen des Lernens und Gedächtnisses wie Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD) postuliert. Es wurde vorgeschlagen, dass postsynaptisch generiertes Stickstoffmonoxid (NO) als retrograder Botenstoff fungiert und die LTP durch Aktivierung der präsynaptischen löslichen Guanylatzyklase und schließlich auch der cGKI induziert (Zhuo et al., 1994; Arancio et al., 2001; Micheva et al., 2003; Wang et al., 2005). Erste Untersuchungen an cGKI- und/oder cGKII-defizienten Mäusen konnten keine Veränderungen der LTP in der CA1 Region des Hippocampus aufzeigen (Kleppisch et al., 1999). Aufgrund der reduzierten Lebensspanne cGKI-defizienter Mäuse wurden Hippocampus-spezifische konditionale KO-Mäuse generiert und hinsichtlich der LTP untersucht. Diese Tiere zeigten im Alter von 3-4 Wochen eine normale Langzeitpotenzierung, im Alter von 12-14 Wochen jedoch eine reduzierte LTP. Des Weiteren war Anisomycin, ein Proteinsynthese-Inhibitor, in der Lage die LTP in adulten Kontrolltieren zu reduzieren, jedoch nicht in den KO-Tieren. Dies ließ vermuten, dass die cGKI die Proteinsynthese-abhängige Komponente der Langzeitpotenzierung beeinflusst (Kleppisch et al., 2003). Eine Induktion dieser späten Phase der LTP durch NO/cGMP wurde bereits von Lu und Kollegen beschrieben und erfordert die Aktivierung von CREB (Lu et al., 1999; Lu and Hawkins, 2002). Trotz der veränderten LTP in den Hippocampus-spezifischen cGKI-KO-Tieren, konnten weder mit dem „Morris-Water-Maze-Test“ noch in Angst-Konditionierungstests Unterschiede im Verhalten dieser Mäuse im Vergleich zu Wildtypmäusen beobachtet werden (Kleppisch et al., 2003).

4.1.7. Cerebellum

Im Cerebellum zeigt die cGKI innerhalb des adulten Gehirns wohl ihre stärkste Expression. Lohmann und Kollegen konnten in adulten Ratten eine 20-40fach höhere Expression der cGKI im Cerebellum im Vergleich zu anderen Hirnregionen feststellen und lokalisierten die cGKI in den Somata, Dendriten und Axonen der Purkinje-Zellen, jedoch nicht in den Zellkernen (Lohmann et al., 1981). Wassef und Sotelo detektierten mit einem Antikörper gegen cGKI erste immunpositive Purkinje-Zellen in Ratten des Entwicklungsstadiums E17 (Wassef and Sotelo, 1984). Untersuchungen von Keilbach mit isoformspezifischen Antikörpern der cGKI konnten die cGKI α als vorherrschende Isoform der cGKI im Cerebellum ausmachen (Keilbach et al., 1992). Die cGKII konnte ebenfalls in den Purkinje-Zellen detektiert werden, obwohl die Expression im Cerebellum im Vergleich zu anderen Hirnregionen relativ schwach ausfiel (El Husseini et al., 1995; El Husseini et al., 1999; de Vente et al., 2001).

Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte die cGKI α in den Zellkörpern (mit Ausnahme des Zellkerns), Dendriten und Axonen der Purkinje-Zellen detektiert werden. Außerdem konnte in Western Blots von Gewebe-Lysaten des Cerebellums verschiedener Postnatalstadien eine entwicklungsabhängige Zunahme der Expression der Kinase gezeigt werden. Im Vergleich zum Postnatalstadium P6 nahm ab P10 die Expression der cGKI α im Cerebellum in den älteren Entwicklungsstadien deutlich zu (siehe Kap. 3.1.1.6.). Eine mögliche Erklärung für die deutliche Zunahme der Expression zwischen P6 und P10 könnten Beobachtungen von Wassef und Sotelo liefern, die in Ratten erst etwa ab dem Postnatalstadium P5 eine cGKI-Immunreaktivität aller Purkinje-Zellen beobachten konnten, während in den früheren Entwicklungsstadien einige Zell-Cluster negativ für die Kinase waren (Wassef and Sotelo, 1984). Aufgrund der zunehmenden Expression der Kinase während der Postnatalstadien lag die Vermutung nahe, dass die cGKI α eventuell eine Rolle bei der Entwicklung der Purkinje Zellen spielen könnte, insbesondere bei der etwa ab dem Postnatalstadium P10 beginnenden Differenzierung der Dendritenbäume in primäre, sekundäre und tertiäre Äste (Stottmann and Rivas, 1998).

Vergleichende Untersuchungen zur allgemeinen Morphologie des Cerebellums mit einem Antikörper gegen Calbindin konnten jedoch keine Unterschiede in der Cerebellum-Struktur zwischen cGKI-defizienten Mäusen und Wildtyp-Mäusen im Postnatalstadium P13 aufzeigen (siehe Kap. 3.2.7.). Auch eine im Zeitraum der Doktorarbeit erschienene Publikation zur Untersuchung konditionaler KO-Mäuse, welche nur in den Purkinje-Zellen defizient für cGKI waren, konnte weder immunhistochemisch noch elektronenmikroskopisch morphologische Abnormalitäten im Cerebellum zeigen (Feil et al., 2003). Elektrophysiologische Untersuchungen zeigten jedoch, dass die Abwesenheit der cGKI in den Purkinje-Zellen zu einem nahezu kompletten Verlust der Langzeitdepression (LTD) führt. LTD ist vermutlich in bestimmte Formen motorischen Lernens, wie z.B. die Adaption des Vestibulo-okulären-Reflexes (VOR) involviert, welcher dazu dient, die Augenstellungen so zu beeinflussen, dass auch während der Kopfbewegungen die optische Raumorientierung gewährleistet ist. Feil und Kollegen konnten zeigen, dass in KO-Mäusen die Adaption des VOR gestört, jedoch das generelle motorische Koordinationsverhalten nicht beeinträchtigt ist.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die cGKI α vom Embryonalstadium an bis ins adulte Alter in vielen Teilen des Nervensystems exprimiert wird. Insbesondere die Expression auf auswachsenden Neuronen im Embryonalstadium und die in einigen Hirnteilen beobachtete Zunahme der Expression in Postnatalstadien sprechen für eine mögliche Rolle

der cGKI α bei der axonalen Wegfindung oder Differenzierung der Zellen. Mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden konnten jedoch in den cGKI-defizienten Mäusen keine weiteren axonalen Wegfindungsfehler detektiert werden. Allerdings war es im Rahmen der Arbeit nicht möglich, sämtliche cGKI α -positiven Strukturen und Gewebe in den verschiedenen Altersstadien umfassend zu untersuchen. Zudem wäre für einige Strukturen eine Analyse der cGKI/cGKII-defizienten Maus hilfreich.

Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit beschreibt jedoch im Cortex cGKI-defizienter Mäuse eine Störung in der Dendriten-Orientierung der Pyramidenzellen sowie morphologische Veränderungen in der ersten kortikalen Schicht, was für eine mögliche Rolle der cGKI bei der Migration kortikaler Neurone spricht (Demyanenko et al., 2005).

4.2. Untersuchung bekannter und putativer Substrate der cGK

Um die Funktion der cGKI genauer zu verstehen, ist die Identifizierung der Substrate und der Interaktionspartner entscheidend. Deshalb wurden in dieser Arbeit bekannte und putative Zytoskelett-assoziierte cGK-Substrate hinsichtlich einer Beteiligung an den von Schmidt und Kollegen (Schmidt et al., 2002) in der cGKI-defizienten Maus beobachteten Wegfindungsfehlern der trkA-immunpositiven Neurone im dorsalen Funiculus des Rückenmarks untersucht.

4.2.1. CRP2 (Cysteine-rich protein family)

CRP2 wurde als Substrat der cGKI im Darmnervensystem und der glatten Darmmuskulatur beschrieben (Huber et al., 2000). Neben der cGKI β waren auch die cGKI α und in einem deutlich geringeren Maße die cGKII in der Lage CRP2 *in vitro* zu phosphorylieren, jedoch nicht die cAK. Zudem konnte in COS-Zellen eine Phosphorylierung von CRP2 (der Ratte) durch cGKI β an der Aminosäureposition Serin¹⁰⁴ der cAK/cGK-spezifischen Phosphorylierungskonsensussequenz (**RKTS**) gezeigt werden (Huber et al., 2000). Ursprünglich von Okano und Kollegen aus dem Gehirn der Ratte kloniert (Okano et al., 1993), gehört CRP2 neben CRP1, CRP2/SmLIM, CRP3/MLP und CRIP zur Familie der Cystein-reichen Proteine (CRP). Es hat 208 Aminosäuren mit einer korrespondierenden molaren Masse von 23 kD und besteht aus zwei LIM-Domänen, die jeweils zwei Zinkfinger enthalten. Auf jede LIM-Domäne folgt eine Glycin-reiche Domäne und ein putatives Kernlokalisierungssignal. Die cAK/cGK-spezifische Phosphorylierungskonsensussequenz (**RKTS**), die innerhalb der CRP-Familie nur bei CRP2 vorkommt, ist zwischen beiden LIM-Domänen lokalisiert. LIM-Domänen sind vermutlich entscheidend für die Vermittlung von

Protein-Protein-Interaktionen, Veränderungen in der subzellulären Lokalisation von Proteinen und der Bildung von Proteinkomplexen (Dawid et al., 1998; Chang et al., 2003). Für einige Mitglieder der CRP-Familie konnte eine Kollokalisierung mit Zyxin und α -Aktinin an Strukturen des Aktin-Zytoskeletts gezeigt werden (Schmeichel and Beckerle, 1994; Louis et al., 1997). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass einige CRP-Mitglieder, wie die meisten charakterisierten Zinkfinger-Proteine, durch ihre Fähigkeit an spezifische DNA-Sequenzen zu binden, als transkriptionelle Regulatoren fungieren (Chang et al., 2003).

In COS-Zellen zeigte CRP2 eine zytosolische und perinukleäre Lokalisation. Im Darmnervensystem konnte CRP2 zusammen mit der cGKI in Neuronen des Plexus submucosus und Plexus myentericus detektiert werden (Huber et al., 2000). Eine mögliche Funktion der CRP2 im Zentralnervensystem wurde durch die Detektion der mRNA im Gehirn gestützt (Okano et al., 1993). Außerdem wird CRP2 im Rückenmark adulter Mäuse in den Laminae I und II exprimiert (mündliche Information von Dr. Matthias Sausbier), welche ebenfalls cGKI positiv sind (Tegeeder et al., 2004). Genauere Informationen zur Expression und Funktion von CRP2 im Nervensystem liegen bislang nicht vor.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführte Untersuchung der Zentralprojektion trkA-immunpositiver Spinalganglienaxone CRP2-defizienter Mäuse, zeigte keine Defekte in der Projektion der sensorischen Fasern (siehe Kap. 3.3.1.). Dies lässt vermuten, dass CRP2, zumindest in dem untersuchten Embryonalstadium nicht direkt an den im Rückenmark beobachteten Wegfindungsfehlern cGKI-defizienter Embryonen beteiligt ist. Eine mögliche indirekte Beteiligung von CRP2 an den Wegfindungsfehlern ist nicht bekannt. Insbesondere ist bislang noch nicht geklärt, ob CRP2 bereits während der Embryonalentwicklung im Rückenmark bzw. den Spinalganglien exprimiert wird.

4.2.2. Myosin IIB und Myosinphosphatase

Nichtmuskuläres Myosin II gehört zur Myosin-Superfamilie von Motorproteinen und besteht aus zwei schweren Ketten und zwei Paar leichten Ketten. In Vertebraten zählen die Isoformen Myosin IIA und IIB, welche sich in ihren schweren Ketten unterscheiden, zu den prominentesten Myosinen im Nervensystem (Rochlin et al., 1995). Myosin IIB konnte außer in den Wachstumskegeln von Spinalganglienneuronen auch in anderen Neuronen zusammen mit F-Aktin lokalisiert werden (Cheng et al., 1992; Rochlin et al., 1995). Myosin IIB ist in der Lage bipolare Filamente zu bilden, welche wiederum durch Interaktion mit Aktinfilamenten lokale Kontraktionen im Wachstumskegel auslösen können (Bridgman, 2002). Die Axone Myosin IIB-defizienter Mäuse zeigten ein reduziertes Wachstum sowie kleinere

Wachstumskegel mit einer veränderten F-Aktin-Organisation, ausserdem konnte ein verstärkter retrograder Aktinfilamentfluss beobachtet werden (Tullio et al., 2001; Bridgman et al., 2001; Brown and Bridgman, 2003). Für die Regulation und zelluläre Lokalisation des Myosins ist sowohl die Phosphorylierung der schweren Ketten (Bresnick, 1999; Straussman et al., 2001) als auch der leichten Ketten (MLC) entscheidend (Burridge, 1999). Der Phosphorylierungsgrad der leichten Myosinketten (MLC) wird über die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK) und die Myosinphosphatase (PP1M) kontrolliert (Abb. 51). Phosphorylierung der leichten Kette führt zu einer Filament-Ansammlung von Myosin II (Bresnick, 1999).

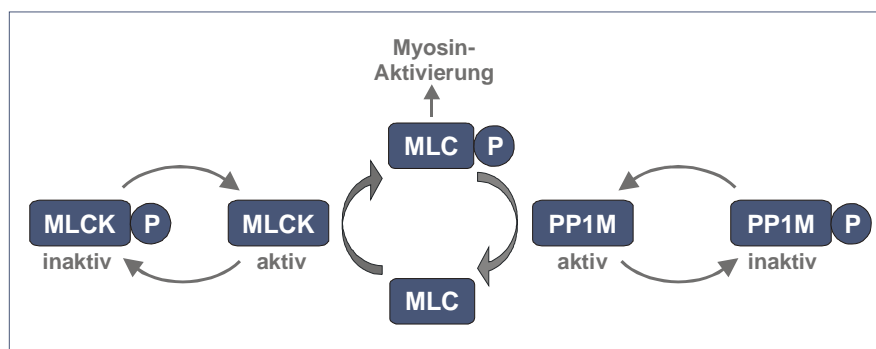


Abb. 51: Schematische Darstellung der Myosin-Regulation. Die Phosphorylierung der leichten Ketten (MLC) führt zur Aktivierung des Myosins und damit zur Filament-Ansammlung bzw. zur Kontraktion. Der Phosphorylierungsgrad der MLC wird über die Myosin-Leichte-Ketten-Kinase (MLCK) und die Myosinphosphatase (PP1M) kontrolliert.

Die Myosinphosphatase ist ein Heterotrimer, bestehend aus einer katalytischen Untereinheit (PP1c), einer Myosin-bindenden Untereinheit (MBS bzw. MYPT) und einer 20 kD Untereinheit unbekannter Funktion (Hartshorne et al., 1998). Im Myosinsystem der vaskulären glatten Muskulatur zeigten Surks und Kollegen, dass die cGKI α über ihre N-terminale Leucinreißverschlussregion eine Interaktion mit der MBS der Myosinphosphatase eingeht. Eine Entkopplung dieser Interaktion verhinderte die cGMP-abhängige Dephosphorylierung der leichten Myosinkette (Surks et al., 1999; Surks and Mendelsohn, 2003). D.h. in diesem System vermittelt die cGKI α die physiologische Erschlaffung der glatten Muskulatur in Antwort auf NO und cGMP. Während bislang noch unklar ist, ob die Phosphorylierung der MBS durch die cGKI α direkt zu einer Aktivierung der Myosinphosphatase führt, scheint die Leucinreißverschlussregion der MBS essentiell für die Bindung an cGKI α und für die Phosphorylierung zu sein (Nakamura et al., 1999; Khatri et al., 2001; Surks and Mendelsohn, 2003).

Da keine Myosinphosphatase-defizienten Mäuse zur Verfügung standen, wurden in der vorliegenden Arbeit, aufgrund der oben beschriebenen Funktion des Myosin IIB in Wachstumskegeln und der möglichen Beteiligung der cGKI α an der Regulation des nichtmuskulären Myosinsystems, Myosin IIB-defiziente Mäuse auf mögliche Wachstumsfehler der sensorischen Spinalganglienaxone im dorsalen Funiculus untersucht. Es konnten in keinem der untersuchten Embryonalstadien im Vergleich zum WT Unterschiede in der Zentralprojektion trkA-, cGKI α - und Neurofilament-immunpositiver Spinalganglienaxone beobachtet werden (siehe Kap. 3.3.2.). Bei der Untersuchung der Zentralprojektion konnte im Vergleich zum WT auch kein übermäßig verzögertes Einwachsen der Spinalganglienaxone beobachtet werden, obwohl Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen *in vitro* ein verlangsamtes Auswachsen Myosin IIB-defizienter Grenzstrangganglienneurone zeigten (Tullio et al., 2001; Bridgman et al., 2001). Untersuchungen dieser Arbeitsgruppen stützen jedoch auch die Möglichkeit einer kompensatorischen Wirkung von Myosin IIA bei Verlust von Myosin IIB. So wird vermutet, dass Myosin IIA entscheidend zum verstärkten retrograden Aktinfilamentfluss beiträgt, welcher in Myosin IIB-defizienten Mäusen beobachtet wurde (Brown and Bridgman, 2003). Andererseits lässt sich nicht ausschließen, dass noch andere Myosine wie Myosin I, V und VI, welche in den Wachstumskegeln lokalisiert werden konnten, die Abwesenheit der Myosin IIB-Isoform kompensieren könnten (Wang et al., 1996; Lewis and Bridgman, 1996; Suter et al., 2000; Diefenbach et al., 2002). Daten des humanen Genomprojekts lassen zudem vermuten, dass in Säugetieren noch eine drittes Myosin II-Gen vorkommt (Brown and Bridgman, 2003).

Des Weiteren soll der Vollständigkeit halber erwähnt werden, dass im Rahmen der Arbeit Versuche zur Phosphorylierung der MLC und der MBS (bzw. MYPT) in Spinalganglien von cGKI-defizienten und WT-Mäusen durchgeführt wurden. WT- und KO-Spinalganglien des Embryonalstadiums E14 wurden entweder mit 8-pCPT-cGMP stimuliert oder unbehandelt belassen und die Lysate mit der SDS-PAGE aufgetrennt. Für die Untersuchung der Phosphorylierung der MLC wurden Antikörper verwendet, welche die MLC erkennen sollen, wenn nur die Serin-Aminosäureposition 19 phosphoryliert ist bzw. wenn zusätzlich noch Threonin an Position 18 phosphoryliert ist (Sakurada et al., 1998). Für die Untersuchung zur MYPT-Phosphorylierung wurde ein phosphospezifischer Antikörper (Fa. Upstate Biotechnology) verwendet, der die Phosphorylierung der Threonin-Aminosäureposition 696 erkennt. Mit keinem dieser verwendeten Antikörper konnten Unterschiede zwischen WT und KO beobachtet werden, jedoch konnte auch kein stabiles und akzeptables Bandenmuster

detektiert werden. Aufgrund der geringen Aussagekraft dieser Untersuchungen wurden diese nicht mit in den Ergebnisteil aufgenommen.

4.2.3. VASP (Vasodilator-stimulated phosphoprotein)

VASP wurde ursprünglich in Thrombozyten als Substrat der cAK und cGK beschrieben und gilt inzwischen als anerkanntes *in vitro* und *in vivo* Substrat beider Kinasen (Halbrugge et al., 1990; Butt et al., 1994). Es ist ein Mitglied der Aktin-regulatorischen Ena/VASP-Proteinfamilie, zu der in Vertebraten noch Mena (Mammalian enabled) und Evl (Ena-VASP-like) gehören (Gertler et al., 1996; Krause et al., 2003). Alle Ena/VASP-Proteine weisen mit einer hoch konservierten N-terminalen Ena-VASP-Homologie-Domäne 1 (EVH1-Domäne), einer Prolin-reichen zentralen Region und einer C-terminalen Ena-VASP-Homologie-Domäne 2 (EVH2-Domäne) eine identische Domänenorganisation auf. Diese spezifischen Domänen vermitteln unter anderem die Bindung von VASP (und anderer Ena/VASP-Proteine) an die Zytoskelettproteine Zyxin und Vinculin, an das G-Aktin bindende Profilin und an filamentöses Aktin (F-Aktin) (Reinhard et al., 1995; Gertler et al., 1996; Bachmann et al., 1999; Reinhard et al., 2001). Alle drei Ena/VASP-Proteine (VASP, Mena, Evl) der Vertebraten konnten im Nervensystem detektiert werden, wo sie z.T. in den Lamellipodien und Filopodien der Wachstumskegel lokalisiert sind (Lanier et al., 1999; Gambaryan et al., 2001; Menzies et al., 2004). Neuere Untersuchungen zeigten, dass die Ena/VASP-Proteine entscheidend für die Netrin-1 induzierte Bildung und Elongation von Filopodien hippocampaler Neurone sind (Lebrand et al., 2004). Auch bei der schichtenspezifischen Migration kortikaler Neurone scheinen die Ena/VASP-Proteine wichtig zu sein (Goh et al., 2002). Die Ena/VASP-Proteine spielen somit in vielen Zelltypen eine entscheidende Rolle bei der aktinvermittelten Regulation der Zellmorphologie und Beweglichkeit. Auch die Phosphorylierung der Ena/VASP-Proteine kann zum Teil die Interaktion mit den Bindungspartnern beeinflussen (Lambrechts et al., 2000; Harbeck et al., 2000; Lawrence and Pryzwansky, 2001; Zhuang et al., 2004; Lebrand et al., 2004). VASP wurde bisher als Substrat der cAK und cGK beschrieben, Mena und Evl als Substrate der cAK (Halbrugge et al., 1990; Gertler et al., 1996; Aszodi et al., 1999; Lambrechts et al., 2000). Während Evl (Maus) eine cAK/cGK-spezifische Phosphorylierungsstelle an der Aminosäureposition Serin¹⁵⁶ (**RRIS**) aufweist, besitzt Mena (Maus) zwei, an den Aminosäurepositionen Serin²⁵⁵ (**RRMS**) und Serin⁶³⁷ (**RKVS**). Die drei cAK/cGK-spezifischen Phosphorylierungsstellen von VASP (Maus) liegen in der Prolin-reichen Region an der Aminosäureposition Serin¹⁵² (**RRVS**) und in der EVH2-Domäne an den Aminosäurepositionen Serin²³⁴ (**RKVS**) und Threonin²⁷³ (**RKAT**). Untersuchungen zur Phosphorylierungskinetik zeigten, dass die cAK

sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nacheinander die Phosphorylierungsstellen Serin¹⁵², Serin²³⁴ und Threonin²⁷³ von VASP phosphoryliert. Die cGK zeigte indessen *in vitro* eine Präferenz für die Phosphorylierungsstelle Serin²³⁴, vor Serin¹⁵² und vor Threonin²⁷³. *In vivo* konnte die cGK jedoch beide Serin-Stellen gleichermaßen phosphorylieren. Die Threoninstelle wird von beiden Kinasen nur schwach und erst nach Phosphorylierung der beiden Serin-Stellen phosphoryliert (Butt et al., 1994). Wie bereits in Kap 3.3.3.1. dargestellt führt die Phosphorylierung von VASP an Position Serin¹⁵² zu einer Bandenverschiebung in der SDS-PAGE von 46 kD zu 50 kD, die mit einem Antikörper detektiert werden kann, der Gesamt-VASP erkennt. Des Weiteren wurde ein Antikörper entwickelt der es ermöglicht, die Phosphorylierung von VASP (Maus) an der Position Serin²³⁴ zu untersuchen, welche *in vitro* als die bevorzugte Phosphorylierungsstelle der cGK gilt (Smolenski et al., 1998). Die Untersuchung der intrazellulären Phosphorylierung von VASP mit diesen Antikörpern wurde inzwischen in verschiedenen Zelltypen genutzt, um die Aktivität der cGK zu bestimmen (Lohmann and Walter, 2005).

Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die cGKI-vermittelte Phosphorylierung von VASP mit einem Antikörper gegen Gesamt-VASP untersucht. Hierbei interessierte zum einen, ob VASP während der Embryonalentwicklung in den Spinalganglien exprimiert wird und zum anderen, ob es auch in diesen Zellen ein Substrat der cGKI ist. Eine Expression von VASP in Spinalganglien-Lysaten konnte für die Entwicklungsstadien E12 und E14 gezeigt werden (siehe Kap. 3.3.3.1.1.-3.3.3.1.3.). Dies passt zu den Beobachtungen von Menzies und Kollegen, welche VASP im Embryonalstadium E10,5 in den Spinalganglien detektieren konnten (Menzies et al., 2004). Um zu untersuchen, ob VASP ein Substrat der cGKI in den Spinalganglien ist, wurde die Phosphorylierung von VASP in Spinalganglien cGKI-defizienter Mäuse mit der in Wildtyp-Mäusen verglichen. Hierzu wurden die präparierten Spinalganglien der Embryonalstadien E14 entweder mit dem spezifischen Phosphodiesterase-resistenten cGK-Aktivator 8-pCPT-cGMP inkubiert (Butt et al., 1992), oder als Kontrolle unbehandelt belassen. Die VASP-Phosphorylierung in unstimulierten Wildtyp-Spinalganglien versus unstimulierten cGKI-defizienten Spinalganglien unterschied sich nicht signifikant ($p=0.0756$ Mann-Whitney U Test, $n_{WTunstim} = 9$, $n_{KOunstim} = 4$). Durch Erhöhung der Anzahl der KO Versuchstiere würde jedoch, bei ähnlichen Werten für das Verhältnis phosphoryliertes VASP zu VASP, ein signifikanter Unterschied beobachtet werden können. Die Stimulation der Spinalganglien mit 8-pCPT-cGMP führte im Vergleich zur unstimulierten Probe zu einer deutlich signifikanten Erhöhung der VASP-Phosphorylierung im Wildtyp ($p<0,0001$ Mann-Whitney U Test) und einer signifikanten Erhöhung der VASP-Phosphorylierung in der cGKI-

defizienten Maus ($p=0,0427$ Mann-Whitney U Test). Der deutlichere Unterschied in der Phosphorylierung zwischen stimulierten WT-Spinalganglien im Vergleich zu unstimulierten WT-Spinalganglien ist plausibel, da die cGKI erst aktiviert werden muss, um ihre volle katalytische Funktion entfalten zu können. Der Unterschied in der VASP-Phosphorylierung zwischen stimulierten und unstimulierten cGKI-defizienten Spinalganglien ist vermutlich auf die Aktivierung der cAK durch 8-pCPT-cGMP zurückzuführen, als Nebeneffekt der erhöhten cGMP-Konzentration. Trotz möglicher zusätzlicher Aktivierung der cAK durch 8-pCPT-cGMP konnte eine signifikante Verminderung der VASP-Phosphorylierung in stimulierten cGKI-defizienten Spinalganglien versus stimulierten Wildtyp Spinalganglien festgestellt werden ($p=0,0028$ Mann-Whitney U Test). Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass VASP ein Substrat der cGKI in den Spinalganglien ist.

VASP wird also in den Embryonalstadien, in denen der Wegfindungsfehler der nozizeptiven Spinalganglienaxone im Rückenmark cGKI-defizienter Mäuse beobachtet wurde, in den Spinalganglien exprimiert und von der cGKI phosphoryliert. Daher wurden VASP-defiziente Embryonen auf Wegfindungsfehler der Spinalganglienaxone im Rückenmark untersucht. In den untersuchten Altersstadien konnten jedoch keine Fehler in der Zentralprojektion trkA- bzw. Neurofilament-immunpositiver Spinalganglien neurone gefunden werden (siehe Kap. 3.3.3.2.). Daher ist VASP offenbar nicht direkt an den im Rückenmark beobachteten Wegfindungsfehlern cGKI-defizienter Embryonen beteiligt, andererseits gibt es Hinweise, dass der Verlust von VASP durch z.B. Mena oder/und Evl kompensiert werden kann. Alle drei Ena/VASP-Proteine zeigen im Nervensystem bezüglich des Gewebetyps und des Entwicklungsstadiums eine z.T. überlappende Expression (Lanier et al., 1999; Menzies et al., 2004). Mena konnte in den Spinalganglien von Mäusen des Entwicklungsstadiums E10,5 detektiert werden (Menzies et al., 2004). Die Expression von Mena im Entwicklungsstadium E14 wurde auch im Rahmen dieser Arbeit überprüft (siehe Kap. 3.3.3.). Mit den verwendeten Antikörpern konnte sowohl die 80 kD-Isoform als auch die 140 kD-Isoform von Mena in den Spinalganglien detektiert werden. Über eine Expression von Evl in den Spinalganglien ist meines Wissens noch nichts bekannt. Sowohl eigene als auch die Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen zu VASP-defizienten und Mena-defizienter Mäusen, stützen die Vermutung, dass beide Proteine im Nervensystem zum Teil kompensatorisch wirken. Während weder in VASP-defizienten noch Mena-defizienten Mäusen eine Beeinträchtigung der auswachsenden Spinalnerven beobachtet werden konnte, zeigten VASP/Mena-defiziente Embryonen Defekte in der peripheren Projektion der Spinalnerven, welche den Plexus brachialis bilden (Menzies et al., 2004). Inwieweit von dieser Arbeitsgruppe die Zentralprojektion der Spinalnerven in

diesen Mäusen untersucht wurde ist nicht bekannt, zumindest wurden keine derartigen Defekte beschrieben. Untersuchungen zu Evl-defizienten Mäusen oder Dreifach-Mutanten (VASP/Mena/Evl) wurden bisher nicht publiziert. Allerdings wurde in Gewebe-Lysaten, welche im Wildtyp sowohl Mena-, VASP- als auch Evl-immunpositiv sind, eine leichte Zunahme in der Expression von Evl und VASP bei Abwesenheit von Mena (Mena-KO) beobachtet (Lanier et al., 1999). Ob und inwiefern VASP bzw. auch Mena und Evl eine Rolle bei der Bildung der Zentralprojektion der Spinalganglien spielen, kann mit dem bisherigen Wissen nicht genau gesagt werden. Hilfreich wären u. a. Untersuchungen zur cGKI-abhängigen Phosphorylierung von Mena und Evl sowie die Analyse VASP/Mena/Evl-defizienter Mäuse.

Zusammenfassend konnte mit den in dieser Arbeit verwendeten Methoden kein direkter Zusammenhang zwischen den cGKI-Substraten CRP2 und VASP, noch mit dem u.a. vermutlich durch cGKI regulierten Myosin IIB und den Wegfindungsfehlern der cGKI-defizienten Spinalganglienaxone im Rückenmark hergestellt werden. Andere Zytoskelett-assoziierte, bekannte Substrate der cGKI wie z. B. G-Septin (Xue et al., 2000; Xue et al., 2004), RhoA (Sauzeau et al., 2000), Vimentin (Wyatt et al., 1991; Pryzwansky et al., 1995), MARCKS (Matsubara et al., 2005) und LASP (Butt et al., 2003; Keicher et al., 2004) sowie unbekannte Substrate könnten am Entstehen des Wegfindungsfehlers beteiligt sein. Denkbar ist auch eine indirekte Beeinflussung zytoskelettaler Proteine durch cGKI-Substrate wie Transkriptionsfaktoren (z.B. CREB) und Kinasen (z.B. MAPK). Wie bereits beschrieben, (siehe Kap. 4.1.2.1.) sind für die korrekte Ausbildung der zentralen bzw. peripheren Projektion der Spinalganglienaxone diverse Transkriptionsfaktoren wie DRG11, CREB, NFAT etc. wichtig.

Die Anzahl der bislang identifizierten Substrate der cGKI ist schon jetzt beträchtlich und es kann vermutet werden, dass aufgrund der Komplexität der Signaltransduktionsprozesse nicht nur ein Substrat der Kinase, für die Vermittlung der Wegfindungsfehler der Spinalganglienaxone im Rückenmark verantwortlich ist.

4.3. Suche nach Interaktionspartnern der cGKI bzw. cGKI α

In dieser Arbeit wurden parallel zwei alternative Ansätze verfolgt, um potentielle Interaktionspartner der cGKI im Nervensystem zu finden. Zum einen wurde mit Hilfe der Zweidimensionalen Gelelektrophorese cGKI-defizientes Gewebe mit Wildtyp-Gewebe hinsichtlich des Proteinexpressions- und Phosphorylierungsmusters verglichen, um Hinweise

auf mögliche Substrate der cGKI zu bekommen. Zum anderen wurde mittels des Zweihybriden Hefesystems eine cDNA-Bibliothek nach Interaktionspartnern der cGKI α durchsucht.

4.3.1. Untersuchungen zur Proteinexpression und Phosphorylierung im Cerebellum mit Hilfe der 2D-Gelelektrophorese

Als Gewebe für die vergleichenden Untersuchungen wurde das Cerebellum genutzt. Ein Vergleich von embryonalen Spinalganglien wäre basierend auf der in Schmidt et al. beschriebenen Fehler sinnvoller gewesen, wurde aber aufgrund der zu geringen Proteinmenge und der sehr zeitaufwändigen Präparation verworfen. Stattdessen wurden die Cerebella von Mäusen des Postnatalstadiums P10 bzw. P12 verwendet, in denen die cGKI α eine deutliche Expression in den Purkinje-Zellen aufweist.

Der Vorteil dieser Methode ist die Möglichkeit Unterschiede in der Proteinexpression komplexer Proteingemische zu detektieren und diese mit Hilfe der Massenspektrometrie zu spezifizieren bzw. die entsprechenden Proteine zu identifizieren. Nachteile bzw. methodische Schwierigkeiten werden in Kapitel 4.3.1.1.3. näher erläutert.

4.3.1.1. Unterschiede in der Proteinexpression cGKI-defizienter Mäuse

In den vergleichenden Untersuchungen zum Proteinexpressionsmuster konnten im Alter P10 die B22-Untereinheit der NADH-Q-Reduktase (Ndufb9) und im Alter P12 die D-Kette der mitochondrialen ATP-Synthase (ATP5H) als im cGKI-KO herunterregulierte Proteine detektiert werden. Des Weiteren konnten im Alter P12 zwei Proteine, deren Expressionsmuster im KO-Tier hochreguliert wurden, detektiert werden. Dabei handelte es sich um die Glutathion S-transferase omega 1 (GSTO1-1) und das ADP-Ribosylierungsfaktor-ähnliche Protein 3 (Arl3).

Bislang kann nicht gesagt werden, ob die Veränderung der Proteinexpression dieser Proteine im KO-Cerebellum ein primärer- oder sekundärer Effekt auf die Abwesenheit der cGKI ist. Keines dieser Proteine wurde als Substrat der cGKI beschrieben, noch enthalten die Aminosäuresequenzen eine cAK/cGK-spezifische Phosphorylierungskonsensussequenz. Im Folgenden sollen die Proteine kurz beschrieben werden und mögliche Zusammenhänge mit der cGKI beleuchtet werden.

4.3.1.1.1. B22-Untereinheit der NADH-Q-Reduktase (Ndufb9) und D-Kette der mitochondrialen ATP-Synthase (ATP5H)

Beide Proteine sind Bestandteile der mitochondrialen Atmungskette. Die Ndufb9 ist eine von ca. 45 Untereinheiten des NADH-Q Reduktase-Komplexes der für den Elektronentransfer zuständig ist. Die ATP5H ist Bestandteil der nicht-enzymatischen Komponente des ATP-Synthase-Komplexes. Die ATP-Synthase ist für die Synthese/Hydrolyse von ATP zuständig, die genaue Funktion von ATP5H ist jedoch nicht bekannt.

Insbesondere sich teilende oder sich differenzierende Zellen benötigen ausreichend Energie in Form von ATP z.B. für die Proteinsynthese, zytoskelettale Umstrukturierungen und Protein-Degradierung. Unklar ist bislang, inwiefern die Erhöhung der respiratorischen Aktivität mit einer Expressionszunahme der verschiedenen Komponenten der Atmungskette oder/und mit einer gezielten Regulation von Cytochrom *c* korreliert ist. (Herzig et al., 2000). Die Regulation der Expression von Cytochrom *c* ist auch für apoptotische Prozesse entscheidend, da Cytochrom *c* diverse Proteasen der Caspase-Familie aktivieren kann, die den Zelltod einleiten. Kim und Kollegen konnten in PC12-Zellen zeigen, dass NO über cGMP die Apoptose verhindern kann, indem sowohl die Ausschüttung von Cytochrom *c* aus den Mitochondrien als auch die Aktivierung von Caspase-3 unterdrückt wird (Kim et al., 1999). Takuma und Kollegen konnten zeigen, dass cGMP über die cGK die Apoptose neuronaler Zellen verhindert, indem sie die Reduktion des Membranpotentials der Mitochondrien verhindert und somit die Ausschüttung von Cytochrom *c* (Takuma et al., 2001). Zusätzlich konnte eine cGMP- und cGK- regulierte Aktivierung der Akt-Kinase, welche ebenfalls anti-apoptotische Effekte vermittelt, gezeigt werden (Ciani et al., 2002b; Ha et al., 2003; Edstrom and Ekstrom, 2003). Ob die beobachtete Abnahme in der Expression von Ndufb9 und ATP5H bei Abwesenheit der cGKI, mit apoptotischen Prozessen korreliert sein kann, bleibt jedoch zu untersuchen. Bei degenerativen Krankheiten, wie Multiple Sklerose und Alzheimer, scheinen die apoptotischen Prozesse mit einer Reduktion der mRNA verschiedener Bestandteile der mitochondrialen Atmungskette korreliert zu sein. (Li et al., 2003; Dutta et al., 2006).

4.3.1.1.2. Glutathion S-Transferase omega 1 (GSTO1-1)

GSTO1-1 gehört zur Superfamilie der zytosolischen Glutathion-Transferasen und wurde als ein auf Stress reagierendes Protein beschrieben, da es aufgrund eines Hitzeschocks seine subzelluläre Verteilung veränderte (Kodym et al., 1999). Humanes GSTO1-1 war in der Lage Ryanodin-Rezeptoren, Kalziumkanäle im endoplasmatischen Retikulum, zu hemmen bzw. zu aktivieren (Dulhunty et al., 2001). Diese Modulation scheint beim Schutz der Zellen vor

oxidativem Stress, der mit einer Erhöhung der Kalziumkonzentration einhergeht, eine Rolle zu spielen. Auch die erhöhte Expression von GSTO1-1 in strahlungsresistenten Zellen sowie die Reduktion der GSTO1-1-mRNA im Gewebe von Alzheimer- und Parkinson-Patienten spricht für eine Rolle der GSTO1-1 beim Schutz vor Apoptose (Kodym et al., 1999; Li et al., 2003). Auch der cGMP/cGK-Signalweg ist für das Überleben neuronaler Zellen von Bedeutung und die cGK in der Lage die cGMP-regulierte Expression der Apoptose-assoziierten Gene Tpx-1 (Thioredoxinperoxidase-1) und Bcl-2 zu vermitteln (Fiscus, 2002; Ciani et al., 2002a; Andoh et al., 2003; Becker and Bonni, 2004). Daher könnte die im cGKI-defizienten Cerebellum beobachtete Erhöhung der GSTO1-1-Expression auch hier mit einer verstärkten Stresssituation korreliert sein. Interessanterweise wurde der Ryanodin-Rezeptor als Substrat der cGKI beschrieben (Suko et al., 1993; Lu and Hawkins, 2002).

4.3.1.1.3. ADP-Ribosylierungsfaktor-ähnliches Protein 3 (Arl3)

Arl3 gehört als Mitglied der ARF-Unterfamilie neben den Ras-, Rab- und Rho-Unterfamilien zur Ras-Superfamilie von GTP-bindenden Proteinen (Cavenagh et al., 1994). Obwohl einige Mitglieder der ARF-Familie beim intrazellulären Vesikeltransport beteiligt sind, ist die Funktion von Arl3 noch unklar. Es konnte gezeigt werden, dass die PDE δ -Untereinheit der cGMP-regulierten Phosphodiesterase 6 (PDE6) mit Arl3 im GTP-gebundenen Zustand interagiert und die Dissoziation von GTP inhibiert (Linari et al., 1999). Ob die PDE6 bzw. deren δ -Untereinheit eine Interaktion mit der cGKI eingeht, ist nicht bekannt. Bislang konnten die PDE5 als Substrat der cGKI detektiert werden, sowie andere GTP-bindende Proteine wie RhoA und rap1b (Wang and Robinson, 1997; Pfeifer et al., 1999; Sauzeau et al., 2000; Shimizu-Albergine et al., 2003).

4.3.1.2. Untersuchungen zum Phosphorylierungsmuster

Um mögliche Substrate der cGKI zu identifizieren wurden im Alter P12 2D-Gele mit dem Fluoreszenzfarbstoff „Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain“ (Molecular Probes) gefärbt, der die Phosphatgruppen der Aminosäuren Serin, Threonin und Thyrosin detektiert. Nach dieser Prozedur wurden die Gele mit Coomassie gefärbt und hinsichtlich des Proteinexpressionsmusters verglichen (siehe oben). Fünf Proteinspots, die eine deutliche Phospho-Färbung aufwiesen und in mindestens zwei von drei Gelpaaren im WT stärker gefärbt waren, wurden aus den entsprechenden Coomassie-gefärbten Gelen ausgeschnitten und massenspektrometrisch identifiziert. Bis auf einen Fall konnten in jedem der Proteinspots mindestens zwei verschiedene Proteine identifiziert werden. Es konnte somit bislang nicht festgestellt werden, welches dieser Proteine die Phospho-Färbung hervorrief.

Interessanterweise konnte pro ausgeschnittenem Spot je ein Protein identifiziert werden, dessen Aminosäuresequenz eine putative cAK/cGK-Phosphorylierungskonsensussequenz aufwies. Dazu zählen das Hitzeschockprotein 90 (HSP90), der Arginin-Serin-reiche Spleißfaktor 3, das NDRG4-Protein und das Eps15R-Protein. NDRG4 könnte evtl. im Zusammenhang mit der Wegfindungsfehler-Analyse cGKI-defizienter Mäuse interessant sein, da NDRG4 in PC12-Zellen beim Neuriten-Wachstum eine Rolle spielt und die NGF-abhängige Aktivierung des Transkriptionsfaktors AP-1 hemmt (Ohki et al., 2002). Das Chaperon HSP90 ist u.a. für die korrekte Faltung, Lokalisation und Stabilisierung diverser Proteine wichtig und konnte als Interaktionspartner der löslichen Guanylatzyklase (sGC), dem Hauptrezeptor für NO beschrieben werden (Papapetropoulos et al., 2005). HSP90 ist nicht nur wichtig für die Aktivität der sGC sondern auch an deren Translokation zur Zellmembran beteiligt (Postnikov et al., 2005; Sun et al., 2005).

Um zu klären, ob diese Proteine wirklich Substrate der cGKI im Cerebellum darstellen, sind jedoch weitere Untersuchungen nötig. Zudem konnte mit der Software-basierten Quantifizierung weder für alle Gelpaare noch für alle Spots ein signifikanter Unterschied in der Färbung beobachtet werden.

4.3.1.3. Anmerkungen zur Methode

Nachteilig an der 2D-Gelelektrophorese ist, dass die Gele untereinander kein exakt gleiches Laufverhalten zeigen. Um diese Variabilität so gering wie möglich zu halten, wurden in der zweiten Dimension je nach Kapazität der Kammer (2-6 Gele) möglichst viele Gele gleichzeitig aufgetrennt und jeweils Gelpaare (WT vs. KO) aus einem Lauf miteinander verglichen. Für die Auswertung der Proteinspots, wurden diejenigen ausgeschlossen, die in den äußersten Randregionen des Gels (im sehr basischen oder sauren Bereich, sowie im hochmolekularen Bereich) lagen, da die Auftrennung in diesen Bereichen relativ variabel ist, sowie Spots die in lokal schlecht aufgetrennten Regionen (z.B. Schmier oder Streifenbildung) lagen. Für die Untersuchung der Proteinexpression wurden, bis auf einen Fall, nur Proteinspots berücksichtigt, die nach der Auswertung oder Quantifizierung in allen drei untersuchten Gelpaaren als reguliert galten. Ausnahme ist die ATP5H, welche in zwei Gelpaaren eine sehr deutliche Regulation zeigte, im dritten Gelpaar jedoch nicht (siehe Abb. 37). Generell konnte auch innerhalb gleicher Genotypen eine gewisse Variabilitäten im Expressions- und Phosphorylierungsmuster beobachtet werden, weshalb eine Erhöhung der Versuchstieranzahl für die Absicherung der Ergebnisse sinnvoll wäre.

Bezüglich der Untersuchung zu Veränderungen im Phosphorylierungsmuster konnte im Rahmen der Arbeit bislang nur diese relativ grobe Übersicht angefertigt werden. Für weitere Untersuchungen sind jedoch einige methodische Verbesserungen sinnvoll und nötig. Aufgrund der hohen Kosten des Phosphoprotein-Farbstoffs wurden die Untersuchungen zum Phosphorylierungsmuster mit kleinen Gelen durchgeführt. Nachteil ist hier natürlich das geringere Trennvermögen und die daraus resultierende Überlappung von verschiedenen Proteinspots. Eine Eingrenzung des pH-Bereichs bei gleicher Gelgröße bzw. die Verwendung größerer Gele bzw. längerer IPG-Streifen wären ratsam, um die Auftrennung der Proteine zu verbessern. Auch hinsichtlich der Phospho-Färbung gibt es evtl. Verbesserungsmöglichkeiten. Trotz gleicher Färbezeit der Gele, variierten diese doch relativ stark in der Anzahl der gefärbten Spots und in der allgemeinen Farbintensität. Zudem kam es teilweise zu einer störenden Hintergrundfärbung. Möglicherweise lässt sich dies mit dem inzwischen von der Herstellerfirma überarbeiteten Färbeprotokoll beheben. Optimieren lässt sich vermutlich auch die Dokumentation der Gele, hinsichtlich der Fluoreszenz-Anregungszeit, der Ausleuchtung und der Auflösung. Aufgrund der relativ geringen Anzahl der gefärbten Proteinspots wurde versucht die Proteinmenge zu erhöhen, allerdings mit mäßigem Erfolg. Allgemein lässt sich sagen, je geringer die Anzahl der Phospho-gefärbten Spots ist, desto schwieriger ist es mit Hilfe der Software die entsprechenden Proteinspots im Coomassie-gefärbten Gel zu identifizieren. Zudem ist es möglich, dass ein im Phospho-Gel stark gefärbter Spot im Coomassie-Gel aufgrund der geringen Expression nicht sichtbar ist. Auch mögliche phosphorylierungsbedingte Spotverschiebungen lassen sich nur schwer detektieren. Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Phospho-Spots, ließen sich jedoch recht eindeutig dem entsprechenden Coomassie-Spot zuordnen. Trotzdem sind weitere Untersuchungen nötig um genaue Aussagen zum cGKI-abhängigen Phosphorylierungsmuster treffen zu können.

4.3.2. Suche nach intrazellulären Interaktionspartnern der cGKI α im Zweihybriden Hefesystem

Mit Hilfe des Zweihybriden Hefesystems konnten bereits Troponin T (Yuasa et al., 1999), MBS (Surks et al., 1999) und GKAP42 (Yuasa et al., 2000) als Substrate der cGKI α sowie CRP2 (Huber et al., 2000), IRAG (Ammendola et al., 2001) und TFII-I (Casteel et al., 2002) als Substrate der cGKI β detektiert bzw. bestätigt werden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit, wurde zur Identifizierung intrazellulärer Bindungspartner der cGKI α eine cDNA-Bibliothek von Mäusen des Embryonalstadiums E17 (Fa. Clontech) mit Hilfe des Zweihybriden Hefesystems durchmustert. Als Köderplasmid diente der komplette offene Leserahmen der cGKI α im BD-Vector pGBT9. Mit der DNA-Methyltransferase 3a (Dnmt3a) und der Hydroxysteroidsulfotransferase 2b1b (Sult2b1b) konnten zwei potentielle Interaktionspartner der cGKI α im Zweihybriden Hefesystem gefunden werden, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll.

4.3.2.1. Hydroxysteroidsulfotransferase 2b1b (Sult2b1b)

Die von der DNA-Sequenz des Klons 13 abgeleitete Aminosäuresequenz ergab eine 100 % ige Übereinstimmung mit der Sult2b1b. Mit der Isoform Sult2b1a stimmte die Aminosäuresequenz zu 97 % überein, weshalb auch eine Interaktion der cGKI α mit dieser Isoform nicht auszuschließen ist, aber nähere Untersuchungen zur genauen Bindungsregion erfordert. Beide Isoformen unterscheiden sich nur in ihrem N-terminalen Bereich, in welchem nur bei der Sult2b1a eine cAK/cGK-spezifische Phosphorylierungskonsensussequenz vorkommt. Da die cDNA des Klons dem N-terminalen Bereich der Sult2b1b entspricht, wird diese Phosphorylierungsstelle nicht mit abgedeckt.

Allgemein katalysieren die Sulfotransferasen die Sulfatierung verschiedener Hormone, Neurotransmitter, Pharmaka und xenobiotischer Verbindungen, indem sie eine Sulfonatgruppe (SO_3^{-1}) vom universalen Sulfonat-Donor PAPS (3'Phosphoadenosin 5'Phosphosulfat) auf ein geeignetes Rezeptormolekül übertragen. Die Sulfatierung erhöht die Wasserlöslichkeit der meisten Komponenten, kann aber auch zur Bioaktivierung verschiedener Metaboliten führen (Weinshilboum et al., 1997; Strott, 2002). Bislang ist wenig über die Expression und Funktion beider Maus Sult2b1-Isoformen bekannt. Shimizu und Kollegen konnten die mRNA der Sult2b1a hauptsächlich im Gehirn und Rückenmark detektieren und die mRNA der Sult2b1b in Haut, Darm und Muskel der Maus. Beide Isoformen waren in der Lage Cholesterinsulfat, Pregnenolonsulfat und Dehydroepiandrosteronsulfat zu produzieren, wobei die Sult2b1a eine Präferenz für Pregnenolon als Substrat aufwies und die Sult2b1b für Cholesterin (Shimizu et al., 2003). Aufgrund der Expression im Gehirn und Rückenmark sowie der Fähigkeit Pregnenolonsulfat (ein während der Entwicklung des Nervensystems wichtiges Neurosteroid) zu bilden, scheint die Sult2b1a ein interessanterer möglicher Interaktionspartner für cGKI α im Nervensystem zu sein. Aus Zeitgründen, konnte aber im Rahmen der Arbeit bislang weder die Interaktion der cGKI α mit der Sult2b1b, noch mit der Sult2b1a weitergehend überprüft werden.

4.3.2.2. DNA-Methyltransferase 3 (Dnmt3a)

Die von den DNA-Sequenzen der Klone 4 und 8 abgeleiteten Aminosäuresequenzen ergaben in der Datenbankanalyse eine Übereinstimmung mit beiden Isoformen der murinen DNA (Cytosin-5) - Methyltransferase 3a (Dnmt3a): der Dnmt3a1 und Dnmt3a2 (siehe Kap. 3.4.2.2.1.). Die Isoform Dnmt3a2 ist bis auf eine um 219 Aminosäuren kürzere N-terminale Region identisch mit der Isoform Dnmt3a1 (Chen et al., 2002). Da die DNA-Sequenzen beider Klone den in beiden Isoformen identischen Aminosäurebereich abdecken, ist eine Interaktion der cGKI α mit beiden Isoformen wahrscheinlich. Beide Isoformen besitzen je eine cAK/cGK-spezifische Phosphorylierungskonsensussequenz, die jedoch durch die DNA-Sequenzen der Klone nicht abgedeckt wurde.

Bevor die weiteren Untersuchungen zur Interaktion beider Proteine beschrieben und diskutiert werden, soll an dieser Stelle ein allgemeiner Überblick über die DNA-Methylierung und die beteiligten DNA-Methyltransferasen gegeben werden.

4.3.2.2.1. DNA-Methylierung und DNA-Methyltransferasen

Die DNA-Methylierung ist eine posttranslationale Modifikation, bei der DNA-Methyltransferasen eine Methylgruppe vom Donor AdoMet (S-adenosyl-L-methionine) an das Cytosin der DNA hängen. Dies geschieht in bestimmten Abschnitten vor dem zu regulierenden Gen, den so genannten CpG-Inseln (palindrome Cytosin Guanin-Sequenzen) und gelegentlich auch an anderen Sequenzen. In Eukaryoten sind zwei Arten der DNA-Methylierung bekannt. Zum einen wird ein einmal vorhandenes Methylierungsmuster über viele Zellteilungen sehr genau aufrechterhalten. Dies wird durch eine Erhaltungsmethyltransferase gewährleistet, die nach der DNA-Replikation entstehende hemimethylierte CG-Sequenzen selektiv erkennt und am unmethylierten Cytosin modifiziert, aber andere vollständig unmethylierte CG-Stellen nicht methyliert. Zum anderen ist bekannt, dass im Zuge der Embryogenese von Säugern mehrere Wellen von Demethylierung und *de novo* Methylierung von CG-Erkennungsstellen stattfinden, was eine *de novo* Methylierungsaktivität verlangt (Reik et al., 2001). Im Zuge dieser Remethylierung werden 70-80 % der CG-Dinukleotide der DNA in einer gewebsabhängigen Art und Weise methyliert. Wie die DNA-Methyltransferasen reguliert werden, um zum richtigen Zeitpunkt die richtigen Sequenzen neu zu methylieren, aber unter anderen Umständen sehr genau das vorhandene Methylierungsmuster der DNA zu kopieren, ist weitgehend unverstanden. In Eukaryoten geht die Methylierung der DNA in der Promotorregion eines Gens generell mit

seiner transkriptionellen Inaktivierung einher. Dieses Phänomen verhindert, dass alle Gene in einem Gewebe oder einer Zelle gleichzeitig transkribiert werden. Eine andere Funktion von DNA-Methylierung scheint in einem Schutz des Genoms vor fremder DNA zu liegen, insbesondere vor „eigennützigen“ DNA-Sequenzen wie z.B. Transposons, repetitiven Sequenzen und Retroviren. Weiterhin wird die Packung der DNA in Chromosomen sowie eine Reihe von epigenetischen Phänomenen durch DNA-Methylierung beeinflusst, z.B. Imprinting und die Inaktivierung eines X-Chromosoms bei weiblichen Säugern (Jaenisch, 1997; Bestor, 2000; Hermann et al., 2004). Störungen der DNA-Methylierung können an der Entstehung verschiedener Krankheiten, insbesondere Krebserkrankungen beteiligt sein (Xu et al., 1999; Das and Singal, 2004).

In Säugetieren konnten bislang fünf verschiedene Mitglieder der DNA-Methyltransferasen (Dnmt) identifiziert werden: die Dnmt1, Dnmt2, Dnmt3a, Dnmt3b und Dnmt3l. Die Methyltransferasen bestehen aus einem N-terminalen regulatorischen Teil und einem C-terminalen katalytischen Teil. Der in allen Methyltransferasen sehr ähnliche C-terminale Teil weist eine hohe Sequenzähnlichkeit zur prokaryotischen DNA-Methyltransferase auf und enthält 10 konservierte Aminosäuresequenzmotive, die für die katalytische Aktivität dieser Enzyme von Bedeutung sind. Die DNA-Methyltransferase-Familien Dnmt1 und Dnmt3 besitzen eine N-terminalen regulatorischen Teil, der je nach Familie u.a. eine PB-Domäne („*proliferating cell nuclear antigen-binding domain*“), Kernlokalisierungssignal, ein Cysteinereiches Zinkfinger-DNA-Bindungsmotiv, eine PH-Domäne („*polybromo homology domain*“) und eine PWWP-Tetrapeptid-Chromatin-bindende-Domäne enthält (Bestor, 2000; Turek-Plewa and Jagodzinski, 2005).

Während die Dnmt1 hauptsächlich als Erhaltungsmethyltransferase fungiert, wurden die Dnmt3a und die Dnmt3b als *de novo* Methyltransferasen beschrieben (Okano et al., 1999). Die Dnmt3l selbst ist nicht katalytisch aktiv und benötigt als Interaktionspartner die Dnmt3a und Dnmt3b (Hata et al., 2002; Suetake et al., 2004). Die Dnmt2 besitzt keine N-terminale regulatorische Domäne und ihre Funktion ist noch unklar (Hermann et al., 2004).

4.3.2.2.2. Interaktion der cGKI α mit der Dnmt3a1

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte also im Zweihybriden Hefesystem eine putative Interaktion der cGKI α mit beiden Isoformen (Dnmt3a1 und Dnmt3a2) der *de novo* Methyltransferase Dnmt3a gezeigt werden. Im weiteren Verlauf der Arbeit war es zunächst nur möglich die Interaktion der Dnmt3a1 mit der cGKI α weiter zu untersuchen. Mit der Transfektion von COS 7-Zellen mit FLAG-Dnmt3a1 und cGKI α und anschließender

Immunpräzipitation (IP) konnte die Interaktion beider Proteine in einem anderen zellulären System bestätigt werden (siehe Kap.3.4.2.3.). Die Interaktion von cGKI α und Dnmt3a1 ist vermutlich transient, da die cGKI α verglichen mit dem Lysat im Eluat der IP nicht aufkonzentriert werden konnte.

4.3.2.2.2.1. Expression der Dnmt3a1 und Dnmt3a2 im Nervensystem

Aufgrund der Interaktion beider Proteine interessierte, ob die Dnmt3a wie die cGKI α im Nervensystem exprimiert wird. Gewebe-Lysate von Cortex, Cerebellum und Spinalganglien wurden mit einem Antikörper gegen Dnmt3a hinsichtlich einer Expression untersucht (siehe Kap. 3.4.2.4.). Sowohl im Cerebellum des Alters P16 als auch im Cortex des Alters P2 und P16, konnte nur die Dnmt3a1 Isoform detektiert werden, nicht aber die Dnmt3a2. Im Cortex konnte im Alter P16, verglichen mit P2, eine Zunahme der Expression beobachtet werden. In den Spinalganglien der Embryonalstadien E12-E14 hingegen, konnte sowohl eine Expression der Dnmt3a1 als auch der Dnmt3a2 gefunden werden, wobei die Dnmt3a2 stärker exprimiert wurde. Ähnliche Beobachtungen in der altersabhängigen Expression beider Isoformen wurden vor kurzem von Feng und Kollegen gemacht, welche ebenfalls die Expression der Dnmt3a im Nervensystem untersuchten (Feng et al., 2005). Sie konnten die Dnmt3a2 im ZNS ab dem Entwicklungsstadium E11,5 bis P7 detektieren. Die Dnmt3a1 zeigte hingegen eine Expression vom Embryonalstadium (E11,5) an bis ins adulte Alter, mit einer deutlichen Expressionszunahme in den ersten drei Wochen der Postnatalentwicklung und einer Expressionsabnahme im adulten Tier. Durch transgene Konstrukte konnte die Dnmt3a im Cerebellum, Striatum, Bulbus olfactorius und Hippocampus detektiert werden. Mit Hilfe immunzytochemischer Untersuchungen wurde die Dnmt3a in den Zellkernen von neuronalen Vorläuferzellen, postmitotischen Neuronen und Oligodendrozyten lokalisiert. Die mRNA der humanen Dnmt3a konnte im Rückenmark detektiert werden (Xie et al., 1999).

4.3.2.2.2.2. Subzelluläre Verteilung der cGKI α und der Dnmt3a

Für eine direkte Interaktion beider Proteine sollten diese zumindest zeitweilig in den gleichen Kompartimenten der Zelle lokalisiert sein. Die Dnmt3a1 wurde bislang als nukleäres und hauptsächlich mit Heterochromatin assoziiertes Protein beschrieben. Hingegen war die Dnmt3a2 im Zellkern mit Euchromatin assoziiert und konnte zudem im Zytoplasma detektiert werden (Margot et al., 2001; Kim et al., 2002; Chen et al., 2002).

Die cGKI wurde bislang hauptsächlich als Zytoplasmatisches Protein beschrieben, konnte allerdings auch in zellulären Membranen, zytoskelettalen Strukturen und im Zellkern lokalisiert werden (Pryzwansky et al., 1990; Keilbach et al., 1992; Pryzwansky et al., 1995; el

Daher et al., 1996; Browning et al., 2001). Weiterhin wurde beschrieben, dass eine Erhöhung der cGMP-Konzentration zu einer verstärkten Translokation der cGKI in den Zellkern führte (Gudi et al., 1997), obwohl eine andere Arbeitsgruppe dies nicht bestätigen konnte (Collins and Uhler, 1999). Ein von Gudi und Kollegen in der katalytischen Region beider cGKI-Isoformen identifiziertes Kernlokalisierungssignal soll in Abhängigkeit vom cGMP-Spiegel beim aktiven Transport der Kinase in den Zellkern beteiligt sein (Gudi et al., 1997).

Die endogene Expression und subzelluläre Verteilung der Dnmt3a und cGKI α wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst in HEK293-Zellen untersucht (siehe Kap. 3.4.2.5.). Lysate verschiedener Zellfraktionen (Zytosol, Membran und Kern) wurden mit Antikörpern hinsichtlich der Expression beider Proteine getestet. Die Dnmt3a1 konnte nur in der Kern-Fraktion der Zellen detektiert werden. Die Isoform Dnmt3a2 wird entweder nicht oder nur sehr schwach in HEK 293 Zellen exprimiert, da sie mit den geladenen Proteinmengen in keiner der Fraktionen detektiert werden konnte. Die cGKI α wurde vorwiegend in der Zytosol-Fraktion detektiert und zu einem geringeren Teil in der Membran-Fraktion. Eine schwächere Expression konnte auch in der Kern-Fraktion detektiert werden, allerdings kann hier aufgrund der Kontrollfärbung mit γ -Tubulin nicht gänzlich ausgeschlossen werden, dass in der angereicherten Kern-Fraktion noch zytosolische Bestandteile enthalten sind, die zu der Expression führen bzw. beitragen. Für eine schwache Expression der cGKI α im Kern sprechen immunzytologische Untersuchungen der HEK293-Zellen, in denen neben einer starken Färbung des Zytoplasmas auch die Nukleoli des Zellkerns gefärbt waren. Die Lokalisation der Dnmt3a1 im Kern konnte immunzytologisch in HEK293-Zellen nicht bestätigt werden, da der Antikörper sich für diese Art der Färbung als nicht spezifisch genug erwies. Aus diesem Grund konnten z. B. auch keine immunhistochemischen Untersuchungen zur Kolokalisation der Dnmt3a und cGKI α in den Spinalganglien mit diesem Antikörper durchgeführt werden. Für immunhistochemische und immunzytologische Untersuchungen wären spezifische Antikörper gegen Dnmt3a, die auch zwischen beiden Isoformen unterscheiden können und möglichst keine Dnmt3b-Isoformen erkennen nötig.

Um trotzdem einen Eindruck von der subzellulären Verteilung beider Proteine in Zellen zu bekommen, wurden COS 7-Zellen mit cGKI α und FLAG-Dnmt3a1 kotransfiziert und mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt. Zusätzlich wurde ein Teil der Zellen mit dem cGK-Aktivator 8-pCPT-cGMP stimuliert. (COS 7-Zellen wurden genutzt, da die ursprünglich verwendeten HEK293-Zellen sehr empfindlich auf die zahlreichen Waschschrte reagierten und zu wenige Zellen die Prozedur unbeschadet überstanden.) In den transfizierten COS 7-

Zellen konnte die in den HEK293-Zellen beobachtete nukleäre Lokalisation der Dnmt3a1 bestätigt werden. Die cGKI α zeigte ein sehr variables Verteilungsmuster und konnte sowohl im Zytoplasma als auch im Kern lokalisiert werden. Innerhalb des Zytoplasmas konnte die stärkste Expression im perinukleären Bereich detektiert werden, was eine Assoziation der cGKI α mit intermediären Filamenten und dem sarkoplasmatischen Retikulum bzw. Golgi-Apparat vermuten lässt. Der Grad der cGKI α -Expression im Kern variierte von kaum bis deutlich detektierbar. Eine Kolokalisation beider Proteine konnte daher in einigen der Zellen im Zellkern beobachtet werden (siehe Abb. 47). Weder die Dnmt3a1 noch die cGKI α zeigten eine Veränderung in der subzellulären Verteilung nach Stimulation der Zellen mit 8-pCPT-cGMP.

4.3.2.2.3. cGKI α und die Dnmt1

Neben der Dnmt3a1 wurden auch zwei andere interessante DNA-Methyltransferasen, die Dnmt1 und die Dnmt3b1, in COS 7-Zellen mittels Immunpräzipitation hinsichtlich einer Interaktion mit der cGKI α untersucht (siehe Kap. 3.4.2.6.1.). Nur die DNA-Methyltransferase 1 (Dnmt1) zeigte in der IP eine Interaktion mit der cGKI α . Untersuchungen zur subzellulären Verteilung beider Proteine in transfizierten COS 7-Zellen zeigten wie bei der Dnmt3a1 eine mögliche Kolokalisation der cGKI α und Dnmt1 im Zellkern. Die Dnmt1 besteht aus 1620 Aminosäuren mit einer entsprechenden molaren Masse ca. 180 kD und gehört zum Typus der so genannten Erhaltungsmethyltransferasen. Interessanterweise zeigt sie sowohl in der Embryonalentwicklung als auch in der Postnatalentwicklung ein breites Expressionsmuster im Nervensystem, wo sie im Zytoplasma der Neurone lokalisiert werden konnte (Goto et al., 1994; Inano et al., 2000). Die mRNA der Dnmt1 wurde u. a. im Rückenmark, Cerebellum, Cortex, Hippocampus und Bulbus olfactorius lokalisiert (Goto et al., 1994; Xie et al., 1999). Auch wenn die Expression der Dnmt1 während der Embryonalentwicklung und frühen Postnatalentwicklung am stärksten ist, kann sie auch noch in adulten Tieren in postmitotischen Zellen beobachtet werden. Die Aminosäuresequenz der Dnmt1 weist sieben putative cGK/cAK-spezifische Phosphorylierungskonsensussequenzen auf.

4.3.2.2.4. cGKI α und die DNA-Methyltransferasen

Zusammenfassend konnte die im Zweihybriden Hefesystem gefundene Interaktion der cGKI α mit der Dnmt3a1 in COS 7 Zellen mittels Immunpräzipitation verifiziert werden. (Die ebenfalls mögliche Interaktion der cGKI α mit der Dnmt3a2-Isoform konnte bislang noch nicht weiter überprüft werden). Desweiteren konnte mittels IP auch eine Interaktion der

cGKI α mit der Dnmt1 gezeigt werden. Untersuchungen zur subzellulären Verteilung lassen eine Interaktion der Kinase mit der Dnmt3a1 und der Dnmt1 im Zellkern vermuten. Beide Methyltransferasen werden wie die cGKI α im Nervensystem exprimiert, allerdings sind weitere Untersuchungen nötig, um zu klären ob auch die endogenen Proteine in Neuronen kolokalisiert sind. Neben zusätzlichen Interaktionstests in anderen Zellsystemen sind genauere Untersuchungen hinsichtlich der Bindungsregion, die für die Interaktion beider Proteine entscheidend ist, nötig. In der Arbeit wurden bereits der N-Terminus und der C-Terminus der Dnmt1 hinsichtlich einer Interaktion mit der Kinase positiv getestet. Da sich die Konstrukte jedoch in einer Region von 48 Aminosäuren überlappten sind weitere Untersuchungen nötig um die Bindungsregion näher einzuschränken. Von großem Interesse ist natürlich, ob die cGKI α in der Lage ist, die Dnmt3a1, die Dnmt3a2 und die Dnmt1 an den cAK/cGK-spezifischen Phosphorylierungsstellen zu phosphorylieren. Über die Phosphorylierung der Methyltransferasen ist bislang fast nichts bekannt, obwohl sie für diverse Kinasen spezifische Phosphorylierungssequenzen aufweisen. Für die Dnmt1 wurde zwar eine Hauptphosphorylierungsstelle (Serin⁵¹⁴) beschrieben, jedoch ist die funktionelle Bedeutung unklar (Glickman et al., 1997). Für die Dnmt3a wurde eine andere posttranslationale Modifikation, die Sumoylation, beschrieben, welche sowohl die Interaktion der Dnmt3a mit Histondeacetylasen verhindert als auch dadurch bedingt, die Fähigkeit die Transkription zu unterdrücken (Ling et al., 2004).

4.3.2.2.5. DNA-Methylierung und transkriptionelle Inaktivierung

Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie die DNA-Methylierung zur transkriptionellen Inaktivierung führt. Zum einen kann die Methylierung der DNA des Promotorbereichs direkt die Bindung des entsprechenden Transkriptionsfaktors verhindern. Andererseits kann die DNA-Methylierung auch indirekt die Bindung eines Transkriptionsfaktors verhindern, indem bestimmte Proteine wie die Methyl-CpG-bindenden Proteine MeCP und MBD an die methylierte DNA binden und so die Transkription unterdrücken. Eine weitere Möglichkeit, die Transkription zu unterdrücken, besteht in der Interaktion von MeCP mit dem Histondeacetylase-Komplex bzw. in der direkten Interaktion der DNA-Methyltransferasen mit verschiedenen Methyl-CpG-bindenden Proteinen und Histondeacetylasen (HDAC). Verschiedene Histon-Modifikationen beeinflussen die Chromatinstruktur und somit die Transkription. Transkriptionell aktives Chromatin (Euchromatin) ist mit DNA-Demethylierung sowie Methylierung und Acetylierung von Histonen assoziiert. Der Acetylierungsgrad der Histone wird durch Histonacetylasen (HAT) und Histondeacetylasen

(HDAC) aufrechterhalten (Newell-Price et al., 2000; Bird, 2002; Jaenisch and Bird, 2003; Bottomley, 2004; Turek-Plewa and Jagodzinski, 2005). Sowohl für die Dnmt3a als auch für die Dnmt1 konnten Interaktionen und z.T. Komplex-Bildungen mit HDAC, MBD gezeigt werden sowie mit diversen anderen Proteinen, welche die Bildung von Euchromatin und die Transkription unterdrücken (Tatematsu et al., 2000; Robertson et al., 2000; Rountree et al., 2000; Fuks et al., 2001; Fuks et al., 2003; Datta et al., 2003). Die DNA-Methyltransferasen Dnmt1, Dnmt3a und Dnmt3b interagieren auch untereinander (Kim et al., 2002; Margot et al., 2003). Die Dnmt1, welche hauptsächlich hemimethylierte DNA-Stränge methyliert, ist durch Stimulation der Dnmt3a in der Lage auch *de novo* Methylierungsaktivitäten zu zeigen (Fatemi et al., 2002; Gowher et al., 2005). Außerdem bindet Dnmt3l an Dnmt3a und Dnmt3b, deren Enzymaktivität durch diese Bindung verstärkt wird (Hata et al., 2002; Suetake et al., 2004). Die Dnmt1 ist zudem in der Zell-Zyklus-Kontrolle involviert und interagiert mit PCNA und p21WAF1, einem Inhibitor der Cyclin-abhängigen Kinasen (Leonhardt et al., 1992; Chuang et al., 1997).

4.3.2.2.6. cGK und Genexpression

Ob und inwiefern die cGKI α die Dnmt3a und Dnmt1 in ihrer Funktion beeinflussen kann, bleibt zu untersuchen. Jedoch konnte auch für die cGK eine Beteiligung an der Regulation der Genexpression gezeigt werden (Pilz and Casteel, 2003). So wird die durch NO bzw. cGMP induzierte Regulation der Genexpression von z.B. *c-fos*, RhoA, Bcl-2 und Tpx-1 über die cGK vermittelt (Gudi et al., 1996; Idriss et al., 1999; Ciani et al., 2002a; Sauzeau et al., 2003; Andoh et al., 2003). CREB, TFII-I und ATF-1 sind Transkriptionsfaktoren, welche direkt durch cGMP-abhängige Phosphorylierung kontrolliert werden (Gamm et al., 1995; Lu et al., 1999; Gudi et al., 2000; Casteel et al., 2002; Sauzeau et al., 2003; Jurado et al., 2004). Diese Transkriptionsfaktoren sind wiederum an der Modulation von Chromatin beteiligt. So interagiert die Histondeacetylase 3 mit dem Transkriptionsfaktor TFII-I, der als Substrat der cGKI β beschrieben wurde und das CREB-bindende Protein (CBP) ist in der Lage Histon 4 zu acetylieren (Roy, 2001; Wen et al., 2003; Levine et al., 2005). Interessanterweise wurde Histon 2b *in vitro* als Substrat der cGK beschrieben (Hashimoto et al., 1976). Auch die Aminosäuresequenzen von HDAC1 (einem Interaktionspartner der Dnmt3a und Dnmt1) sowie MBD1 und MBD4 weisen putative cAK/cGK-spezifische Phosphorylierungskonsensussequenzen auf, eine Interaktion mit der cGK wurde aber bislang nicht gezeigt.

Neben einer direkten Kontrolle von Transkriptionsfaktoren durch die cGK ist auch eine indirekte z.B. über Signalwege der MAP-Kinase und RhoA wahrscheinlich (Komalavilas et al., 1999; Gudi et al., 2002; Sung et al., 2004). Obwohl für die cGK ein Kernlokalisierungssignal identifiziert wurde, wird auch die Bindung der cGK an Zelltyp-spezifische Ankerproteine als Möglichkeit angesehen, um die Kinase zu bestimmten Zellkompartimenten zu transportieren und Interaktionen mit verschiedenen Substraten zu ermöglichen (Mochly-Rosen, 1995; Gudi et al., 1997; Yuasa et al., 2000; Browning et al., 2001; Casteel et al., 2002).

4.3.2.2.7. Rolle der DNA-Methyltransferasen und der DNA-Methylierung im Nervensystem

Wie bereits beschrieben, werden die Dnmt3a und Dnmt1 entwicklungsabhängig im Nervensystem exprimiert. Analysen der KO-Tiermodelle zeigten, dass die DNA-Methylierung durch Dnmt3a, Dnmt3b und Dnmt1 während der embryonalen und postnatalen Entwicklung von Neuronen entscheidend für deren Funktion und Überleben ist (Okano et al., 1999; Fan et al., 2001). Der frühe Tod der KO-Tiere erschwert jedoch häufig genauere Untersuchungen bezüglich des Nervensystems, weshalb zumindest für die Dnmt1 begonnen wurde konditionale KO-Modelle zu entwickeln, um z.B. die Funktion der Dnmt1 im Zytoplasma postmitotischer Neurone, deren Methylierungsmuster bereits etabliert ist, zu untersuchen. Eine mögliche Rolle der Dnmt1 könnte in der DNA-Reparatur liegen. Unter bestimmten Umständen kann die Dnmt1 jedoch auch *de novo* Methylierungsaktivität übernehmen und könnte so zusammen mit der Dnmt3a an der Regulation verschiedener transkriptionsabhängiger Prozesse neuronaler Plastizität beteiligt sein (Tucker, 2001). In kortikalen GABAergen Interneuronen von Schizophrenie-Patienten konnte eine erhöhte Expression der Dnmt1-mRNA festgestellt werden. Diese führt zu einer Dnmt1-vermittelten Hypermethylierung der Promotoren von *reelin* und *GAD67* und deren verminderter Expression in Schizophrenie-Gehirnen (Veldic et al., 2004; Noh et al., 2005). Untersuchungen in nicht-neuronalen Zellen konnten zeigen, dass die Dnmt1 auch unabhängig von der DNA-Methylierung bzw. Histondeacetylierung in der Lage ist Genexpression zu induzieren (Milutinovic et al., 2004).

Bislang wurden zwei neurologisch-assoziierte Krankheiten des Menschen mit Störungen der DNA-Methylierung in Verbindung gebracht. Menschen mit ICF-Syndrom zeigen eine Mutation in der C-terminalen Methyltransferase-Domäne von Dnmt3b, während Patienten mit Rett-Syndrom Mutationen im MeCP2-Gen aufweisen (Xu et al., 1999; Jaenisch and Bird, 2003).

Welche Rolle die cGKI α zusammen mit der Dnmt3a oder der Dnmt1 letztlich im Nervensystem u.a. bei der axonalen Wegfindung spielt, bleibt zu untersuchen. Dabei ist interessant, ob die cGKI α durch eine Interaktion mit DNA-Methyltransferasen in der Lage ist, die entwicklungs- und gewebsabhängige neuronale Genexpression zu beeinflussen.