

5. Zusammenfassung/ Summary

5.1. Zusammenfassung

Obwohl die molekularen Prozesse bei der axonalen Wegfindung, während der Embryonalentwicklung, in den vergangenen Jahren intensiv untersucht wurden, bleiben die Mechanismen der intrazellulären Signaltransduktion, die durch axonale Wegfindungsrezeptoren angesteuert werden, zum gegenwärtigen Zeitpunkt weitestgehend unverstanden. *In vitro*-Experimente der Arbeitsgruppe Poo wiesen jedoch auf eine Beteiligung der cGMP-vermittelten Signaltransduktion bei Richtungsentscheidungen von Wachstumskegeln hin (Song et al., 1998). In Übereinstimmung mit diesen *in vitro*-Daten wurde von Schmidt und Kollegen beobachtet, dass bei Abwesenheit der cGMP-abhängigen Kinase $I\alpha$ (cGKI α) die Wegfindung sensorischer Axone im Rückenmark gestört ist (Schmidt et al., 2002). Um mehr über die Funktion der cGKI α im Nervensystem und insbesondere beim axonalen Wachstum sensorischer Neurone zu erfahren, wurden in der vorliegenden Arbeit folgende Punkte untersucht:

a) Die Expression der cGKI α im embryonalen und frühen postnatalen Nervensystem der Maus wurde mit Hilfe eines isoformspezifischen Antikörpers in Ganzkörperfärbungen, Gewebeschnitten und Gewebe-Lysaten charakterisiert. Während der Embryonalentwicklung konnte eine Expression der cGKI α in verschiedenen Hirnnerven, assoziierten Hirnnervenkernen und Fasertrakten sowie in den präganglionären Neuronen des Sympathikus, Zellen des olfaktorischen Epithels und in der Chorda dorsalis beobachtet werden. Während der Postnatalentwicklung wurde die cGKI α z.B. von verschiedenen Neuronen im Bulbus olfactorius, Hippocampus, Cerebellum und Cortex exprimiert. Zudem konnte während der Postnatalentwicklung im Cerebellum und im Hippocampus eine entwicklungsabhängige Zunahme der Expression beobachtet werden. Dieses zeitliche und räumliche Expressionsmuster der cGKI α spricht für eine mögliche Rolle dieser Kinase beim axonalen Auswachsen, der Migration oder Differenzierung verschiedener Neurone.

b) Einige Zellen, die im Wildtyp eine Expression der cGKI α aufwiesen, wurden in cGKI-defizienten Mäusen hinsichtlich möglicher axonaler Wegfindungs- oder Migrationsfehler untersucht. Hierzu wurden immunhistochemische Untersuchungen mit verschiedenen Antikörpern und Silber/Nissl-Färbungen durchgeführt. Entgegen den Erwartungen konnten im Vergleich zum Wildtyp in keiner der untersuchten Strukturen (Hirnnerven, präganglionäre Neurone, periphere Spinalnerven, Hippocampus, Cerebellum und Bulbus olfactorius)

Wegfindungsfehler oder andere morphologische Unterschiede mit den verwendeten Methoden detektiert werden.

c) Nach Aktivierung durch cGMP phosphoryliert die cGKI verschiedene intrazelluläre Proteine, von denen hier jene untersucht wurden, die mit dem Aktinzytoskelett assoziiert sind (VASP, CRP2, Myosinphosphatase/Myosin IIB). Dabei konnte VASP anhand vergleichender Phosphorylierungsstudien an isolierten cGKI-defizienten- und Wildtyp-Spinalganglien eindeutig als Substrat der cGKI in sensorischen Neuronen identifiziert werden. Weiterhin wurden die entsprechenden KO-Mäuse in verschiedenen Embryonalstadien immunhistochemisch, mit Hilfe verschiedener Antikörper, bezüglich der in der cGKI-Maus gefundenen Wegfindungsfehler sensorischer Spinalganglienaxone untersucht. Es konnten weder in CRP2-, Myosin IIB- noch VASP-defizienten Embryonen Wegfindungsfehler der sensorischen Spinalganglienaxone detektiert werden; somit scheint - ungeachtet möglicher kompensatorischer Effekte - keines dieser Proteine an den Wegfindungsfehlern cGKI-defizienter Mäuse beteiligt zu sein.

d) Da keines der untersuchten, bekannten cGKI-Substrate für die Wegfindung sensorischer Axone von Bedeutung zu sein schien, war es im Rahmen dieser Arbeit erforderlich alternative Ansätze zu verfolgen, um Substrate und potentielle Interaktionspartner der cGKI bzw. cGKI α im Nervensystem zu finden, die möglicherweise auch in den Spinalganglien eine Rolle spielen könnten.

Zum einen wurde mit Hilfe der Zweidimensionalen Gelelektrophorese cGKI-defizientes- und Wildtyp-Cerebellum-Gewebe, nach Stimulation mit dem cGKI-Aktivator 8-pCPT-cGMP, hinsichtlich des Proteinexpressions- und Phosphorylierungsmusters verglichen, um Hinweise auf mögliche Substrate der cGKI zu erhalten. In den zunächst durchgeführten vergleichenden Untersuchungen zum Proteinexpressionsmuster konnten sowohl herunter- (die B22-Untereinheit der NADH-Q-Reduktase und die D-Kette der mitochondrialen ATP-Synthase) als auch hochregulierte Proteine (die Glutathion S-transferase omega 1 und das ADP-Ribosylierungsfaktor-ähnliche Protein 3) im cGKI-defizienten Gewebe entdeckt werden, deren Identität durch Massenspektrometrie geklärt werden konnte. Auch wurden einige Unterschiede im Phosphorylierungsmuster zwischen WT und cGKI-KO festgestellt; die Identifizierung der Proteine war jedoch aufgrund methodischer Schwierigkeiten bislang nicht möglich und bedarf weiterer Untersuchungen.

In einem zweiten Ansatz wurde zur Identifizierung intrazellulärer Bindungspartner der cGKI α eine cDNA-Bibliothek von Mäusen des Embryonalstadiums E17 mit Hilfe des Zweihybriden Hefesystems durchmustert. Mit der DNA-Methyltransferase 3a (Dnmt3a) und der

Hydroxysteroidsulfotransferase 2b1b (Sult2b1b) konnten zwei potentielle Interaktionspartner der cGKI α im Zweihybriden Hefesystem gefunden werden. Die Interaktion der cGKI α mit der Dnmt3a1-Isoform wurde im Lauf der Arbeit weiter verfolgt und konnte in COS-7 Zellen mittels Immunpräzipitation verifiziert werden. Untersuchungen zur subzellulären Verteilung lassen eine Interaktion der Kinase mit der Dnmt3a1 im Zellkern vermuten. Zudem kommt die Dnmt3a1 als interessanter potentieller Interaktionspartner der Kinase im Nervensystem in Frage, da immunhistochemische Untersuchungen von Gewebe-Lysaten eine Expression der Dnmt3a1 im Cerebellum und in den Spinalganglien zeigten. Außerdem geben Immunpräzipitations-Studien Hinweise auf eine Interaktion der cGKI α mit einer weiteren DNA-Methyltransferase, der Dnmt1. Weiterführende Untersuchungen sind jedoch nötig, um die Spezifität der Interaktionen *in vivo* näher zu charakterisieren und um zu klären, ob die cGKI α durch eine Interaktion mit DNA-Methyltransferasen in der Lage ist, die entwicklungs- und gewebsabhängige neuronale Genexpression und damit die axonale Wegfindung zu beeinflussen.

5.2. Summary

Although the molecular processes underlying axonal guidance during embryonic development have been intensively studied in recent years, currently much less is known about the mechanisms of intracellular signal transduction downstream of guidance receptors. *In vitro* experiments by Poo and colleagues suggested an involvement of cGMP mediated signal transduction in the steering response of growth cones. In agreement with these *in vitro* studies Schmidt and coworkers detected an impaired pathfinding of sensory axons in the spinal cord due to the lack of cGMP dependent protein kinase I α (cGKI α) (Schmidt et al., 2002). To broaden our knowledge about the role of cGKI α in the nervous system, especially in sensory neuron axonal growth, this thesis focussed on the following issues:

a) Using an isoform specific antibody the expression of cGKI α was investigated in wholemounts, brain sections, and western blots during embryonic and early postnatal development of the mouse nervous system. At embryonic stages an expression of the kinase was detected in cranial nerves, associated cranial ganglia and fibertracts, preganglionic sympathetic neurons, olfactory epithelial cells, and in the notochord. At postnatal stages several neurons in the olfactory bulb, hippocampus, cerebellum, and cortex were immunopositive for cGKI α . Furthermore, an increase in the expression of the kinase was observed during postnatal development of the cerebellum and the hippocampus. This

spatiotemporal expression pattern of cGKI α suggests a functional role for the kinase in regulating axonal growth, migration, and differentiation of several neuronal populations.

b) Cells known to express cGKI α in the wildtype were analysed for potential pathfinding errors or migration deficits in mice deficient for cGKI. For this purpose immunohistochemical studies employing several antibodies and Silver/Nissl-Stainings were carried out. However, none of the structures examined (cranial nerves, preganglionic sympathetic neurons, peripheral spinal nerves, hippocampus, cerebellum, and olfactory bulb) varied from those of wildtype littermates with respect to pathfinding errors or other malformations.

c) cGMP-activated cGKI phosphorylates several intracellular target proteins. Three of those proteins (VASP, CRP2 and myosin phosphatase/myosin IIB) were chosen for further investigations due to their ability to regulate cytoskeletal dynamics. Phosphorylation studies using isolated dorsal root ganglia (DRGs) from cGKI-deficient and wildtype mice allowed the clear identification of VASP as a phosphorylation target of cGKI in sensory neurons. Furthermore, using a panel of antibodies several developmental stages of the corresponding knockout mice were immunohistochemically tested for pathfinding errors with respect to those found in the cGKI-knockout mouse. However, in none of these knockout mice pathfinding of DRG axons was disturbed, suggesting that - disregard of potential compensatory effects - none of these proteins is involved in the pathfinding errors, detected in cGKI deficient mice.

d) Assuming that none of the cGKI targets investigated so far is essential for pathfinding of sensory axons, it was necessary to pursue alternative approaches to identify potential targets and binding partners of cGKI or cGKI α in the nervous system, possibly playing a role in DRGs too.

In an approach to find potential substrates of cGKI, tissue lysates from cGKI deficient or wildtype cerebellum after stimulation by the cGKI activator 8-pCPT-cGMP were separated by two-dimensional gelelectrophoresis and compared for differences in the pattern of protein expression or phosphorylation, respectively. Comparative studies of changes in protein expression due to the lack of cGKI revealed both downregulated (NADH-ubiquinone oxidoreductase B22 subunit and ATP synthase D chain, mitochondrial) and upregulated proteins (glutathione transferase omega 1 and ADP-ribosylation factor-like protein 3), which were identified by mass spectrometry. Although some differences in the phosphorylation pattern of wildtype and cGKI-deficient mice were observed also, identification of those proteins requires further investigations due to methodological problems.

In a second approach the yeast two-hybrid system was used to screen an E17 mouse library for intracellular interaction partners of cGKI α . Two potential interaction partners for cGKI α have been found: the DNA-methyltransferase 3a (Dnmt3a) and the hydroxysteroid sulfotransferase 2b1b (Sult2b1b). The interaction between cGKI α and isoform 1 of Dnmt3a was independently confirmed by immunoprecipitation studies in COS-7 cells. Analysis of the subcellular distribution of Dnmt3a1 and cGKI α suggest an interaction of both proteins in the nucleus. Dnmt3a1 may be an interesting putative binding partner of the kinase in the nervous system, as expression of Dnmt3a1 in the cerebellum and in DRGs has been demonstrated by Western blot detection. Moreover, immunoprecipitation studies indicated a further interaction of cGKI α with another DNA-methyltransferase, Dnmt1. However, further analyses are necessary to characterize the specificity of those interactions *in vivo*, and to clarify whether cGKI α through its interaction with DNA-methyltransferases is able to influence the spatiotemporal neuronal gene expression and axonal pathfinding.