3. Ergebnisse

3.1. Expression der cGMP-abhängigen Kinase I im Nervensystem der Maus

3.1.1. Expression der cGKIa im Nervensystem der Maus

Um zu klären, ob die cGMP-abhängigen Kinase Iα (cGKIα) evtl. auch beim axonalen Wachstum anderer sensorischer Neurone eine Rolle spielt, wurde zunächst die Expression der cGKIα im embryonalen und postnatalen Nervensystem der Maus mit Hilfe eines isoformspezifischen polyklonalen Antikörpers (Jens Schlossmann, München) untersucht. Um einen Überblick über die Expression der Kinase während der Embryonalentwicklung zu bekommen, wurden Ganzkörperfärbungen der Embryonalstadien E9-E12 angefertigt. Weiterhin wurden Gefriermikrotomschnitte von Embryonen und Gehirnen postnataler Mäuse immunhistochemisch untersucht sowie Gewebe-Lysate verschiedener Gehirnareale nach Auftrennung im SDS-PAGE mittels Western Blot.

3.1.1.1. Expression der cGKIa in den Hirnnerven

Insgesamt wurden zwei Embryonen des Embryonalstadiums E9, fünf Embryonen im Alter E9,5-10, vier Embryonen im Alter E11-11,5 und zwei Embryonen des Embryonalstadiums E12 des Wildtypstammes C57BL/6J auf eine Expression der cGKIα untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in der Tabelle 1 zusammengefasst.

In Abb. 6 sind beispielhaft Ganzkörperfärbungen der Embryonalstadien E9, E9,5, E10 und E11 dargestellt. Eine Expression der Kinase konnte in Ganzkörperfärbungen zuerst in den Hirnnerven Nervus trigeminus (Nerv V), Nervus facialis (Nerv VII) und Nervus vestibulocochlearis (Nerv VIII) im Embryonalstadium E9,5 detektiert werden (Abb. 7). Im Alter E10 waren zusätzlich der Nervus glossopharyngeus (Nerv IX), der Nervus vagus (Nerv X) und der Nervus accessorius (Nerv XI) immunpositiv für cGKIa (Abb. 7). Im Embryonalstadium E11 wurde die cGKIa des Weiteren im Nervus oculomotorius (Nerv III) exprimiert und in den drei Unterteilungen der peripheren Fortsätze des Trigeminalganglions: dem N. ophthalmicus, N. maxillaris und N. mandibularis. Sowohl die Ganglienzellen als auch die Nervenfasern der Hirnnerven wurden angefärbt (Abb. 8).



Abb. 6: Übersicht der cGKIa Expression in Mäusen der Embryonalstadien E9 bis E11.

Laterale Ansicht der Embryonen. Die Embryonen wurden mit einem primären Antikörper gegen cGKI α und einem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper gefärbt. Eine erste Expression der Kinase konnte im Alter E9,5 beobachtet werden, die in den Entwicklungsstadien E10 und E11 zunimmt. Maßbalken: 500 μ m



Abb. 7: cGKIα Expression in den Hirnnerven von Mäusen der Embryonalstadien E9 bis E12. Laterale Ansicht auf die Kopfregion von Ganzkörperfärbungen der Embryonalstadien E9,5; E10; E11 und E12. Die Embryonen wurden mit einem primären Antikörper gegen cGKIα und einem HRP-gekoppelten sekundären Antikörper gefärbt. Eine erste Expression der Kinase konnte im Alter E9,5 in den Hirnnerven V, VII und VIII beobachtet werden. Im Embryonalstadium E10 sind zusätzlich Nerv IX, X und XI und im Alter E11 Nerv III und die Fortsätze des Trigeminusnerven: N. ophthalmicus, N. maxillaris und N. maxillaris immunpositiv. Der Pfeil markiert cGKIα immunpositive Zellen im caudalen Teil des Mesencephalon und deren deszendierenden Axone im Tractus mesencephalicus n. trigemini. A: Auge; C2: zweites zervikales Spinalganlion; H: Herz; ma: N. mandibularis; mx: N. maxillaris; op: N. ophthalmicus; III: N. oculomotorius; V: N. trigeminus; VII: N. facialis; VIII: N. vestibulocochlearis; IX: N. glossopharyngeus; X: N. vagus; XI: N. accessorius; Maßbalken: 200 μm

Der Nervus abducens (Nerv VI) konnte mit Hilfe dieser Methode nicht dargestellt werden, ebenso die Hirnnerven I und II. Auf die letzteren beiden wird gesondert in den Kapiteln 3.1.1.4. und 3.1.1.5. eingegangen.



Abb. 8: cGKIa Expression in den Ganglien der Hirnnerven

Transversalschnitt (Schnittebene im kleinen Bild angegeben) durch einen Embyo des Entwicklungsstadiums E13,5, gefärbt mit einem primären Antikörper gegen cGKIα und einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper. Die Nervenzellen in den Ganglien der Hirnnerven exprimieren cGKIα. A: Arterie; d: dorsal; v: ventral; V: Ganglion trigeminale; VII: Ganglion geniculi des N. facialis; VIII: Ganglion vestibulocochleare; IX: Ganglion des N. glossopharyngeus; Maßbalken: 100 um

Eine Expression der Kinase im Nervus trochlearis (Nerv IV) und im Nervus hypoglossus (Nerv XII) konnte in keinem Embryo der untersuchten Altersstadien beobachtet werden, obwohl beide Nerven im Alter E11 vorhanden sind, wie vergleichende Ganzkörperfärbungen mit einem monoklonalen Antikörper gegen das 165 kD Neurofilament-Protein zeigen (Abb. 9). Das Neurofilament-Protein zeigt eine weitverbreitete aber exklusiv auf Neuronen beschränkte Expression, die jedoch nicht jeden Neuronentyp einschließt. Im Vergleich zu Neurofilament färbte der cGKIα-Antikörper nur eine Subpopulation von Fasern des Nervus vagus (Nerv X; Abb. 9).



Abb. 9: Vergleich der cGKIα- und Neurofilament-Expression in den Hirnnerven des Embryonalstadiums E11

Laterale Ansicht auf die Kopfregion von Ganzkörperfärbungen der Embryonalstadien E11. Die Embryonen wurden mit einem primären Antikörper gegen cGKIα bzw. Neurofilament (2H3) und einem HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper gefärbt. In den Hirnnerven IV und XII konnte keine Expression der cGKIα festgestellt werden (Stern markiert jeweils Lage des Hirnnerven), obwohl beide Hirnnerven in diesem Entwicklungstadium vorhanden sind, wie die Färbung mit Neurofilament zeigt. Weiterhin färbte die cGKIα im Vergleich zu Neurofilament nur eine Subpopulation der Fasern des N. vagus (X) an. C2: zweites zervikales Spinalganglion; ma: N. mandibularis; mx: N. maxillaris; op: N. ophthalmicus; III: N. oculomotorius; IV: N. trochlearis; V: N. trigeminus; VII: N. facialis; VIII: N. vestibulocochlearis; IX: N. glossopharyngeus; X: N. vagus; XI: N. accessorius; XII: N. hypoglossus; Maßbalken: 200 μm

Nr.	Name	Bestandteile	Expression (untersuchte Altersstadien)
I.	N. (Fasciculus) olfactorius	Spez. viszeral afferent	+ (E 13,5; P 10)
II.	N.(Fasciculus) opticus	Spez. somatisch afferent	- (E 13; P3; Adult)
III.	N. oculomotorius	a) somatisch efferent	- (E 9 - E 10)
		b) viszeral efferent (parasympathisch)	+ (E 11)
		c) somatisch afferent	
IV.	N. trochlearis	a) somatisch efferent	- (E 9 - E 12)
		b) somatisch afferent	
V.	N. trigeminus	a) somatisch afferent	+ (E 9,5 - E 13,5)
	1. Kiemenbogen	b) branchiogen efferent	
VI.	N.abducens	a) somatisch efferent	(nicht untersucht)
		b) somatisch afferent	
VII.	N. facialis	a) branchiogen efferent	+ (E 9,5 - E 13,5)
	N. intermedius	b) viszeral efferent	
	2. Kiemenbogen	c) Spez. viszeral afferent	
		d) somatisch afferent	
VIII.	N. vestibulocochlearis	Spez. somatisch afferent	+ (E 9,5 - E 13,5)
IX.	N. glossopharyngeus	a) branchiogen efferent	+ (E 10 - E 13,5)
	3. Kiemenbogen	b) viszeral efferent (parasympathisch)	
		c) Spez. viszeral afferent	
		d) viszeral afferent	
		e) somatisch afferent	
Х.	N. vagus	a) branchiogen efferent	+ (E 10 - E 12)
	4.Kiemenbogen	b) viszeral efferent (parasympathisch)	
	littlemencogen	c) viszeral afferent	
		d) Spez. viszeral afferent	
		e) somatisch afferent	
XI.	N. accessorius	a) branchiogen efferent	+ (E 10 - E 12)
		b) somatisch efferent	
XII.	N. hypoglossus	somatisch efferent	- (E 9 - E 12)

Tab. 1: Übersicht über die Expression der cGKIα in den Hirnnerven, in den untersuchten Altersstadien. Angegeben sind Nummer und Name der Hirnnerven, deren afferente und efferente Bestandteile (Duus, 1995) sowie deren Expression (-: keine Expression, +: Expression) in den untersuchten Entwicklungsstadien (in Klammern angegeben).

3.1.1.2. Expression der cGKIa im Mesencephalon

Weiterhin wurde ab dem Entwicklungsstadium E9,5 eine Expression der Kinase in Zellen im caudalen Mesencephalon und rostralen Teil von Rhombomer 1 gefunden, deren deszendierenden Axone einen dorsolateralen Trakt in caudaler Richtung bilden (Abb. 7, Pfeil und Abb. 10 A). Aufgrund der Lage der Somata und dem Verlauf der Axone konnte der Trakt nach Veröffentlichungen von Easter und Mastick als Tractus mesencephalicus n. trigemini identifiziert werden (Easter, Jr. et al., 1993; Mastick and Easter, Jr., 1996). Auch im Alter E13,5 konnten in Transversalschnitten cGKIa positive, dorsolateral gelegene Somata im Mittelhirn gefunden werden (Abb. 10 B, C). Ob diese zur Population, der in den Ganzkörperfärbungen markierten Zellen gehören, konnte bislang nicht zweifelsfrei geklärt werden.



Abb. 10: cGKIa Expression im Mesencephalon

A: Laterale Ansicht auf die Kopfregion einer cGKI α Ganzkörperfärbung des Embryonalstadiums E10. Weiße Pfeilspitzen markieren cGKI α immunpositive Zellen im caudalen Teil des Mesencephalon und im Rhombomer 1 sowie deren deszendierenden Axone im Tractus mesencephalicus n. trigemini (schwarze Pfeilspitze). B: Transversalschnitt durch einen Embryo des Embryonalstadiums E13,5 auf Höhe des Mesencephalon, (Schnittebene ist schematisch im kleinen Bild angegeben) gefärbt mit einen primären Antikörper gegen cGKI α und einem Cy3-gekoppelten sekundären Antikörper. Dorsal ist oben, ventral unten im Bild. Die cGKI α markiert im dorsolateralen Bereich des Mesencephalon lokalisierte Zellen. C: Vergrößerte Darstellung der Zellen, des in B markierten Gebietes. Am: Aqueductus mesencephali; M: Mesencephalon, P: Prosencephalon, R1: Rhombomer 1; V: N. trigeminus; Maßbalken: 200 µm (A), 100 µm (B), 50 µm (C).

3.1.1.3. Expression der cGKI α im Notochord, in den Spinalganglien und im Rückenmark

Die Expression der cGKI α in den Zellen des Notochord (Chorda dorsalis) beginnt im Embryonalstadium E9,5 und konnte im Rahmen der Untersuchungen bis zum Alter E14 detektiert werden (Abb. 11 A-C). Eine beginnende cGKI α -Immunreaktivität in den sensorischen Zellen der Spinalganglien konnte bei E10 zunächst nur in den zervikalen Spinalganglien beobachtet werden, im Entwicklungsstadium E11 dann auch in thorakalen, lumbalen sowie einigen sakralen Spinalganglien (Abb. 11 B, C). In diesem Alter zeigen auch die Spinalnerven eine cGKIα-Expression (Abb. 11 C, D). Diese innervieren die Extremitäten, den Rücken und die laterale und ventrale Bauchwand (Abb. 11 F, G; siehe auch Kap. 3.2.2.) Im Vergleich mit Neurofilament-Färbungen, detektiert der cGKIα-Antikörper weniger Fasern in den Spinalnerven (Abb. 11 D, E). Auch Querschnitte des Rückenmarks zeigen kaum eine cGKIα-Färbung der ventralen Wurzel und innerhalb des Rückenmarks werden nur wenige Motoneurone gefärbt (Abb.11 I). Darüber hinaus wird im Hirnstamm bzw. rostralem Rückenmark die Kinase im Tractus spinalis nervi trigemini exprimiert (Abb. 11 H) sowie auf Höhe des Thorakalmarks und oberen Lumbalmarks in den präganglionären Neuronen des Sympathikus (Abb. 11 I, J). Auch deren Axone und die prävertebralen sympathischen Ganglien zeigen eine cGKIα-Immunreaktivität.



Abb. 11: cGKIa Expression im Notochord, in den Spinalganglien und im Rückenmark

A-G: Laterale Ansicht von Ganzkörperfärbungen der Embryonalstadien E9,5 (A), E10 (B), E11 (C-E), E12 (F+G). **H-J:** Transversalschnitte durch Embryonen des Entwicklungsstadiums E13 (I, J) und E13,5 (H), dorsal ist oben, ventral unten im Bild. Die Embryonen und Schnitte wurden mit einem primären Antikörper gegen cGKIα (A-D, F-J) bzw. Neurofilament (M α 2H3, E) und einem HRP-gekoppelten (A-G) bzw. einem Cy3-gekoppelten (H-J) sekundären Antikörper gefärbt. Eine Expression der cGKIα konnte im Notochord (A-C), in den Spinalganglien (B, C, D, I) sowie deren Spinalnerven, die die Extremitäten und Rumpfregion peripher innervieren (F, G) beobachtet werden. Im Vergleich zu Neurofilament (E) färbte der cGKIα-Antikörper (D) nur eine Subpopulation der Spinalnervenfasern bzw. wenige motorische Fasern in der ventralen Wurzel (I). Im Hirnstamm bzw. rostralem Rückenmark wird der Tractus spinalis nervi trigemini mit dem cGKIα-Antikörper gefärbt (H, Pfeil) sowie im Thorakal- und Lumbalmark die präganglionären Neurone des Sympathikus (I, J). **DF:** dorsaler Funiculus, **H:** Herz, **N:** Notochord, **pN:** präganglionäre Neurone, **vE:** vordere Extremität, **vW:** ventrale Wurzel, **Z:** Zentralkanal; Maßbalken: 200 μm (A, B, C, F, G, H, J), 100 μm (D, E, I)

3.1.1.4. Expression der cGKIa im sich entwickelnden olfaktorischen System

Im Embryonalstadium E13,5 konnte die cGKI α im olfaktorischen Epithel und auf den aus dem Bulbus olfactorius herauswachsenden Axonen der Mitralzellen, welche den Tractus olfactorius bilden, detektiert werden (Abb. 12 A, B). Im postnatalen Bulbus olfactorius wurden bei P10 cGKI α -immunpositive Mitralzellen und periglomeruläre Zellen beobachtet (Abb. 12 C). Außerdem konnte eine Expression im akzessorischen Bulbus olfactorius und im lateralen olfaktorischen Trakt gezeigt werden (Abb. 12 D). Lysate der Bulbi olfactorii verschiedener, postnataler Entwicklungsstadien wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und auf eine Expression der cGKI α überprüft. In allen untersuchten Entwicklungsstadien wurde die Kinase exprimiert. Unter Berücksichtigung der γ -Tubulin-Expression konnte eine leichte Expressionszunahme im Bulbus olfactorius ab ca. P6 bis zum adulten Stadium beobachtet werden (Abb. 12 E).



Abb. 12: Expression von cGKIa im sich entwickelnden olfaktorischen System

A+B: Transversalschnitte durch einen Embryo des Entwicklungsstadiums E13,5; dorsal ist oben, ventral unten im Bild C+D: Sagittalschnitte des Gehirns im Entwicklungsstadium P10. Die Kryoschnitte wurden mit einem Antikörper gegen cGKIα und einem sekundären, Cy3-gekoppelten (A+B) bzw. HRP-gekoppelten (C+D) Antikörper gefärbt. A+B: Im Alter E13,5 konnte die cGKIα im olfaktorischen Epithel und auf dem Tractus olfactorius detektiert werden. In B ist der in A gekennzeichnete Ausschnitt vergrößert dargestellt. C: Im Alter P10 waren die im Bulbus olfactorius lokalisierten Mitralzellen und einige periglomeruläre Zellen immunpositiv für cGKIα. D: Des Weiteren wurde im Alter P10 der akzessorische Bulbus olfactorius und dessen Mitralzellen gefärbt sowie der laterale optische Trakt. E: Lysate des Bulbus olfactorius verschiedener Entwicklungsstadien wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und der Blot mit dem cGKIα-Antikörper und einem HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper entwickelt. Der gleiche Blot wurde auch mit γ-Tubulin gefärbt, welches zum Abgleich der geladenen Proteinmengen diente. Unter Berücksichtigung der γ-Tubulin Expression konnte ab ca. P6 bis zum adulten Tier eine leichte entwicklungsabhängige Zunahme der cGKIα-Expression im Bulbus olfactorius beobachtet werden. AOB: akzessorischer Bulbus olfactorius; Bo: Bulbus olfactorius; GI: Glomeruli; LOT: lateraler olfaktorischer Trakt; M: Mitralzellen; Mi: Mitralzellen des AOB; OE: olfaktorisches Epithel; PG: periglomeruläre Zellen; Tr.O: Tractus olfactorius; Maßbalken: 100 μm (A, D), 50 μm (B, C)

3.1.1.5. Expression der cGKIa im sich entwickelnden Auge

Im Embryonalstadium E13 konnte die cGKIa in einer inneren Epithelschicht der Cornea (Hornhaut) lokalisiert werden und im Alter P3 im einschichtigen Hornhautendothel. Keine Expression konnte bei E13 auf den in Richtung Chiasma opticum ziehenden Axonen des künftigen Nervus opticus gefunden werden. Auch im postnatalen Entwicklungsstadium P3 und im adulten Tier konnte keine Expression der Kinase im Nervus opticus (Hirnnerv II) beobachtet werden (Abb. 13). In der Retina wurde jedoch im Alter P3 eine Expression in der Ganglienzellschicht beobachtet, die bei P11 und P22 an Intensität zunahm. Eine schwächere Expression wurde im Bereich der inneren Körnerzellschicht und äußeren plexiformen Schicht gefunden (Abb. 14).



Abb. 13: Expression der cGKIa im sich entwickelnden Auge

A: Transversalschnitt durch einen Embryo des Entwicklungsstadiums E13; dorsal ist unten, ventral oben im Bild B+C: Sagittalschnitte durch das Auge einer Maus des Entwicklungsstadiums P3. Die Kryoschnitte wurden mit einem Antikörper gegen cGKIa und einem Cy3gekoppelten, sekundären Antikörpern gefärbt. A: Im Alter E13 war die innere Epithelschicht der Cornea immunpositiv für cGKIa. keine Expression konnte in den Axonen des künftigen Nervus opticus gefunden werden. Augenmuskeln und Arterien wurden von der cGKIa gefärbt. B: Auch im Alter P3 konnte keine Expression der Kinase im N. opticus beobachtet werden, jedoch in Zellen Augenmuskeln. der **C**: Im Entwicklungsstadium P3 war das einschichtige Endothel der Hornhaut (Pfeil) immunpositiv für cGKIa. A: Arterie; C: Cornea; E: Epithel der Cornea; L: Linse; M: Augenmuskel; N II: Nerv II (Nervus opticus); oCh: Chiasma opticum; Maßbalken: 100 μ m (A, B), 50 μ m (C)



Abb. 14: Expression der cGKIa in der Retina

Dargestellt sind Retinaschnitte der Entwicklungsstadien P3, P11 und P22, gefärbt mit einem Antikörper gegen cGKI α und einem Cy3-gekoppelten, sekundären Antikörper. Die Ganglienzellschicht war immunpositiv für cGKI α , wobei die Expression zwischen P3 und P11 deutlich zunahm. Eine schwächere Expression konnte im Bereich der inneren Körnerzellschicht und äußeren plexiformen Schicht beobachtet werden. Außerhalb der Retina zeigte die Aderhaut eine deutliche Färbung für cGKI α . A: Aderhaut; ÄP: äußere plexiforme Schicht, G: Ganglienzellschicht, IK: innere Körnerzellschicht, IP: innere plexiforme Schicht, P: Pigmentepithelschicht, S: Sinneszellepithelschicht; Maßbalken: 50 μ m

3.1.1.6. Expression der cGKIa in den Purkinje-Zellen des Cerebellums

Die Zellkörper (mit Ausnahme des Zellkerns), Dendriten und Axone der Purkinje-Zellen exprimieren die α-Isoform der cGKI. Abb. 15 zeigt anhand von Schnitten beispielhaft das Expressionsmuster der Kinase im Cerebellum in den postnatalen Entwicklungsstadien P6, P10, P13 und P23. In Western Blots von Gewebe-Lysaten des Cerebellums konnte eine entwicklungsabhängige Zunahme der Expression gezeigt werden (Abb. 15 E). Im Vergleich zum Postnatalstadium P6 nimmt bei P10 und älteren Entwicklungsstadien die Expression der cGKIα im Cerebellum deutlich zu.



Abb. 15: Expression von cGKIa im postnatalen Cerebellum

A-D: Sagittale (A-C) bzw. coronale Kryoschnitte (D) des Cerebellums wurden mit einem Antikörper gegen cGKI α und einem HRP-gekoppelten (**A**, **B**) bzw. Cy3-gekoppelten (**C**, **D**) sekundären Antikörper gefärbt. Die Zellkörper (mit Ausnahme des Zellkerns), Dendriten und Axone (Pfeil in C) der Purkinje-Zellen waren immunpositiv für cGKI α . **E:** Lysate des Cerebellums verschiedener Entwicklungsstadien wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und der Blot mit dem cGKI α -Antikörper und einem HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper entwickelt. Der gleiche Blot wurde auch mit γ -Tubulin gefärbt, welches zum Vergleich der geladenen Proteinmengen diente. Bei annähernd gleicher γ -Tubulin Expression konnte eine entwicklungsabhängige Zunahme der cGKI α -Expression im Cerebellum gezeigt werden. **A:** Adult **K:** Körnerzellschicht, **M:** Mark, **MS**: Molekularschicht, **P:** Purkinje-Zellen; Maßbalken: 100 µm (A, C, D), 50 µm (B)

3.1.1.7. Postnatale Expression der cGKIa in weiteren Hirnstrukturen

Im postnatalen Gehirn konnte die cGKI α auch im Hippocampus in den Pyramidenzellen der Cornu ammonis regio inferior (CA1) und Cornu ammonis regio superior (CA3) sowie in den Körnerzellen des Gyrus dentatus detektiert werden. (Abb. 16 A). Auch die Fimbria hippocampi war cGKI α -positiv. Lysate vom Hippocampus verschiedener postnataler Entwicklungsstadien wurden mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und auf eine Expression der cGKI α überprüft. Unter Berücksichtigung der γ -Tubulin-Expression als Kontrolle für die geladene Proteinmenge, konnte bei den untersuchten Altersstadien ab dem Postnataltag P13 bis zum Postnataltag P21 eine Zunahme der cGKI α -Expression im Hippocampus beobachtet werden. In adulten Mäusen (älter als 6 Wochen) war die Expression jedoch wieder schwächer (Abb. 16 B).

Des Weiteren konnte die cGKIa in Pyramidenzellen verschiedener Cortexschichten beobachtet werden (Abb. 16 E). Untersuchungen von Cortex-Lysaten zeigten ab P6 eine stärkere Expression der Kinase, die jedoch in den späteren Entwicklungsstadien nicht weiter zunahm. Andere cGKIa-immunpositive Strukturen waren das Corpus callosum, die

Commissura anterior sowie Fasern im Caudate putamen (Abb. 16 E). In Lysaten vom Hypothalamus wurde die Kinase ebenfalls in allen untersuchten Altersstadien detektiert, mit stärkerer Expression in den Altersstadien P12 und P32 (Abb. 16 D).



Abb. 16: Expression von cGKIa im postnatalen Gehirn

A+E: Sagittale Gehirnschnitte des Entwicklungsstadiums P6 wurden mit einem Antikörper gegen cGKIα und einem HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper gefärbt. A: Im Hippocampus exprimierten die Pyramidenzellen der CA1- und CA3-Region, die Körnerzellen des Gyrus dentatus sowie die Fimbria hippocampi die Kinase. E: Weitere cGKIα-immunpositive Strukturen waren das Corpus callosum, die Commissura anterior, Fasern im Caudate putamen und ein Teil der Pyramidenzellen im Cortex. B, C, D: Lysate verschiedener Hirnareale und Entwicklungsstadien wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt und der Blot mit dem cGKIα-Antikörper und einem HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper entwickelt. Der gleiche Blot wurde auch mit γ-Tubulin gefärbt, welches zum Abgleich der geladenen Proteinmengen diente. Die cGKIα wurde in allen untersuchten Altersstadien in den Lysaten von Hippocampus, Cortex und Hypothalamus detektiert. AC: Commissura anterior C: Cortex, CA1: Cornu ammonis regio inferior, CA3: Cornu ammonis regio superior, CC: Corpus callosum, Cp: Caudate putamen, DG: Gyrus dentatus, F: Fimbria hippocampi; Maßbalken: 100 μm (A), 200 μm (E)

3.1.2. Expression der cGKIß im Nervensystem der Maus

Die Untersuchungen zur Expression der cGKI β im Nervensystem beschränkten sich in dieser Arbeit auf frühe Embryonalstadien. Dazu wurden Ganzkörperfärbungen von Embryonen der Entwicklungsstadien E9,5, E11,5 und E12 mit einem isoformspezifischen Antikörper angefertigt. In keinem der untersuchten Altersstadien konnte eine Expression der cGKI β detektiert werden. D.h. alle in diesen Altersstadien, mit dieser Methode detektierten und beschriebenen cGKI-positiven Strukturen, wie Hirnnerven, Notochord und Spinalganglien (siehe. Kap. 3.1.1.1.-3.1.1.3.) exprimieren nur die α -Isoform der cGMP-abhängigen Kinase I.

3.2. Analyse cGKIα-positiver Strukturen hinsichtlich morphologischer Veränderungen in cGKI-defizienten Mäusen

In diesem Teil der vorliegenden Arbeit wurden solche Zellen und Gewebe in cGKIdefizienten Mäusen (Pfeifer et al., 1998; Wegener et al., 2002) bezüglich möglicher morphologischer Unterschiede untersucht, die im Wildtyp eine Expression der cGKIα aufwiesen. Für vergleichende Untersuchungen im Embryo wurden zunächst ganze Embryonen der Embryonalstadien E10 bis E12 mit einem monoklonalen Antikörper gegen das 165 kDa Neurofilament-Protein gefärbt. Insgesamt wurden für das Embryonalstadium E10 sechs KO- und fünf Wildtypmäuse (aus zwei Würfen), für E11-E11,5 fünf KO- und fünf Wildtypmäuse (aus drei Würfen) und für E12 je zwei KO- und Wildtypmäuse (aus einem Wurf) miteinander verglichen.

3.2.1. Analyse der Spinalganglien

Schmidt und Kollegen konnten in cGKI-defizienten Mäusen mit DiI-Markierungen und trkA-Antikörperfärbungen Wegfindungsfehler der sensorischen Spinalganglienzellen im dorsalen Funiculus des Rückenmarks aufzeigen. Hierbei war die T-förmige Verzweigung der Axone in einen rostralen und caudalen Ast gestört bzw. fand ein überschießendes Wachstum der Axone Richtung Zentralkanal statt (Schmidt et al., 2002). In der vorliegenden Arbeit wurde mit den Neurofilament-Ganzkörperfärbungen der Embryonen eine andere Methode verwendet, die cGKI-defizienten Mäuse zu analysieren. Der Wegfindungsfehler der sensorischen Axone konnte auch in den mit Neurofilament gefärbten Spinalganglienzellen gefunden werden. In allen untersuchten cGKI-defizienten Embryonen des Alters E11-E11,5 konnte über die gesamte Länge des Rückenmarks, d.h. auf Höhe zervikaler, thorakaler und lumbaler Spinalganglien ein überschießendes Wachstum der Axone Richtung Zentralkanal beobachtet werden (Abb. 17 E-F). In caudalen Regionen, in denen der dorsale Funiculus noch wenig bzw. noch gar nicht entwickelt war, konnten nur vereinzelte bzw. keine überschießenden Fasern beobachtet werden. In diesen Regionen wurde auch im dorsalen Funiculus ein ungleichmäßiges Einwachsen der cGKI-defizienten Axone eines Spinalganglions beobachtet. Statt einer, aus der T-förmigen Verzweigung der Axone resultierenden, gleichmäßigen caudalen und rostralen Verzweigung im Wildtyp (Abb. 17 C, G) hatten im cGKI-KO die innerhalb eines Spinalganglions rostral-gelegenen, auswachsenden Axone, die Präferenz im dorsalen Funiculus nach rostral zu wachsen. Während die im caudalen Bereich des Ganglions auswachsenden Axone tendenziell im dorsalen Funiculus Richtung caudal wuchsen. Die Faserdichte im dorsalen Funiculus war deshalb in diesen Regionen, zwischen zwei

benachbarten Spinalganglien, dichter (Abb. 17 D, H). In fortgeschritteneren Regionen des dorsalen Funiculus erschien die Faserdichte gleichmäßig (Abb. 17 E, F).



Abb. 17: Vergleich der Spinalganglien cGKI-defizienter Mäuse mit Wildtypmäusen.

A-H: Dorsolaterale Ansicht auf die Spinalganglien in Ganzkörperfärbungen der Embryonalstadien E10 (A+B), E11 (C+D, G+H) und E11,5 (E+F). A-F: rostral ist links, caudal rechts, ventral oben und dorsal unten im Bild. G+H: Caudal ist unten und dorsal links im Bild. Die Embryonen wurden mit einem primären Antikörper gegen Neurofilament und einem HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper gefärbt. A+B: Die Pfeile markieren die in den dorsalen Funiculus einwachsenden Axone der Spinalganglien. Dieser Prozeß war aufgrund einer leichten Entwicklungsverzögerung im KO (B) noch nicht so weit fortgeschritten wie im WT (A). C+D: Der Pfeil im KO (D) markiert die fehlerhaft wachsenden Axone, die Pfeilspitzen die Regionen im dorsalen Funiculus, welche aufgrund des Wachstumsfehlers eine höhere Faserdichte aufweisen. E+F: Der Pfeil im KO (F) markiert die fehlerhaft wachsenden Axone. Die Faserdichte im dorsalen Funiculus war in diesem fortgeschritteneren Stadium einheitlich. G+H: Im KO (H) markieren schwarze Pfeilspitzen Axone, die bevorzugt in rostrale Richtung wuchsen, weiße Pfeilspitzen jene, die bevorzugt nach caudal wuchsen. C2: zweites zervikales Spinalganglion; T5: fünftes thorakales Spinalganglion; L1: erstes lumbales Spinalganglion; Maßbalken: 100 μ m

3.2.2. Analyse der peripheren spinalen Innervation

Jeder Spinalnerv bildet sich durch Vereinigung der Fasern aus der ventralen und dorsalen Wurzel des Rückenmarks und verzweigt sich im weiteren Verlauf in vier Äste. Die vorderen Äste (Rami anteriores) der zervikalen Spinalnerven 4 bis 8 (C4 bis C8) und des ersten thorakalen Spinalnervens (T1) vermischen sich und bilden ein Geflecht, den Plexus brachialis, der die vordere Extremität sensorisch und motorisch innerviert (siehe Abb. 18). Entsprechend bilden die vorderen Äste der lumbalen Spinalnerven 2 bis 5 (L2 bis L5) und der sakralen Spinalnerven 1 bis 3 (S1 bis S3) den lumbosakralen Plexus der hinteren Extremität.

Die 12 thorakalen Spinalnerven ziehen als individuelle Nerven zu ihren Innervationsgebieten, wobei jeweils der vordere Ast (Ramus anterior) die laterale und ventrale Rumpfwand und der dorsale Ast (Ramus posterior) den Rücken sensorisch und motorisch versorgt (siehe Abb. 19).

In den Entwicklungsstadien E10 bis E12 wurden die Plexusbildung und die periphere Innervation der thorakalen Spinalnerven mit Neurofilament-Ganzkörperfärbungen in cGKIdefizienten Tieren und im Wildtyp untersucht. Der Plexus brachialis wurde in den cGKI-KO-Tieren korrekt gebildet und es konnten in keinem der Entwicklungsstadien Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp gefunden werden (Abb. 18). Auch die Innervation der hinteren Extremität war bei Abwesenheit der cGKI vergleichbar mit der in WT-Tieren.

Untersuchungen der thorakalen Innervation zeigten ebenfalls keine Unterschiede zwischen Wildtypmäusen und cGKI-defizienten Mäusen. Sowohl die Innervation durch Verzweigungen des Ramus posterior als auch des Ramus anterior entsprach der im Wildtyp (Abb. 19).



Abb. 18: Vergleich der peripheren Spinalnerven cGKI-defizienter Mäuse mit Wildtypmäusen.

A-H: Ansicht von lateral auf die Region des Plexus brachialis von Ganzkörperfärbungen der Embryonalstadien E10 (A+B) E11 (C+D), E11,5 (E+F) und E12 (G+H). Dorsal ist rechts, ventral links im Bild. Die Embryonen wurden mit einem primären Antikörper gegen Neurofilament und einem HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper gefärbt. Abgesehen von leichten entwicklungsabhängigen Unterschieden (A+B), konnten in keinem der untersuchten Altersstadien morphologische Unterschiede hinsichtlich der Innervation der Vorderextremität von Wildtypmäusen (A, C, E, G) versus cGKI-defizienten Mäusen (B, D, F, H) beobachtet werden. C4: viertes zervikales Spinalganglion; T1: erstes thorakales Spinalganglion; vE: vordere Extremität; Maßbalken: 200 μ m



Abb. 19: Vergleich der peripheren spinalen Innervation der Rumpfregion cGKI-defizienter Mäuse mit Wildtypmäusen.

A-F: Ansicht von lateral auf die Rumpfregion von Ganzkörperfärbungen der Embryonalstadien E11,5 (A+B) und E12 (C-F). Dorsal ist unten, ventral oben im Bild. Die Embryonen wurden mit einem primären Antikörper gegen Neurofilament und einem HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper gefärbt. In keinem der untersuchten Altersstadien konnten morphologische Unterschiede hinsichtlich der peripheren Innervation von Wildtypmäusen (A, C, E) versus cGKI-defizienten Mäusen (B, D, F) beobachtet werden. Gefüllte Pfeilspitzen markieren die Innervation der lateralen und ventralen Rumpfregion durch Verzweigungen des vorderen Astes (Ramus anterior), die schwarzumrandeten Pfeilspitzen die Innervation der dorsalen Rumpfregion durch Verzweigungen des dorsalen Astes (Ramus posterior). Maßbalken: 200 μm

3.2.3. Analyse der Hirnnerven

Wie bereits in Kapitel 3.1.1.1. beschrieben, konnte die Kinase in Ganzkörperfärbungen in den Ganglien und Nervenfasern der Hirnnerven III, V, VII, VIII, IX, X und XI detektiert werden.

Vergleichende Ganzkörperfärbungen mit einem Antikörper gegen Neurofilament zeigten in cGKI-defizienten Mäusen der Entwicklungsstadien E10-E12 eine dem WT entsprechende Lage und Größe der Hirnnerven. Auch projizierten die Hirnnerven in die richtigen Zielregionen, wie z.B. der N. facialis (N. VII) in den zweiten Kiemenbogen und der N. glossopharyngeus (N. IX) in den dritten Kiemenbogen (Abb. 20).



Abb. 20: Vergleich der Hirnnerven cGKI-defizienter Mäuse mit Wildtypmäusen.

A-F: Ansicht von lateral auf die Kopfregion von Ganzkörperfärbungen der Embryonalstadien E10 (A+B), E11 (C+D) und E12 (E+F). Die Embryonen wurden mit einem primären Antikörper gegen Neurofilament und einem HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper gefärbt. In keinem der untersuchten Altersstadien konnten morphologische Unterschiede in den Hirnnerven von Wildtypmäusen (A, C, E) versus cGKI-defizienten Mäusen (B, D, F) beobachtet werden. A: Auge; C2: zweites zervikales Spinalganglion; H: Herz; ma: N. mandibularis; mx: N. maxillaris; op: N. ophthalmicus; III: N. oculomotorius; IV: N. trochlearis; V: N. trigeminus; VII: N. facialis; VIII: N. vestibulocochlearis; IX: N. glossopharyngeus; X: N. vagus; XI: N. accessorius; XII: N. hypoglossus; Maßbalken: 200 μm

3.2.4. Analyse der präganglionären sympathischen Neurone

Die Zellkörper aller präganglionären sympathischen Neurone liegen in der intermediären Zone vom Thorakalmark (Brustmark) und oberem Lumbalmark (Lendenmark). Während der Embryonalentwicklung des Rückenmarks durchlaufen die präganglionären sympathischen Neurone verschiedene Migrationsphasen. Im ersten Migrationsschritt wandern die Neurone entlang radialer Gliazellen vom Neuroepithelium in den ventrolateralen Bereich des Rückenmarks, wo sie zusammen mit somatischen Motoneuronen eine primitive motorische Kolumne formen. In einem zweiten Migrationsschritt sondern sie sich von den somatischen Motoneuronen ab und wandern dorsolateral Richtung intermediäre Zone des Rückenmarks, wo schließlich die meisten der Neurone verbleiben. Eine kleine Anzahl der Neurone orientiert sich mediolateral, und verbleibt in der Region um den Zentralkanals bzw. zwischen Zentralkanal und intermediärer Zone (Yip et al., 2000).

Wie in Kapitel 3.1.1.3. beschrieben, wird die cGKIa auf den Zellkörpern und Axonen der präganglionären Neuronen exprimiert. Mit Hilfe eines Antikörpers gegen die neuronale NO-Synthase (nNOS), welche ebenfalls von den Zellen exprimiert wird (Bruning and Mayer, 1996), wurden Transversalschnitte von Wildtyp- und cGKI-defizienten Embryonen im Embryonalstadium E13 untersucht. In diesem Alter ist der zweite Migrationsschritt fast abgeschlossen. Es konnte keine Abnormalität im Migrationsverhalten der präganglionären Neurone bei Abwesenheit der cGKI festgestellt werden. Die Lage der Neuronen im Rückenmark, die Projektion der Axone durch die ventrale Wurzel zu den paravertebralen bzw. prävertebralen Ganglien, sowie Lage und Form dieser Ganglien glichen den Verhältnissen im Wildtyp (Abb. 21).



Abb. 21: Vergleich präganglionärer sympathischer Neurone cGKI-defizienter Mäuse vs. Wildtyp-Mäuse Transversalschnitte von Embryonen des Entwicklungsstadiums E13 im Bereich des Brust- (A-F) und Lendenmarks (G+H). Wildtyp (A, C, E, G), cGKI-defizient (B, D, F, H). Die Schnitte wurden mit einem primären Antikörper gegen neuronale NO-Synthase (nNOS) und einem Cy3-gekoppelten, sekundären Antikörper gefärbt. Zwischen WT und KO konnten keine Unterschiede festgestellt werden. N: Notochord, PG: paravertebrales Ganglion, PrG: prävertebrales Ganglion, R: Rückenmark, S: Spinalganglion, vW: ventrale Wurzel, Z: Zentralkanal, Maßbalken: 100 μ m (A, B, G, H) bzw. 50 μ m (C-F).

3.2.5. Analyse des Hippocampus

Für vergleichende Untersuchungen zur allgemeinen Morphologie des Hippocampus wurden von postnatalen WT- und KO-Mäusen der Alterstadien P12 und P23 coronale bzw. sagittale Kryoschnitte des Gehirns angefertigt. Schnitte des Alters P23 wurden einer Silber-Nissl-Färbung unterzogen, um sowohl Zellen als auch Fasertrakte sichtbar zu machen. Schnitte des Alters P12 wurden mit einem Antikörper gegen Calbindin gefärbt, der innerhalb des Hippocampus hauptsächlich die Körnerzellschicht des Gyrus dentatus markiert. Es konnten weder Unterschiede in der Hippocampusstruktur zwischen KO und WT festgestellt werden (Abb. 22), noch im Expressionsmuster des Calbindins im Gyrus dentatus (Abb. 23).



Abb. 22: Vergleich der allgemeinen Morphologie des Hippocampus im KO vs. Wildtyp Silber-Nissl-Färbung von coronalen Hirnschnitten des Alters P23. Im Vergleich zum Wildtyp (A, B) konnten im cGKI-KO (C, D) keine morphologischen Unterschiede im Hippocampus festgestellt werden. Auch das Corpus callosum war korrekt ausgebildet. CA1: Cornu ammonis regio inferior, CA3: Cornu ammonis regio superior, Cc: Corpus callosum, DG: Gyrus dentatus, f: Fimbria hippocampus; Maßbalken: 500 μm (A, C), 250 μm (B, D)



Abb. 23: Vergleich der Calbindin Expression im Gyrus Dentatus des KO vs. WT

Sagittalschnitte des Alters P12 wurden mit einem primären Antikörper gegen Calbindin und einem Cy3-gekoppelten, sekundären Antikörper gefärbt. Der Antikörper markierte vorwiegend die Körnerzellen im Gyrus dentatus. Im Vergleich zum Wildtyp (A, B) konnte im cGKI-KO (C, D) kein Unterschied im Calbindin-Expressionsmuster beobachtet werden. K: Körnerzellschicht, M: Molekularschicht, Maßbalken: 100 µm

3.2.6. Analyse des Bulbus olfactorius

Für Untersuchungen zur allgemeinen Morphologie des Bulbus olfactorius wurden ebenfalls Silber-Nissl-gefärbte coronale Gehirnschnitte von postnatalen WT- und KO-Mäusen des Alters P23 verglichen. Auch hier konnten in der allgemeinen Morphologie und im Schichtenaufbau des Bulbus olfactorius keine Abnormalitäten in der cGKI-defizienten Maus festgestellt werden (Abb. 24).



Abb. 24: Vergleich der allgemeinen Morphologie des Bulbus olfactorius im KO vs. Wildtyp

Silber-Nissl-Färbung von coronalen Hirnschnitten des Alters P23 auf Höhe des Bulbus olfactorius. In B und D sind jeweils die in A und C markierten Bereiche vergrößert dargestellt. Im Vergleich zum Wildtyp (A, B) konnten im cGKI-KO (C, D) keine morphologischen Unterschiede im Bulbus olfactorius festgestellt werden, sowohl die Körnerzellschicht, die Mitralzellschicht als auch die Glomeruli glichen denen im WT. (der dargestellte Schnitt des WT wurde etwas stärker mit Silber gefärbt als der vom KO und überdeckt somit etwas mehr die blaue Nissl-Zellfärbung) GI: Glomeruli, K: Körnerzellschicht, M: Mitralzellen; Maßbalken: 200 µm (A, C), 100 µm (B, D)

3.2.7. Analyse des Cerebellums

Für vergleichende Untersuchungen des Cerebellums, dessen Purkinje-Zellen im postnatalen Gehirn die stärkste Expression der cGKIa zeigten, wurden Gewebe-Schnitte des Alters P13 mit einem Antikörper gegen Calbindin gefärbt, der die Zellkörper, Dendriten und Axone der Purkinje-Zellen markierte. Es konnten weder Unterschiede in der Cerebellumstruktur zwischen KO und WT festgestellt werden, noch im Expressionsmuster des Calbindins (Abb. 25).



Abb. 25: Sagittalschnitte durch das Cerebellum von Wildtypmäusen (A, B) und cGKI-defizienter Mäusen (C, D) im postnatalen Entwicklungsstadium P13. Die Schnitte wurden mit einem primären Antikörper gegen Calbindin und einem Cy3-gekoppelten, sekundären Antikörper gefärbt. Der Antikörper markierte sowohl die Zellkörper und Dendriten der Purkinje-Zellen als auch die durch die Körnerzellschicht ziehenden Axone. Im Vergleich zum Wildtyp (A, B) konnte im cGKI-KO (C, D) kein Unterschied im Calbindin-Expressionsmuster beobachtet Körnerzellschicht, werden. **K**: **M**: Molekularschicht; Maßbalken: 100 µm (A, C), 50 µm (B, D)

3.3. Untersuchung bekannter und putativer cGKI-Substrate hinsichtlich einer Beteiligung an der axonalen Wegfindung

Abgesehen von den, in cGKI-defizienten Mäusen beobachteten Wegfindungsfehlern sensorischer Spinalganglienaxone ist bislang nichts über den von der cGKIα vermittelten Signalweg in diesen Neuronen bekannt. In diesem Teil der Arbeit wurden deshalb bekannte und putative cGKI-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 (Abb. 26, siehe auch Kap. 3.2.1.). Aufgrund des axonalen Verzweigungsfehlers wurde sich hierbei auf Zytoskelett-assoziierte Proteine konzentriert.



Abb. 26: Die Abb. wurde mit freundlicher Genehmigung aus Schmidt et al., 2002 entnommen. Transversalschnitte des Rückenmarks von Embryonen des Alters E14 wurden mit einem primären Antikörper gegen trkA und einem Cy3-gekoppelten, sekundären Antikörper gefärbt. In cGKI-defizienten Mäusen wurde ein überschießendes Wachstum von Axonen Richtung Zentralkanal beobachtet. Maßbalken: 100µm

3.3.1. Untersuchung von CRP2 (Cysteine-rich Protein 2)

CRP2 wurde von Okano und Kollegen aus dem Gehirn der Ratte kloniert (Okano et al., 1993) und gehört neben CRP1, CRP2/SmLIM, CRP3/MLP und CRIP zur Familie der Cystein-reichen Proteine, die mit dem Aktin-Zytoskelett assoziiert sind (Louis et al., 1997). Huber und Kollegen identifizierten im Zweihybriden Hefesystem intestinales CRP2 der Ratte als Interaktionspartner von cGKIβ. Sie konnten *in vitro* zeigen, dass neben cGKIβ auch cGKIα und in einem deutlich geringeren Maße auch cGKII in der Lage waren CRP2 zu phosphorylieren, jedoch nicht die cAK (Huber et al., 2000). CRP2 (der Ratte) enthält an der Aminosäureposition Serin¹⁰⁴ eine putative Phosphorylierungsstelle (RKTS) für die cAK/cGK-Serin/Threonin-Kinasen, deren Phophorylierung durch cGKIβ in COS-Zellen gezeigt wurde (Huber et al., 2000). CRP2 wird im Rückenmark adulter Mäuse in der Lamina I und II exprimiert (persönliche Kommunikation mit Dr. Matthias Sausbier).

Um eine mögliche Beteiligung von CRP2 an den in cGKI-defizienten Embryonen gefundenen Wegfindungsfehlern im Rückenmark zu untersuchen, stellte Dr. Matthias Sausbier freundlicherweise CRP2-defiziente Mäuse des Alters E13,5 zur Verfügung. Von zwei KOund zwei WT- Embryonen wurden serielle Transversalschnitte angefertigt und die zentrale Projektion der nozizeptiven Neurone mit einem Antikörper gegen trkA untersucht. Es konnten keine Wegfindungsfehler nozizeptiver Neurone im dorsalen Funiculus/ Rückenmark CRP2defizienter Embryonen beobachtet werden (Abb. 27).



Abb. 27: Transversalschnitte von Embryonen des Entwicklungsstadiums E13,5; Wildtyp (A, C), CRP2-defizient (E, G). Die Schnitte wurden mit einem primären Antikörper gegen trkA und einem Cy3-gekoppelten, sekundären Antikörper gefärbt. Schnittebenen sind im kleinen Bild angegeben. Es konnten keine Unterschiede in der Zentralprojektion der trkA-positiven Neuronen zwischen WT und KO beobachtet werden. DF: dorsaler Funiculus, dW: dorsale Wurzel, N: Notochord, R: Rückenmark, S: Spinalganglion, vW: ventrale Wurzel; Maßbalken: 100µm

3.3.2. Untersuchung von Myosin IIB bzw. der Myosinphosphatase

Myosin IIB zählt neben Myosin IIA zur Haupt-Myosinform im Nervensystem (Rochlin et al., 1995). Myosin IIB konnte zusammen mit F-Aktin in den Wachstumskegeln von Spinalganglien der Ratte lokalisiert werden (Cheng et al., 1992). Zudem ist Myosin IIB für eine normale Aktinorganisation, Größe und Beweglichkeit von Wachstumsgkegeln notwendig und spielt beim retrograden Aktinfilamentfluß in den Wachstumskegeln eine Rolle (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 entscheidend (Burridge, 1999). Surks und Kollegen zeigten, daß die cGKIα über ihr N-terminales Segment eine Interaktion mit der Myosin-bindenden Untereinheit (MBS) der Myosinphosphatase eingeht und eine Entkopplung dieser Interaktion die cGMP-abhängige Dephosphorylierung der leichten Myosinkette (MLC) verhindert (Surks et al., 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zunächst vergleichende Versuche zur Phosphorylierung der MLC und der MBS in Spinalganglien cGKI-defizienter und Wildtypmäuse durchgeführt, die jedoch zu keinen auswertbaren Ergebnissen führten (siehe Kap. 4.2.2. der Diskussion). Da die Myosinphosphatase an der Regulation des Myosin IIB-Systems beteiligt ist und keine Myosinphosphatase-defizienten Mäuse erhältlich waren, wurden in dieser Arbeit Mäuse, welche defizient für die schwere Kette IIB des Myosins sind (Tullio et al., 1997), auf mögliche Wachstumsfehler der sensorischen Spinalganglienaxone im dorsalen Funiculus untersucht. Dazu wurden serielle Transversalschnitte von Embryonen der Altersstadien E10-E14 (E10+E11: 1 KO, 1 WT; E12: 2 KO, 2 WT; E13: 4 KO, 2 WT; E14: 2 KO, 2 WT) angefertigt und mit einem Antikörper gegen trkA gefärbt. Einige Schnitte wurden auch mit einem Antikörper gegen cGKIa gefärbt. Zusätzlich wurden von drei KO-Embryonen und vier WT-Embryonen des Entwicklungsstadiums E11,5 Ganzkörperfärbungen mit einem Antikörper gegen Neurofilament angefertigt. In keinem der untersuchten Altersstadien konnten im Vergleich zum WT Unterschiede in der Zentralprojektion trkA-, cGKIa- und Neurofilament-positiver Spinalganglienaxone beobachtet werden (Abb. 28). In den Ganzkörperfärbungen der Embryonen mit Neurofilament konnten im dorsalen Funiculus, im Bereich der hinteren Extremität sowohl im WT als auch im KO leicht überschießende Spinalganglienaxone beobachtet werden (Abb. 28 A, B). Dies scheint jedoch eine Art "Auffülleffekt" des dorsalen Funiculus zu sein, da sich dieses Phänomen auf eine Region beschränkt, in der die ventral-dorsal Ausdehnung des Hinterstranges geringer ist, als die in weiter rostral gelegenen Regionen. Zudem verlaufen die aus den Beinen kommenden Fasern üblicherweise im Hinterstrang am medialsten.

Auch in trkA-gefärbten Transversalschnitten zweier Embryonen (ein E13, ein E14,5 Embryo) des Stammes Myosin IIB-delta (hypomorph), in denen Myosin IIB um 65 % reduziert ist (Uren et al., 2000), wurden keine Wegfindungsfehler sensorischer Axone im Rückenmark detektiert.



Abb. 28: A-D: Ganzkörperfärbungen der Embryonalstadien E11,5. Die Embryonen wurden mit einem primären Antikörper gegen Neurofilament und einem HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper gefärbt. A+B: Aufsicht von dorsolateral auf die Spinalganglien im lumbosakralen Bereich des Rückenmarks. Sowohl im WT (A) als auch im Myosin IIB-defizienten Embryo (B) konnten in dieser Region überschießende Axone der Spinalganglien (Pfeile) beobachtet werden, die scheinbar einen "Auffülleffekt" des dorsalen Funiculus widerspiegeln. C+D: Aufsicht von dorsolateral auf die Spinalganglien im zervikalen Bereich des Rückenmarks. In dieser Region, wo die Verzweigung im dorsalen Funiculus fortgeschrittener ist, wurden keine überschießenden Fasern im WT (C) und KO (D) beobachtet. E+F: Transversalschnitte des Rückenmarks von Embryonen des Entwicklungsstadiums E13. Die Schnitte wurden mit einem primären Antikörper gegen trkA und einem Cy3-gekoppelten, sekundären Antikörper gefärbt. Dorsal ist oben, ventral unten im Bild. Auch die trkA-positiven Fasern im dorsalen Funiculus zeigten im MyoIIB-KO (G) keine Unterschiede zum WT (F). C6 bzw C7: sechstes bzw. siebentes zervikales Spinalganglion; L4: viertes lumbales Spinalganglion, S1: erstes sakrales Spinalganglion; Maßbalken: 50 μm (F+G), 200 μm (A-D)

3.3.3. Untersuchung von VASP (Vasodilator-stimulated phosphoprotein)

VASP gehört in Vertebraten neben Mena (Mammalian enabled) und Evl (Ena-VASP-like) zur Ena/VASP-Proteinfamilie, die an der aktinvermittelten Regulation der Zellmorphologie und Beweglichkeit beteiligt sind (Gertler et al., 1996; Krause et al., 2003). Die Ena/VASP-Proteine sind bekannte Substrate der cAMP- und cGMP-abhängigen Serin/Threonin-Kinasen und besitzen eine (Evl), zwei (Mena) oder drei (VASP) cAK/cGKspezifische Phosphorylierungskonsensussequenzen (Reinhard et al., 2001). 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).

VASP und Mena wurden in der vorliegenden Arbeit hinsichtlich einer Expression in den embryonalen Spinalganglien untersucht. Eine Expression von VASP konnte im Alter E12 und E14 gezeigt werden (siehe Kap. 3.3.3.1.1.). Von Mena konnten die 80 kD- und 140 kD-Isoform in Spinalganglien des Alters E14 detektiert werden (Abb. 29). Mit dem verwendeten Antikörper konnte im Vergleich zum Wildtyp kein Unterschied im Expressionsmuster von Mena in cGKI-defizienten Spinalganglien beobachtet werden, auch nicht nach Stimulation mit dem cGK-Aktivator 8-pCPT-cGMP.



Abb. 29: Die Lysate von Spinalganglien des Entwicklungsstadiums E14 wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Detektion der Banden erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper (mAB) bzw. einem polyklonalen Antikörper gegen Mena und einem HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper. Mit beiden Antikörpern konnte die 80 kD-Isoform und die 140 kD-Isoform in den Spinalganglien detektiert werden.

3.3.3.1. Untersuchungen zur cGKI-abhängigen VASP-Phosphorylierung in embryonalen Spinalganglien

Da die cGK neben der cAK in der Lage ist VASP zu phosphorylieren (Halbrugge et al., 1990; Butt et al., 1994) und sowohl VASP als auch cGKIα in den Spinalganglien exprimiert werden, wurde die Phosphorylierung von VASP in Spinalganglien cGKI-defizienter Mäuser mit der in Wildtyp-Mäusen verglichen.

Hierzu wurden die präparierten Spinalganglien der Embryonalstadien E12 bzw. E14 entweder mit dem Phosphodiesterase-resistenten cGK-Aktivator 8-pCPT-cGMP inkubiert, (was zu einer Erhöhung der cGMP Konzentration führt und dadurch wiederum zur verstärkten Stimulation der cGK) oder als Kontrolle unbehandelt belassen. Die Phosphorylierung wurde mit einem polyklonalen Antikörper gegen Gesamt-VASP detektiert, der sowohl phosphoryliertes als auch unphosphoryliertes VASP erkennt. Eine Phosphorylierung von Serin 152 (murines VASP) führt in der SDS-PAGE zu einer Bandenverschiebung von 46 kD (unphosphoryliert) zu 50 kD (phosphoryliert). Die Bandenintensitäten von phosphoryliertem zu unphosporyliertem VASP wurden bestimmt und ins Verhältnis gesetzt. Versuche die cGKI-abhängige Phosphorylierung mit einem phosphospezifischen Antikörper (Maus anti VASP-16C2, Fa. nanoTools) zu untersuchen, der die Serin-Phosphorylierung von VASP an der Aminosäureposition 239 (humanes VASP) erkennen sollte, schlugen fehl, da mit dem Antikörper keine spezifischen Banden detektiert werden konnten.

3.3.3.1.1. Ermittlung der optimalen Stimulationszeit mit 8-pCPT-cGMP

Um die effektivste Stimulationsdauer mit 8-pCPT-cGMP herauszufinden, bei der das Verhältnis von phosphoryliertem VASP zu unphosphoryliertem am größten war, wurden in einem Vorversuch Wildtyp-E12-Spinalganglien mit 1 mM 8-pCPT-cGMP für 1 min, 5 min, 15 min oder 30 min inkubiert. Effektiv zeigte sich eine Stimulationsdauer von 5 min (Abb. 30). Diese Inkubationszeit kam deshalb in den folgenden Experimenten zum Vergleich der VASP-Phosphorylierung in cGKI-defizienten Mäusen versus Wildtyp-Mäusen zur Anwendung (siehe Kap. 3.3.3.1.3.).



Abb. 30: Auswirkung der Stimulationsdauer mit 8-pCPT-cGMP auf die VASP-Phosphorylierung in Wildtyp-E12-Spinalganglien

Im oberen Bereich sind beispielhaft die vom Antikörper detektierten Banden von P-VASP (phosphoryliertes VASP) und VASP (unphosphoryliertes VASP) dargestellt. In der Grafik ist jeweils das Verhältnis von P-VASP zu VASP in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (- bis 30 min: keine Inkubation bis 30 min Inkubation) aufgetragen. Bei 5 min Inkubation war das Verhältnis von P-VASP zu VASP am größten.

3.3.3.1.2. Dephosphorylierung von VASP mit der λ- Protein-Phosphatase

Zur Kontrolle des VASP-Antikörpers wurden E12-Wildtyp-Spinalganglien wie unter Kapitel 2.2.2.6. beschrieben, mit der λ -Protein-Phosphatase behandelt bzw. unbehandelt belassen. Der Antikörper detektierte erwartungsgemäß in den Lysaten der dephosphorylierten Probe nur die 46 kD Bande, in der unbehandelten Kontrolle zusätzlich die 50 kD Bande für phosphoryliertes VASP (Abb. 31).



Abb. 31: Dephosphorylierung mit λ -Protein-Phosphatase

Spur 1: mit λ -Protein-Phosphatase behandelte, Spur 2: unbehandelte E12 Wildtyp-Spinalganglien. Die Lysate wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit dem Antikörper gegen VASP und einem sekundären, HRP-gekoppelten Antikörper detektiert. Der Antikörper konnte in der dephosphorylierten Probe kein phosphoryliertes VASP (P-VASP) detektieren.

3.3.3.1.3. Vergleichende Untersuchung zur VASP-Phosphorylierung in WT- und cGKIdefizienten Spinalganglien

Die Spinalganglien von neun Wildtyp- und vier cGKI-defizienten Mäusen aus insgesamt drei Würfen des Embryonalstadiums E14 wurden, wie oben beschrieben, hinsichtlich der VASP-Phosphorylierung untersucht. Die 5 minütige Stimulation der Spinalganglien mit 1 mM 8-pCPT-cGMP führte, im Vergleich zu unstimulierten Spinalganglien, zu einer deutlich signifikanten Erhöhung der VASP-Phosphorylierung im Wildtyp (p<0,0001 Mann-Whitney U Test, $n_{WTstim} = 9$, $n_{WTunstim} = 9$) aber auch zu einer signifikanten Erhöhung der VASP-Phosphorylierung in der cGKI-defizienten Maus (p=0,0427 Mann-Whitney U Test, $n_{KOstim} = 4$, $n_{KOunstim} = 4$; siehe Abb. 32 und Kap. 4.2.3.).



WT stim.	WT unstim.	Parameter	KO stim.	KO unstim.
1.98	0.55	Mittelwert	0.73	0.42
9	9	Gruppengröße	4	4
0.65	0.11	Standardabweichung 0.15		0.11
0.22	0.04	Standardfehler 0.07		0.06
1.31	0.4	Minimum	0.58	0.34
3.08	0.74	Maximum	0.9	0.58
< 0.0	0001	p-Wert (MWU)	0.0	427

Abb. 32: Erhöhte VASP-Phosphorylierung in E14 Wildtyp und cGKI-defizienten Spinalganglien durch Stimulation mit 1 mM 8-pCPT-cGMP

Im oberen Bereich sind beispielhaft die vom Antikörper detektierten Banden von P-VASP (phosphoryliertes VASP) und VASP (unphosphoryliertes VASP) dargestellt. In der Grafik ist jeweils das Verhältnis von P-VASP zu VASP in mit 8-pCPT-cGMP behandelten oder unbehandelten Spinalganglien (linke Hälfte: Wildtyp, rechte Hälfte: cGKI-defizient=KO aufgetragen, mit Angabe des Standardfehlers und der Signifikanz (*: p<0,05; ***: p<0,001). Im unteren Teil sind tabellarisch die statistischen Parameter des Mann-Whitney U Tests (MWU) für den Vergleich: Wildtyp stimuliert (WT stim) versus Wildtyp unstimuliert (WT unstim.) bzw. KO stimuliert (KO stim.) versus KO unstimuliert (KO unstim.) aufgeführt. Die Stimulation mit 8-pCPT-cGMP führte sowohl im Wildtyp als auch im KO zu einer Erhöhung der VASP-Phosphorylierung.

Während sich die VASP-Phosphorylierung in unstimulierten Wildtyp-Spinalganglien versus unstimulierten cGKI-defizienten Spinalganglien nicht signifikant unterschied (p=0.0756 Mann-Whitney U Test, $n_{WT} = 9$, $n_{KO} = 4$), konnte eine signifikante Verminderung der VASP-Phosphorylierung in stimulierten cGKI-defizienten Spinalganglien versus stimulierten Wildtyp Spinalganglien beobachtet werden (p=0,0028 Mann-Whitney U Test, $n_{WTstim} = 9$, $n_{KOstim} = 4$; siehe Abb. 33). Diese Ergebnisse machen deutlich, dass VASP ein Substrat der cGKI in den Spinalganglien ist.



WT stim.	KO stim.	Parameter WT unstim.		KO unstim.
1.98	0.73	Mittelwert 0.55		0.42
9	4	Gruppengröße	9	4
0.65	0.15	Standardabweichung	0.11	0.11
0.22	0.07	Standardfehler	0.04	0.06
1.31	0.58	Minimum	0.4	0.34
3.08	0.9	Maximum	0.74	0.58
0.0028		p-Wert (MWU)	0.0	756

Abb. 33: Verminderte VASP-Phosphorylierung in E14 Spinalganglien cGKI-defizienter Mäuse durch Stimulation mit 1 mM 8-pCPT-cGMP

Im oberen Bereich sind beispielhaft die vom Antikörper detektierten Banden von P-VASP (phosphoryliertes VASP) und VASP (unphosphoryliertes VASP) dargestellt. In der Grafik ist jeweils das Verhältnis von P-VASP zu VASP in mit 8-pCPT-cGMP behandelten (linke Hälfte) oder unbehandelten Spinalganglien (rechte Hälfte) aufgetragen, mit Angabe des Standardfehlers und der Signifikanz (**: p<0,01). Im unteren Teil sind tabellarisch die statistischen Parameter des Mann-Whitney U Tests (MWU) für den Vergleich Wildtyp stimuliert (WT stim) versus KO stimuliert (KO stim.) bzw. Wildtyp unstimuliert (WT unstim.) versus KO unstimuliert (KO unstim.) aufgeführt. Die Stimulation mit 8-pCPT-cGMP führte im Vergleich zum WT zu einer signifikanten Verminderung der VASP-Phosphorylierung im KO. Ohne Stimulation unterschied sich die VASP-Phosphorylierung nicht signifikant.

3.3.3.2. Untersuchung der zentralen Projektion der Spinalganglienaxone in VASPdefizienten Mäusen

Da VASP als Substrat der cGKI in den Spinalganglien identifiziert werden konnte (siehe Kap. 3.3.3.1.3.), wurde überprüft, ob bei Abwesenheit von VASP die Axone der Spinalganglienneurone ebenfalls Verzweigungsfehler im dorsalen Funiculus aufweisen. Dazu wurden von 7 KO-Embryonen des Alters E10 und 6 KO-Embryonen des Alters E11 Ganzkörperfärbungen mit Neurofilament angefertigt. Weiterhin wurden trkA-gefärbte serielle

Transversalschnitte von zwei E14 VASP-defizienten Mäusen (Aszodi et al., 1999) untersucht. Als Kontrollen dienten bei den Ganzkörperfärbungen Wildtypmäuse der Stämme cGKI und Myosin IIB sowie bei den Schnitten Wildtypmäuse der Stämme SVF 129 ("VASP Background") und Myosin IIB.

In keinem der untersuchten VASP-defizienten Embryonen konnten Wegfindungsfehler, wie sie in der cGKI-KO-Maus in diesen Altersstadien auftreten (siehe Abb. 17 und 26), gefunden werden, noch wurden andere Abnormalitäten im Bereich des dorsalen Funiculus beobachtet (Abb. 34). Auch die periphere Projektion der Spinalnerven, wie die Bildung des Plexus brachiales war wie im WT.



Abb. 34: A-E: Ganzkörperfärbungen der Embryonalstadien E10 (A+B) und E11 (C, D, E). Die Embryonen wurden mit einem primären Antikörper gegen Neurofilament und einem HRP-gekoppelten, sekundären Antikörper gefärbt. A+B: Aufsicht von lateral auf die zervikalen Spinalganglien eines WT-Embryos (A) und eines VASP-defizienten Embryos des Alters E10. Außer leichten entwicklungsabhängigen Unterschieden konnten keine Abnormalitäten hinsichtlich der Form und Größe der Spinalganglien, der Bildung des dorsalen Funiculus und der beginnenden Bildung des Plexus brachialis durch die peripheren Spinalnerven beobachtet werden. C-E: dorsolaterale bzw. dorsale Aufsicht (D) auf die Spinalganglien und den dorsalen Funiculus drei verschiedener VASP-KO Embryonen des Alters E11. In keinem der untersuchten Embryonen konnten Richtung Zentralkanal überschießende Axone beobachtet werden. Auch die Bildung des Plexus brachialis war wie im WT. F+G: Transversalschnitte des Rückenmarks von Embryonen des Entwicklungsstadiums E14. Die Schnitte wurden mit einem primären Antikörper gegen trkA und einem Cy3-gekoppelten, sekundären Antikörper gefärbt. Auch die trkA-positiven Fasern im dorsalen Funiculus zeigten im VASP-KO (G) keine Unterschiede zum WT. R: Rückenmark, S: Spinalganglion, dW: dorsale Wurzel, C5-C8: fünftes bis achtes zervikales Spinalganglion; T1 bzw. T2: erstes bzw. zweites thorakales Spinalganglion; Z: Zentralkanal; Maßbalken: 50μm (F+G), 100 μm (D+E), 200 μm (A-C)

3.4. Suche nach Interaktionspartnern der cGKI

Da keines der untersuchten, bekannten cGKI-Substrate für die Wegfindung sensorischer Axone von Bedeutung zu sein schien wurden in diesem Teil der Arbeit parallel zwei alternative Ansätze verfolgt, um potentielle Interaktionspartner der cGKI im Nervensystem zu finden. Zum einen wurde mit Hilfe der Zweidimensionalen Gelelektrophorese cGKIdefizientes 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 cGKIα durchsucht.

3.4.1. Untersuchungen des Cerebellum-Proteoms von cGKI-defizienten und WT-Mäusen mittels Zweidimensionaler Gelelektrophorese

3.4.1.1. Vergleichende Untersuchungen zur Proteinexpression in cGKI-defizienten- und Wildtyp-Mäusen

Zur Untersuchung möglicher Unterschiede im Cerebellum-Proteom cGKI-defizienter und WT Mäuse wurden die Cerebella jeweils drei verschiedener WT und KO Mäuse des Alters P10 präpariert, wie in Kapitel 2.2.5.1. beschrieben, mit dem cGK-Aktivator 8-pCPT-cGMP stimuliert, die Gewebe-Lysate aufbereitet und je 55 µg der Probe mittels Zweidimensionaler Gelelektrophorese aufgetrennt. Um einen ersten Gesamtüberblick über die Proteinexpression zu bekommen wurden 17 cm lange IPG-Streifen des pH Bereichs 3-10 für die isoelektrische Fokussierung verwendet und für die zweite Dimension 12,5 % Polyacrylamidgele des Formats 25 x 20 cm, um eine Auftrennung von Proteinen im Bereich von ca. 10 bis 100 kD zu ermöglichen. Um möglichst viele Proteinspots zu detektieren, wurden die Gele einer sensitiven Silberfärbung unterzogen. Die Gele wurden dokumentiert und die Proteinmuster visuell mit Hilfe der Software Delta 2D (Fa. Decodon) verglichen (Abb. 35). Insgesamt konnten pro Gel ca. 1000 Proteinspots detektiert werden. Dabei wurde kein Spot gefunden, der ausschließlich nur in den WT-Proben oder nur in den KO-Proben präsent war. Ein Proteinspot zeigte in allen KO-Proben eine schwächere Silberfärbung als der entsprechende Spot in den WT-Proben. Eine Spot-Quantifizierung mit der Software war jedoch aufgrund der Silberfärbung nicht sinnvoll. Die Analyse des Proteinspots mittels Massenspektrometrie und Datenbank-Abgleich identifizierte das Protein als B22-Untereinheit der NADH-Q-Reduktase ("NADH-ubiquinone oxidoreductase B22 subunit": SwissProt-Zugangsnummer Q9CQJ8), welches in der Atmungskette im Zusammenhang mit NADH beim Transfer von Elektronen eine Rolle spielt (Abb. 36).



Abb. 35: Beispielhaft ist ein mit der Software erstelltes Zweikanalbild dargestellt, in dem das silbergefärbte WT Gel (grün) und das KO Gel (rot) übereinandergelegt sind. Übereinanderlagerungen resultieren in einer Gelb-Färbung. Der pH Bereich ist oberhalb des Bildes angegeben, sowie links die molare Masse in kD.



B22-Untereinheit der NADH-Q-Reduktase					
Genname	SwissProt- Zugangsnummer	Theoretischer pI	Errechnete molare Masse		
Ndufb9	Q9CQJ8	7,83	21,8 kD		

Abb. 36: A-C: Beispielhaft ist der als B22 Untereinheit der NADH-Q Reduktase identifizierte Proteinspot im 2D-Gel dargestellt. Die einzelnen WT (B) und KO (C) Kanäle sind aus Kontrastgründen in schwarz/weiss dargestellt, im Zweikanalbild (A) ist der WT grün und der KO rot dargestellt. Der im Vergleich zum KO im WT stärker gefärbte Spot erscheint somit in A als grüner Spot. In der Tabelle sind der theoretische isoelektrische Punkt (pI) und die molare Masse des Proteins angegeben.

Des Weiteren wurden im Alter P12 die mit dem cGK-Aktivator 8-pCPT-cGMP stimulierten Cerebella jeweils drei verschiedener WT- und KO-Mäuse auf Unterschiede in der Proteinexpression untersucht. Hierbei wurden für die isoelektrische Fokussierung mit 7 cm langen IPG-Streifen (pH 3-10) je 100 µg der Probe geladen. Für die zweite Dimension wurden 12 % Polyacrylamidgele des Formats 10 x 8 cm verwendet. Die Gele wurden mit Coomassie Brilliant Blue G250 gefärbt, mit der Delta 2D Software verglichen und die Spots quantifiziert und gefiltert (siehe Kap. 2.2.5.7.2.). Dabei wurden jeweils als Gelpaar ein WT-Gel und ein KO-Gel aus dem gleichen Gellauf miteinander verglichen. Insgesamt konnten pro Gel ca. 560 Proteinspots mit der Coomassie-Färbung detektiert werden. Ein Spot wurde in zwei von drei Gelpaaren als im KO herunterreguliert gefunden (Verhältnis der Volumenprozente KO/WT $\leq 0,5$) und konnte als D-Kette der mitochondrialen ATP-Synthase ("ATP synthase D chain, mitochondrial", SwissProt-Zugangsnummer Q9DCX2) identifiziert werden. In Abb. 37 sind die Quantifizierungsdaten und Informationen zum Proteinspot zusammengefasst. Zusammenfassend wurde somit sowohl im Alter P10 (Silbergele) als auch im Alter P12 (Coomassie-Gele) im cGKI-defizienten Cerebellum je ein Protein, welches Bestandteil der Atmungskette ist, im Vergleich zum Wildtyp herunterreguliert.

A	B +/+	C _/-
.	i ●	-

Spot Nr. 30	Gelpaar 1	Gelpaar 2	Gelpaar 3	D-Kette der mitochone Synthase	drialen ATP-
% Volumen WT	0,14	0,39	0,29	Genname	ATP5H
% Volumen KO	0,16	0,11	0,09	SwissProt- Zugangsnummer	Q9DCX2
% Volumen KO / % Volumen WT	1,19	0,27	0,32	Theoretischer pI	5,52
Volumen WT	24,60	50,48	36,11	Errechnete	18.6 kD
Volumen KO	23,32	13,04	15,08	molare Masse	10,0 KD

Abb. 37: A-C: Beispielhaft ist der als D-Kette der mitochondrialen ATP-Synthase identifizierte Proteinspot (Pfeil) im 2D-Gel dargestellt. Die einzelnen WT- (B) und KO- (C) Kanäle sind aus Kontrastgründen in schwarz/weiss dargestellt, im Zweikanalbild (A) ist der WT grün und der KO rot dargestellt. Der im Vergleich zum KO im WT stärker gefärbte Spot erscheint somit in A als grüner Spot. Die linke Tabelle fasst die mit der Software erhobenen Quantifizierungsdaten des Spots in den drei Gelpaaren zusammen. Im Gelpaar 2 und 3 ist das Verhältnis der Volumenprozentwerte KO/WT kleiner als 0,5. Die Daten zum Gelpaar 1 wurden der Vollständigkeit halber mit angegeben obwohl der Proteinspot hier mit einem Verhältnis von 1,19 als nicht reguliert gilt. In der rechten Tabelle sind der theoretische isoelektrische Punkt (pI) und die molare Masse des Proteins angegeben.

Zwei Proteinspots wurden gefunden, die in allen drei Gelen im KO hochreguliert waren (Verhältnis der Volumenprozente KO/WT \geq 1,5). Spot Nr. 113 konnte als Glutathion S-transferase omega1 ("Glutathione transferase omega 1", SwissProt-Zugangsnummer O09131) identifiziert werden und Spot 495 als ADP-Ribosylierungsfaktor-ähnliches Protein 3 ("ADP-ribosylation factor-like protein 3", SwissProt-Zugangsnummer Q9WUL7). Die Abb. 38 fasst die Informationen und Quantifizierungsdaten beider Proteinspots zusammen.



Abb. 38: A-C: Beispielhaft sind die als Glutathion S-transferase omega 1 und

ADP-Ribosylierungsfaktor-ähnliches Protein 3 identifizierten Proteinspots (Pfeil) im 2D-Gel dargestellt. Die einzelnen WT- (B1, B2) und KO- (C1, C2) Kanäle sind aus Kontrastgründen in schwarz/weiss dargestellt, im Zweikanalbild (A1, A2) ist der WT grün und der KO rot dargestellt. Der im Vergleich zum WT im KO stärker gefärbte Spot erscheint somit A als roter/rötlicher Spot. Die Tabelle fasst jeweils die mit der Software erhobenen Quantifizierungsdaten der Spots in den drei Gelpaaren zusammen. In allen drei Gelpaaren ist das Verhältnis der Volumenprozentwerte KO/WT größer als 1.5. In der rechten Tabelle sind jeweils der theoretische isoelektrische Punkt (pI) und die molare Masse des Proteins angegeben.

Spot Nr. 113	Gelpaar 1	Gelpaar 2	Gelpaar 3	Glutathion S-transferase omega 1		
% Volumen WT	0,01	0,01	0,01	Genname	Gsto1	
% Volumen KO	0,02	0,02	0,02	SwissProt- Zugangsnummer	O09131	
% Volumen KO / % Volumen WT	1,73	3,16	2,24	Theoretischer pI	6,92	
Volumen WT	2,01	0,70	0,99	Errechnete	27.5 kD	
Volumen KO	2,77	2,14	2,85	molare Masse	27,3 KD	
Spot Nr. 495	Gelpaar 1	Gelpaar 2	Gelpaar 3	ADP-Ribosylierungsfaktor-ähnliches Protein 3		
% Volumen WT	0,01	0,003	0,01	Genname	Arl3	
% Volumen KO	0,03	0,02	0,03	SwissProt- Zugangsnummer	Q9WUL7	
% Volumen KO / % Volumen WT	1,88	5,82	2,74	Theoretischer pI	6,74	
Volumen WT	2,50	0,40	1,33	Errechnete	20.5 kD	
Volumen KO	3,76	2,24	4,70	molare Masse	20,3 KD	

3.4.1.2. Vergleichende Untersuchungen zum Phosphorylierungsmuster im Cerebellum cGKI-defizienter- und Wildtyp-Mäuse

Um einen ersten Überblick über das Phosphorylierungsmuster der in der Zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine des cGK-defizienten Cerebellums im Vergleich zum WT-Gewebe zu bekommen, wurden die Gele mit dem Fluoreszenzfarbstoff "Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain" (Molecular Probes) gefärbt, der die Phosphatgruppen der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin detektiert. Hierfür wurden die gleichen Gelpaare verwendet, die im Kapitel zuvor als Coomassie-gefärbte Gele hinsichtlich der Proteinexpression untersucht wurden, d.h. nach der zweiten Dimension wurden die Gele zunächst mit "Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain" gefärbt und im Anschluß daran mit Coomassie.

Etwa 85 Proteinspots konnten mit dem Phosphoprotein-Farbstoff gefärbt werden, die meisten davon jedoch recht schwach. Die Gele wurden zunächst visuell verglichen. Von fünf deutlich gefärbten Spots, die in mindestens zwei von drei Gelpaaren im WT stärker gefärbt waren, wurde aus den entsprechenden Coomassie Gelen der Spot ausgeschnitten und die enthaltenen Proteine massenspektrometrisch identifiziert (Abb. 39). In der Tabelle 2 sind die in dem jeweiligen Gelspot gefundenen Proteine aufgelistet. Außer in Spot Nr. 2 wurden mindestens zwei Proteine pro Spot gefunden. Es konnte also nicht eindeutig festgestellt werden, ob bzw. welches oder welche dieser Proteine die Phosphofärbung hervorrief (siehe Kap. 4.3.1.2 und 4.3.1.3.). Die identifizierten Proteine wurden mit Hilfe des NetPhos 2 Programms auf wahrscheinliche Phosphorylierungsstellen untersucht sowie auf putative cAK/cGK-Phosporylierungskonsensussequenzen (Tab. 2). Pro Spot konnte je ein Protein gefunden werden, dass eine putative cAK/cGK-Phosporylierungskonsensussequenz aufwies. Die Quantifizierung der Spots mit der Software ergab nur für ein Gelpaar und vier Spots ein Volumenprozentverhältnis KO /WT von kleiner als 0,5 (hochreguliert im WT) (Tab. 3).

Es konnte also anhand der bisherigen Daten keine eindeutige Veränderung des Phosphorylierungsmusters eines der beschriebenen Spots bzw. Proteine zwischen WT- und KO-Gewebe beobachtet werden. Dennoch könnten einige der identifizierten Proteine als Kandidaten für weitergehende Phosphorylierungsversuche interessant sein (siehe Kap. 4.3.1.2.).



Abb. 39: Dargestellt sind Ausschnitte der mit "Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain" gefärbten 3 Gelpaare. Als Probe diente mit 8-pCPT-cGMP stimuliertes P12 Cerebellum von WT- bzw. cGK-defizienten Mäusen. Die fünf mit Pfeilen markierten Spots zeigten in mindestens zwei der drei Gelpaare eine stärkere Färbung im Wildtyp. Nach der Phosphofärbung wurden die Gele mit Coomassie gefärbt und die entsprechenden Spots zur Identifizierung aus diesen Gelen ausgeschnitten. Unten links ist ein Coomassie Gel dargestellt, mit Markierung der ausgeschnittenen Spots und Angaben zum pH-Bereich und der molaren Masse.

Protein	Gen- name	Swiss Prot- Zugangs nummer	Theor. pI	molare Masse in kD	Anzahl putativer Phosphory- lierungsstellen	Putative cAK/cGK- Phosporylierungskonsensus sequenz (Aminosäureposition, Motiv, Wahrscheinlichkeit)
			ļ	Spot Nr. 1		
Splicing factor, argenine/serine- rich3	Sfrs3 (Srp20) (X16)	P84104	11,64	19,3	Ser-Reste: 20 Thr-Reste: 0 Tyr-Reste: 1	108 YRRRSPPPR 0.997 115 PRRSPRRR 0.998 120 PRRSFSRS 0.998
Aprt protein (Adenine phosphoribosyl transferase)	aprt	Q6PK77	6,31	19,7	Ser-Reste: 7 Thr-Reste: 0 Tyr-Reste: 0	
				Spot Nr. 2		
Splicing factor, argenine/serine- rich3	Sfrs3 (Srp20) (X16)	P84104	11,64	19,3	Ser-Reste: 20 Thr-Reste: 0 Tyr-Reste: 1	108 Y RRRS PPPR 0.997 115 P RRRS PRRR 0.998 120 P <mark>RR</mark> R <mark>S</mark> FSRS 0.998
				Spot Nr. 3		
Heat shock protein HSP 90- alpha (HSP 86) (Tumor specific transplantation 86 kDa antigen)	Hspca (Hsp86)	P07901	4,93	84,6	Ser-Reste: 22 Thr-Reste: 11 Tyr-Reste: 10	
Heat shock protein HSP 90- beta (HSP 84) (Tumor specific transplantation 84 kDa antigen)	Hspcb (Hsp84)	P11499	4,97	83,1	Ser-Reste: 21 Thr-Reste: 8 Tyr-Reste: 11	451 R <mark>RR</mark> L <mark>S</mark> ELLR 0.863
				Spot Nr. 4		
Vascular actin single – stranded DNA- binding factor 2 p44 component (Purine rich element binding protein B)	Purb	O35295	5,35	33,9	Ser-Reste: 11 Thr-Reste: 2 Tyr-Reste: 4	
Guanine nucleotide- binding protein G ₍₀₎ , alpha subunit1	Gnao1	P18872	5,34	39,9	Ser-Reste: 9 Thr-Reste: 5 Tyr-Reste: 5	
Ubiquitin-like 1 activating enzyme E1A (SUMO-1 activating enzyme subunit1)	Uble1a	Q9R1T2	5,24	38,6	Ser-Reste: 13 Thr-Reste: 5 Tyr-Reste: 1	
Supressor of G2 allele of SKP1 homolog	Sugt1	Q9CX34	5,32	38	Ser-Reste: 13 Thr-Reste: 4 Tyr-Reste: 4	
NDRG4 protein (Brain development- related molecule 1)	Ndrg4 (Bdm1)	Q8BTG7	5,86	38,5	Ser-Reste: 17 Thr-Reste: 5 Tyr-Reste: 2	298 D RR L <mark>S</mark> GGAV 0.996

	Spot Nr. 5							
Neurofilament	Nef3	P08553	4,76	95,8	Ser-Reste: 54			
triplet M					Thr-Reste: 13			
protein					Tyr-Reste: 7			
(160kDa								
neurofilament								
protein)								
Epidermal	Eps15R	Q60902	4,86	99,2	Ser-Reste: 60	217	K <mark>RK</mark> K <mark>T</mark> VFAG	0.460
growth factor	-				Thr-Reste: 10			
receptor					Tyr-Reste: 4			
substrate 15-								
like1 (Eps15-								
related protein)								

Tab. 2: Zusammenfassung der aus den jeweiligen Gelspots identifizierten Proteine mit Angabe des Gennamens, der SwissProt-Zugangsnummer, des theoretischen isoelektrischen Punktes (pI) und der molaren Masse des Proteins. Weiterhin ist die Anzahl der mit NetPhos gefundenen wahrscheinlichen Phosphorylierungsstellen angegeben sowie das Vorhandensein einer putativen cAK/cGK-spezifischen Phosporylierungskonsensussequenz mit Angabe der Amminosäureposition des Serins bzw. Threonins, dem Motiv und der theoretischen allgemeinen Phosphorylierungswahrscheinlichkeit dieser Aminosäure (> 0,5: wahrscheinlich).

	Spot Nr. 1									
	% Volumen WT	% Volumen KO	% Volumen KO / % Volumen WT	Volumen WT	Volumen KO					
Gelpaar 1	0,53	0,41	0,78	12,90	9,50					
Gelpaar 2	0,55	0,19	0,34	26,45	9,01					
Gelpaar 3	0,55	0,50	0,90	46,52	33,18					
	Spot Nr. 2									
	% Volumen WT	% Volumen KO	% Volumen KO / % Volumen WT	Volumen WT	Volumen KO					
Gelpaar 1	0,66	0,48	0,73	15,99	10,95					
Gelpaar 2	0,45	0,16	0,35	21,31	7,58					
Gelpaar 3	0,57	0,43	0,75	47,45	28,50					
		SI	oot Nr. 3							
	% Volumen WT	% Volumen KO	% Volumen KO / % Volumen WT	Volumen WT	Volumen KO					
Gelpaar 1	4,57	3,24	0,71	111,62	74,46					
Gelpaar 2	3,71	2,14	0,58	177,58	103,19					
Gelpaar 3	2,97	4,31	1,45	249,26	288,21					
		SI	oot Nr. 4							
	% Volumen WT	% Volumen KO	% Volumen KO / % Volumen WT	Volumen WT	Volumen KO					
Gelpaar 1	1,48	1,38	0,93	36,23	31,81					
Gelpaar 2	1,49	0,39	0,26	71,36	18,65					
Gelpaar 3	1,06	1,55	1,46	89,07	103,39					
		SI	oot Nr. 5							
	% Volumen WT	% Volumen KO	% Volumen KO / % Volumen WT	Volumen WT	Volumen KO					
Gelpaar 1	0,53	0,37	0,70	12,89	8,45					
Gelpaar 2	0,24	0,10	0,42	11,44	4,83					
Gelpaar 3	0,32	0,25	0,77	26,65	16,40					

Tab. 3: Die Tabelle fasst die mit der Software erhobenen Quantifizierungsdaten der Spots in den drei Gelpaaren zusammen. Nur im Gelpaar 2 ist das Verhältnis der Volumenprozentwerte KO/WT bei den Spots 1, 2, 4 und 5 kleiner als 0,5.

Die in Kapitel 3.4.1.1. beschriebenen, in den Commassie-gefärbten Gelen identifizierten, Proteine, welche Unterschiede in der Expression zwischen WT und cGKI-KO aufwiesen, wurden mit "Pro-Q Diamond Phosphoprotein Gel Stain" nicht gefärbt. Über die B22-Untereinheit der NADH-Q-Reduktase, die in den silbergefärbten Gelen der WT Proben stärker exprimiert wurde, kann keine Aussage zur "Pro-Q Diamond Phosphoprotein" Färbung gemacht werden, da die Gele in unterschiedlichen Apparaturen fokussiert wurden, die sich hinsichtlich des basischen Auftrennungsbereiches unterschieden.

Untersuchungen der Aminosäuresequenzen dieser Proteine auf putative Phosphoylierungstellen mit NetPhos 2 ergaben für die B22-Untereinheit der NADH-Q-Reduktase sechs putative Serin-, eine Threonin- und zwei Tyrosinstellen und für die D-Kette der mitochondrialen ATP-Synthase vier Serin-, eine Threonin- und drei Tyrosinstellen. Für keines der beiden Proteine konnte eine cAK/cGK-spezifische Phosphorylierungskonsensussequenz gefunden werden.

3.4.2. Suche nach intrazellulären Interaktionspartnern der cGKIa im Zweihybriden Hefesystem

Zur Identifizierung intrazellulärer Bindungspartner der cGKIa wurde eine cDNA-Bibliothek von Mäusen des Embryonalstadiums E17 (Fa. Clontech) mit Hilfe des Zweihybriden Hefesystems durchmustert.

In einer sequentiellen Kotransformation wurde der Hefereporterstamm HF7c zunächst mit dem Köderplasmid pGBT9[cGKIα] (cGKIα im BD-Vector pGBT9) transfiziert und dann mit der cDNA-Bibliothek im AD-Vector pACT2. Anschließend wurden die Hefen auf eine Expression der Reportergene lacZ und HIS3 (Nutritionsmarker) getestet. Dazu wurden die auf einem Histidin-, Tryptophan-, Leucin-defizienten (-H, -W, -L)-Selektionsmedium gewachsenen Transformanten einem β-Galactosidase-Filterfarbtest unterzogen. Sechs primärpositive Transformanten wurden auf (-W, -L)-Selektionsmedium vereinzelt und erneut einem Filterfarbtest unterzogen. Die cDNA der putativen Interaktionspartner wurde anschließend aus den positiven Hefeklonen auf einem Zwischenweg über die auxotrophen Bakterien HB101 isoliert und deren Spezifität in einem anderen Hefestamm Y187 geprüft, dessen lacZ-Reportergen unter der Kontrolle eines anderen Promotors steht als im Hefestamm HF7c. Für vier der primärpositiven Klone konnte auch in diesem Hefestamm eine positive Interaktion mit dem Köderplasmid gezeigt werden. Ebenfalls wurde getestet ob die Klone nach der Kotransformation mit dem BD-Vector pGBT9 in der Lage waren allein die

BD-Plasmid AD-Plasmid		Interaktion
	Positivkontrolle	
pVA3	pTD1	+++
	Test der Klone	
pGBT9[cGKIα]	pACT2[Klon 4]	++
pGBT9[cGKIa]	pACT2[Klon 8]	++
pGBT9[cGKIa]	pACT2[Klon 12]	+
pGBT9[cGKIa]	pACT2[Klon 13]	+
	Negativkontrollen	
pGBT9	pACT2[Klon 4]	-
pGBT9	pACT2[Klon 8]	-
pGBT9	pACT2[Klon 12]	-
pGBT9	pACT2[Klon 13]	-
pGBT9[cGKIa]	pACT2	-

Transkription des Reportergens lacZ herbeizuführen, was nicht der Fall war. In der Tabelle 4 sind die im Hefestamm Y187 getesteten Interaktionen zusammengefasst.

Tabelle 4: Zusammenstellung der Ergebnisse des β -Galactosidase-Filterfarbtests der im Hefestamm Y187 getesteten Interaktionen. Die Interaktion des jeweiligen BD-Plasmids mit dem AD-Plasmid wurde anhand der Farbintensität bewertet: -: keine Blaufärbung/Hintergrundfärbung nach 24h; +: deutliche Blaufärbung nach 3h, ++: deutliche Blaufärbung nach 2h; +++: starke Blaufärbung nach 1h. Als Positivkontrolle diente die Interaktion zwischen pVA3 und pTD1, als Negativkontrollen die Interaktion des leeren Sonden-Vectors pGBT9 mit den primärpostiven Klonen.

3.4.2.1. Analyse der primärpositiven Klone

Um eventuell identische Klone auszuschließen, wurden die aus den vier positiven Hefeklonen isolierten pACT2-Plasmide (pACT2[cDNA]) zunächst mit den Restriktionsenzymen EcoRI und XhoI geschnitten, da die cDNA–Bibliothek über Xho I/EcoR I in den AD-Vector pACT2 kloniert wurde (Abb. 40).



Abb. 40: EcoRI/XhoI Restriktionsenzymverdau der aus den vier positiven Hefeklonen 4, 8, 12 und 13 isolierten pACT2[cDNA]. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte in einem 0,8 % igen Agarosegel. Neben der Bande des pACT2-Plasmids bei ca. 8,1 kb waren bei Klon 4, 12 und 13 je eine Bande auf Höhe von etwa 1,1kB zu sehen und bei Klon 8 von etwa 1kb. **M:** 1kb DNA-Marker

Da die cDNA-Insertgrößen der Klone eine ähnliche Größe aufwiesen (ca. 1kb) wurde die pACT2[cDNA] noch mit verschiedenen anderen Restriktionsenzymen geschnitten. Letzlich konnten dadurch die Klone 12 und 13 als identisch eingestuft werden. Somit wurden die aufgrund des Restriktionsenzymverdaus als unterschiedlich klassifizierten Klone 4, 8 und 13 sequenziert.

3.4.2.2. Sequenzanalyse

Aufgrund der Ergebnisse des Restriktiktionsenzymverdaus wurden die Klone 4, 8 und 13 von der Firma MWG sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte vom 5'Ende aus. Die für die jeweiligen Klone erhaltenen DNA-Sequenzen sind im Anhang aufgeführt.

3.4.2.2.1. Sequenzanalyse der Klone 4 und 8

Sowohl die DNA-Sequenz als auch die abgeleitete Aminosäuresequenz ergaben in der anschließenden Datenbankanalyse (BLAST-NCBI) eine 100 % ige Übereinstimmung der Klone 4 und 8 mit beiden Isoformen der murinen DNA (Cytosin-5) -Methyltransferase 3a (Dnmt3a): der Dnmt3a1 (NCBI Datenbankzugangsnummer: NM 007872) und der Dnmt3a2 (NCBI Datenbankzugangsnummer: NM 153743). Die Expression der Isoformen der Dnmt3a steht unter der Kontrolle zweier verschiedener Promotoren, wodurch die Isoform Dnmt3a2 bis auf eine um 219 Aminosäuren kürzere N-terminale Region identisch mit der Isoform Dnmt3a1 ist (Chen et al., 2002). Die Dnmt3a1 besteht aus 908 Aminosäuren, mit einer errechneten Masse von 101,7 kD und einem theoretischen isoelektrischen Punkt (pI) von 6,27. Die Dnmt3a2 hat 689 Aminosäuren, mit einem errechneten Masse von 77,8 kD und einem theoretischen isoelektrischen Punkt (pI) von 6,1. Abb. 41 zeigt einen Vergleich der Proteinsequenzen der Dnmt3a1 und Dnmt3a2 sowie die Übereinstimmung der abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Klone 4 und 8 mit den beiden Isoformen. Die aus der cDNA-Sequenz resultierende Aminosäuesequenz des Klon 4 stimmte mit den Aminosäuren 566-833 der Dnmt3a1 bzw. den Aminosäuren 347-614 der Dnmt3a2 überein, während die abgeleitete Proteinsequenz von Klon 8 die Aminosäuresequenzen 594-862 (Dnmt3a1) bzw. 375-643 (Dnmt3a2) abdeckte. Die übereinstimmenden Aminosäuresequenzen fielen somit hauptsächlich in den Bereich der C-terminalen DNA-Methyltransferase Domäne. Die Klone 4 und 8 enthalten wahrscheinlich die cDNA für den kompletten C-terminalen Bereich des offenen Leserahmens der Dnmt3a, die 5'Sequenzierung reichte jedoch nicht bis zum Stop-Kodon. Die Proteinsequenzen beider Isoformen der Dnmt3a wurden mit den Programmen PROSITE und NetPhos 2,0auf putative Phosphorylierungsstellen und deren Wahrscheinlichkeit hin überprüft. Es konnte cGK/cAK-spezifische eine für

Phosporylierungskonsensussequenz im identischen Teil beider Isoformen mit dem Konsensus **RKST** gefunden werden, die jedoch nicht innerhalb der Bindungssequenz der Klone lag. Die Wahrscheinlichkeit einer Phosphorylierung des Threonins an der Position 457 (Dnmt3a1) bzw. 238 (Dnmt3a2) wurde vom NetPhos 2,0 Programm mit 0,875 angegeben.

Dnmt3a1 Dnmt3a2 Klon 4 Klon 8	MPSSGPGDTSSSSLEREDDRKEGEEQEENRGKEERQEPSATARKVGRPGR	50 0 0
Dnmt3a1 Dnmt3a2 Klon 4 Klon 8	KRKHPPVESSDTPKDPAVTTKSQPMAQDSGPSDLLPNGDLEKRSEPQPEE	100 0 0
Dnmt3a1 Dnmt3a2 Klon 4 Klon 8	GSPAAGQKGGAPAEGEGTETPPEASRAVENGCCVTKEGRGASAGEGKEQK	150 0 0
Dnmt3a1 Dnmt3a2 Klon 4 Klon 8	QTNIESMKMEGSRGRLRGGLGWESSLRQRPMPRLTFQAGDPYYISKRKRD	200 0 0
Dnmt3a1 Dnmt3a2 Klon 4 Klon 8	EWLARWKREAEKKAKVIAVMNAVEENQASGESQKVEEASPPAVQQPTDPA MNAVEENQASGESQKVEEASPPAVQQPTDPA 	250 31 0
Dnmt3a1 Dnmt3a2 Klon 4 Klon 8	SPTVATTPEPVGGDAGDKNATKAADDEPEYEDGRGFGIGELVWGKLRGFS SPTVATTPEPVGGDAGDKNATKAADDEPEYEDGRGFGIGELVWGKLRGFS	300 81 0 0
Dnmt3a1 Dnmt3a2 Klon 4 Klon 8	<pre>WWP-Domane< WWPGRIVSWWMTGRSRAAEGTRWVMWFGDGKFSVVCVEKLMPLSSFCSAF WWPGRIVSWWMTGRSRAAEGTRWVMWFGDGKFSVVCVEKLMPLSSFCSAF</pre>	350 131 0 0
Dnmt3a1 Dnmt3a2 Klon 4 Klon 8	HQATYNKQPMYRKAIYEVLQVASSRAGKLFPACHDSDESDSGKAVEVQNK HQATYNKQPMYRKAIYEVLQVASSRAGKLFPACHDSDESDSGKAVEVQNK 	400 181 0 0
Dnmt3a1 Dnmt3a2 Klon 4 Klon 8	QMIEWALGGFQPSGPKGLEPPEEEKNPYKEVYTDMWVEPEAAAYAPPPPA QMIEWALGGFQPSGPKGLEPPEEEKNPYKEVYTDMWVEPEAAAYAPPPPA	450 231 0 0
Dnmt3a1 Dnmt3a2 Klon 4 Klon 8	KKPRKSTTEKPKVKEIIDERTRERLVYEVRQKCRNIEDICISCGSLNVTL KKPRKSTTEKPKVKEIIDERTRERLVYEVRQKCRNIEDICISCGSLNVTL	500 281 0 0
Dnmt3a1 Dnmt3a2 Klon 4 Klon 8	EHPLFIGGMCQNCKNCFLECAYQYDDDGYQSYCTICCGGREVLMCGNNNC EHPLFIGGMCQNCKNCFLECAYQYDDDGYQSYCTICCGGREVLMCGNNNC EHPLFIGGMCQNCKNCFLECAYQYDDDGYQSYCTICCGGREVLMCGNNNC	550 331 0 0

	<	
Dnmt3a1	CRCFCVECVDLLVGPGAAQAAIKEDPWNCYMCGHKGTYGLLRRREDWPSR	600
Dnmt3a2	CRCFCVECVDLLVGPGAAQAAIKEDPWNCYMCGHKGTYGLLRRREDWPSR	381
Klon 4	GAAQAAIKEDPWNCYMCGHKGTYGLLRRREDWPSR	35
Klon 8	REDWPSR	7
	>	
Dnmt3a1	LQMFFANNHDQEFDPPKVYPPVPAEKRKPIRVLSLFDGIATGLLVLKDLG	650
Dnmt3a2	LQMFFANNHDQEFDPPKVYPPVPAEKRKPIRVLSLFDGIATGLLVLKDLG	431
Klon 4	LQMFFANNHDQEFDPPKVYPPVPAEKRKPIRVLSLFDGIATGLLVLKDLG	85
Klon 8	LQMFFANNHDQEFDPPKVYPPVPAEKRKPIRVLSLFDGIATGLLVLKDLG	57
	DNA-Methyltransferase Domäne	
Dnmt3a1	IQVDRYIASEVCEDSITVGMVRHQGKIMYVGDVRSVTQKHIQEWGPFDLV	700
Dnmt3a2	IQVDRYIASEVCEDSITVGMVRHQGKIMYVGDVRSVTQKHIQEWGPFDLV	481
Klon 4	IQVDRYIASEVCEDSITVGMVRHQGKIMYVGDVRSVTQKHIQEWGPFDLV	135
Klon 8	IQVDRYIASEVCEDSITVGMVRHQGKIMYVGDVRSVTQKHIQEWGPFDLV	107
Dnmt3a1	IGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYRLLHDARPKEGDDRPFFWL	750
Dnmt3a2	IGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYRLLHDARPKEGDDRPFFWL	531
Klon 4	IGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYRLLHDARPKEGDDRPFFWL	185
Klon 8	IGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYRLLHDARPKEGDDRPFFWL	157
Dnmt3a1	FENVVAMGVSDKRDISRFLESNPVMIDAKEVSAAHRARYFWGNLPGMNRP	800
Dnmt3a2	FENVVAMGVSDKRDISRFLESNPVMIDAKEVSAAHRARYFWGNLPGMNRP	581
Klon 4	FENVVAMGVSDKRDISRFLESNPVMIDAKEVSAAHRARYFWGNLPGMNRP	235
Klon 8	FENVVAMGVSDKRDISRFLESNPVMIDAKEVSAAHRARYFWGNLPGMNRP	207
		0.5.0
Dnmt3al	LASTVNDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRSNSIKQGKDQHFPVFMNE	850
Dnmt3a2		631
Klon 4	LASTVNDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRS	268
Klon 8	LASTVNDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRSNSIKQGKDQHFPVFMNE	257
Dnm + 2 - 1		000
Drimt 2a2		900 601
Vinnesaz Klop A	VEDITMCIEMER ALGERANIIDA 20002VTVKÖKTTGV202ALAUTUVA	268
Klon 8		200
KIOH 0		209
Dnmt 3a1	LKEYFACV	902
Dnmt 3a2	LKEYFACV	689
Klon 4		268
Klop 8		269
		200

Abb. 41: Vergleich der Proteinsequenzen von Maus Dnmt3a1, Dnmt3a2, Klon 4 und 8

Der Vergleich wurde mit dem Programm "Lasergene MegAlign" (DNAStar) nach ClustalW (Slow/Accurate, Gonnet) durchgeführt. Der Bereich der übereinstimmenden Aminosäuresequenz der Klone mit der Dnmt3a ist grau unterlegt (Zahlen rechts geben die Aminosäureposition an) und liegt im Bereich der DNA-Methyltransferase-Domäne beobachtet. Die putative cGK/cAK-spezifische Phosporylierungskonsensussequenz ist schwarz unterlegt.

3.4.2.2.2. Sequenzanalyse von Klon 13

Die von der DNA-Sequenz des Klons 13 abgeleitete Aminosäuresequenz ergab in der Datenbankanalyse (BLAST-NCBI) eine 100 % ige Übereinstimmung mit der murinen zytosolischen Hydroxysteroidsulfotransferase 2b1b (Sult2b1b, NCBI Datenbankzugangsnummer: NM_017465) und eine 97 % ige Übereinstimmung mit der Sult2b1a (NCBI Datenbankzugangsnummer: AAM46788). Beide Isoformen unterscheiden sich nur in ihrem N-terminalen Bereich, wobei die abgeleitete Proteinsequenz des Klons 13 nur mit dem N-terminalen Bereich der Sult2b1b übereinstimmte. Die Sult2b1b besitzt 338 Aminosäuren, mit einem errechneten Masse von 38,4 kD und einem theoretischen isoelektrischen Punkt (pI) von 5,03. Die von Klon 13 abgeleitete Proteinsequenz stimmte mit den Aminosäuren 1-279 der Sult2b1b überein, wobei auch hier wahrscheinlich ist, dass der Klon 13 die cDNA für den kompletten C-terminalen Bereich des offenen Leserahmens der Sult2b1b enthält (Abb. 42).

Aufgrund der 97 % Übereinstimmung der abgeleiteten Aminosäuresequenz des Klons 13 mit der Sult2b1a ist eine mögliche Interaktion der cGKIα mit dieser Isoform zum jetzigen Zeitpunkt nicht auszuschließen. Die Sult2b1a besteht aus 372 Aminosäuren, mit einem errechneten Masse von 42,3 kD und einem theoretischen isoelektrischen Punkt (pI) von 5,25. Der N-terminalen Teil der Sult2b1a enthält eine cAK/cGK-spezifische Phosphorylierungskonsensussequenz (Abb. 42).

Sult2b1a	MTSRDCCGGVEVDLLLRWTHGAQ RK D T PHWRVNEGPCDSCPPPWSSLHVP	50
Sult2b1b	RALWSSSEKN	16
Klon 13	RALWSSSEKN	16
Sult2b1a	FPSFSWNFGGEYFRYKGIPFPVGMYSPESLSLAENTSNVRDDDIFIVTYP	100
Sult2b1b	VSEMSWNFGGEYFRYKGIPFPVGMYSPESLSLAENTSNVRDDDIFIVTYP	66
Klon 13	VSEMSWNFGGEYFRYKGIPFPVGMYSPESLSLAENTSNVRDDDIFIVTYP	66
Sult2b1a	KSGTNWMIEIVCLILKDGDPSWIRSEPIWQRAPWCETIISAFNVLDRPSP	150
Sult2b1b	KSGTNWMIEIVCLILKDGDPSWIRSEPIWQRAPWCETIISAFNVLDRPSP	116
Klon 13	KSGTNWMIEIVCLILKDGDPSWIRSEPIWQRAPWCETIISAFNVLDRPSP	116
Sult2b1a	RIMSSHLPIELFTKAFFSSKAKVIYVGRNPRDVVVSLYYYSKIAGQLKDP	200
Sult2b1b	RIMSSHLPIELFTKAFFSSKAKVIYVGRNPRDVVVSLYYYSKIAGQLKDP	166
Klon 13	RIMSSHLPIELFTKAFFSSKAKVIYVGRNPRDVVVSLYYYSKIAGQLKDP	166
Sult2b1a	GTPDQFLQNFLKGEVQFGSWFDHIKGWIRMQNQENFLFITYEELQQDLRG	250
Sult2b1b	GTPDQFLQNFLKGEVQFGSWFDHIKGWIRMQNQENFLFITYEELQQDLRG	216
Klon 13	GTPDQFLQNFLKGEVQFGSWFDHIKGWIRMQNQENFLFITYEELQQDLRG	216
Sult2b1a	SVQRICEFLGRPLGEEALSSVVAHSAFAAMKANTMSNYSLLPASLLDHRQ	300
Sult2b1b	SVQRICEFLGRPLGEEALSSVVAHSAFAAMKANTMSNYSLLPASLLDHRQ	266
Klon 13	SVQRICEFLGRPLGEEALSSVVAHSAFAAMKANTMSNYSLLPASLLDHRQ	266
Sult2b1a	GEFLRKGISGDWKNHFTVAQSEAFDSVYREQMHGVQRFPWDTSEEDSSPD	350
Sult2b1b	GEFLRKGISGDWKNHFTVAQSEAFDSVYREQMHGVQRFPWDTSEEDSSPD	316
Klon 13	GEFLRKGISGDWK	279
Sult2b1a Sult2b1b Klon 13	GQPDPEPSPSPASDDPNPGSSQ GQPDPEPSPSPASDDPNPGSSQ	372 338 279

Abb. 42: Vergleich der Proteinsequenzen von Maus Sult2b1a, Sult2b1b und Klon13

Der Vergleich wurde mit dem Programm "Lasergene MegAlign" (DNAStar) nach ClustalW (Slow/Accurate, Gonnet) durchgeführt Der Bereich der übereinstimmenden Aminosäuresequenz des Klons 13 mit der Sult2b1a und Sult2b1b ist grau unterlegt (Zahlen rechts geben die Aminosäureposition an). Die putative cGK/cAK-spezifische Phosporylierungskonsensussequenz der Sult2b1a ist schwarz unterlegt.

Zusammenfassend konnten mit der DNA-Methyltransferase 3a und der Hydroxysteroidsulfotransferase 2b1b zwei putative Interaktionspartner der cGKIa im Zweihybriden Hefesystem gefunden werden. Aus Zeitgründen, konnte die Interaktion der cGKIa mit der Sult2b1b bislang nicht in einem anderen zellulären System überprüft werden. Der folgende Teil der Arbeit konzentriert sich auf die Verifizierung der Interaktion der cGKIa mit der Dnmt3a.

In Säugetieren konnten bislang drei verschiedene Familien von DNA-Methyltransferasen (Dnmt) identifiziert werden, die an der Etablierung und Aufrechterhaltung des genomischen Methylierungsmusters während der Entwicklung beteiligt sind: die Dnmt1, Dnmt2 und Dnmt3. Die Methylierung genomischer DNA ist eine posttranskriptionelle Modifikation, die sowohl bei der Genexpression, beim genomischen Imprinting, der X-Chromosom-Inaktivierung und bei der zellulären Differenzierung und Entwicklung eine entscheidende Rolle spielt (Bestor, 2000; Hermann et al., 2004). Die dritte Gruppe der DNA-Methyltransferasen umfasst mit der Dnmt3a und Dnmt3b die *de novo* Methyltransferasen, welche sowohl hemimethylierte als auch unmethylierte DNA methylieren können und die essentiell für die embryonale und postnatale Entwicklung sind (Okano et al., 1998; Okano et al., 1999).

3.4.2.3. Verifizierung der Interaktion von cGKIα und Dnmt3a1 mittels Immunpräzipitation

Um die im Zweihybriden Hefesystem gefundene Interaktion von Dnmt3a1 und cGKIα zu bestätigen, wurden COS 7-Zellen mit cGKIα und FLAG-Dnmt3a1 kotransfiziert. Als Negativkontrollen wurden COS 7-Zellen allein mit cGKIα transfiziert bzw. mit cGKIα und FLAG-Syntenin 1 kotransfiziert. Die durch Immunpräzipitation (IP) mit dem Agarose gekoppelten, monoklonalen Antikörper gegen das Flag-Epitop (Maus anti M2 Affinity Gel Freezer-Safe, Fa. Sigma) erhaltenen Proteinkomplexe wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Anschließend wurde die Präzipitation von Flag-Dnmt3a1 mit dem monoklonalen Antikörper M5 (anti–Flag) analysiert sowie die Kopräzipitation von cGKIα mit einem polyklonalen Antikörper gegen die cGKIα Isoform. Im Eluat der mit cGKIα und FLAG-Dnmt3a1 kotransfizierten COS 7-Zellen konnte die cGKIα mit anti-FLAG Antikörpern kopräzipitiert werden, nicht jedoch in den beiden Kontrollen. Damit konnte die im Zweihybriden Hefesystem gefundene Interaktion zwischen cGKIα und Dnmt3a1 in einem anderen zellulären System bestätigt werden. Zur näheren

Charakterisierung der Interaktion von cGKIα und Dnmt3a1 wurde vor der IP vom zentrifugierten Zelllysat der mit FLAG-Dnmt3a1 und cGKIα kotransfizierten COS-7 Zellen ein Aliquot entnommen sowie nach der IP und anschließender Zentrifugation ein Aliquot des Überstands. Beide Aliquots wurden dann mit einem Aliquot des IP-Eluat im SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf die Expressionsstärke von FLAG-Dnmt3a1 und cGKIα hin verglichen. Während der anti-FLAG Antikörper erwartungsgemäß in der Lage war das gesamte FLAG-Dnmt3a1 zu präzipitieren, konnte trotz erfolgreicher Kopräzipitation der cGKIα ein Großteil der Kinase nicht präzipitiert werden (Abb. 43). Dies ließ auf eine transiente Interaktion zwischen cGKIα und Dnmt3a1 schließen.

Die mögliche Interaktion von cGKIa mit der Isoform Dnmt3a2 konnte im Rahmen dieser Arbeit mangels Konstrukt noch nicht in COS 7-Zellen verifiziert werden.



Abb. 43: Koimmunpräzipitation von Dnmt3a1 und cGKIa

A: COS-7 Zellen wurden entweder mit FLAG-Dnmt3al und cGKIa kotransfiziert oder zur Kontrolle mit FLAG-Syntenin 1 und cGKIa oder nur mit cGKIa. Die Immunpräzipitation (IP) erfolgte mit dem Agarosegekoppelten, monoklonalen anti-FLAG Antikörper M2 (Fa. Sigma). Die Eluate der IP wurden anschließend mit der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot (WB) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Präzipitation der FLAG-Fusionsproteine Dnmt3a1 und Syntenin 1 wurde mit dem monoklonalen anti-FLAG Antikörper M5 (Fa. Sigma) überprüft. Die Kopräzipitation von cGKIa wurde mit dem isoformspezifischen polyklonalen Antikörper (Rb α cGKI α) analysiert und konnte in den IP-Eluaten von cGKI α und FLAG-Dnmt3al kotransfizierten COS-7 Zellen präzipitiert werden. B: Zur näheren Untersuchung der Interaktion von cGKIa und Dnmt3a1 wurde vor der IP vom Überstand des abzentrifugierten Zelllysats (L: Lysat) der mit FLAG-Dnmt3al und cGKIa kotransfizierten COS-7 Zellen ein Aliguot entnommen, sowie nach der IP ein Aliguot des Überstands (Ü: Überstand). Beide Aliquots wurden zusammen mit einem Aliquot des IP-Eluats (E: Eluat) im Volumenverhältnis L : \ddot{U} : E = 1 % : 1 % : 0,3 % des initial für die IP eingesetzten Zellextraktes auf das Gel geladen. Die Entwicklung der Blots erfolgte wie unter A) beschrieben. Während die Immunpräzipitation mit dem anti-FLAG Antikörper erwartungsgemäß in einer Aufkonzentrierung der FLAG-Dnmt3a1 resultierte, konnte nur ein kleiner Teil der eingesetzten cGKIa kopräzipitiert (E) werden, während ein großer Teil der Kinase nicht präzipitiert wurde (Ü). **I.AK-Kette:** leichte Kette des Antikörpers; s. AK-Kette: schwere Kette des Antikörpers

3.4.2.4. Untersuchung zur Expression der Dnmt3a1 und Dnmt3a2 im Nervensystem

Um zu klären, ob Dnmt3a1 und Dnmt3a2 auch als mögliche Interaktionspartner der cGKIa im Nervensystem in Frage kommen, wurde die Expression beider DNA-Methyltransferasen im Nervensystem untersucht.

Eine Expression der Dnmt3a im Nervensystem wurde erst kürzlich von Feng und Kollegen gezeigt (Feng et al., 2005). Demnach ist die Expression der Dnmt3a2 auf Embryonalstadien und frühe Postnatalstadien beschränkt, während die Dnmt3a1 vom Embryonalstadium an bis ins adulte Alter detektiert werden kann, mit einer deutlichen Expressionszunahme in den ersten drei Wochen der Postnatalentwicklung. Dabei konnte die Dnmt3a hauptsächlich in postmitotischen Neuronen im Cortex, Cerebellum, Striatum, Bulbus olfactorius und Hippocampus detektiert werden.

Die cGKIα-positiven Gewebe Cerebellum und Cortex (siehe Kap. 3.1.1.6. und 3.1.1.7.) wurden auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit auf eine Expression der Dnmt3a hin untersucht. Die Lysate der Gewebe wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Detektion der Dnmt3a erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper (Fa. Imgenex) der gegen ein im C-terminus gelegenes Epitop (Aminosäuren 705-908) gerichtet ist, und deshalb in der Lage ist die Isoformen Dnmt3a1 und Dnmt3a2 zu erkennen. Untersuchungen von Chen und Kollegen zeigten, dass der Antikörper auch in der Lage ist die Dnmt3b1 und Dnmt3b2 zu erkennen, deren C-terminus eine große Ähnlichkeit zu dem von Dnmt3a aufweist (Chen et al., 2002). Sowohl im Cerebellum des Alters P16 als auch im Cortex des Alters P2 und P16, konnte nur die Dnmt3a1 detektiert werden, nicht die Dnmt3a2 (Abb. 44). Im Cortex konnte im Alter P16, verglichen mit P2, eine Zunahme der Expression beobachtet werden.



Abb. 44: Expression der Dnmt3a1 im Cerebellum und im Cortex

Die Gewebelysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Detektion der Banden erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen Dnmt3a und einem sekundären, HRP-gekoppelten Antikörper. In beiden Geweben der untersuchten Entwicklungsstadien (P2 bzw. P16) konnte nur eine Expression der Isoform der Dnmt3a1 detektiert werden. Parallel wurde die geladene Proteinmenge mit einem Antikörper gegen γ -Tubulin überprüft. Im Alter P16 konnte im Cortex eine stärkere Expression der Dnmt3a1 als im Alter P2 beobachtet werden.

Weiterhin interessierte, ob und welche Isoform der Dnmt3a in den cGKIa-positiven Spinalganglien exprimiert wird. Hierzu wurden Lysate von Spinalganglien der Embryonalstadien E12, E13 und E14 untersucht. In allen drei Altersstadien konnte eine Expression der Dnmt3a1 und Dnmt3a2 in den Spinalganglien gefunden werden, wobei die Dnmt3a2 stärker exprimiert wurde (Abb. 45 A). In den verschiedenen Altersstadien war die Expressionsstärke der Dnmt3a im Vergleich zur γ-Tubulin Expression annähernd gleich. Es konnte kein Unterschied in der Expression beider Isoformen zwischen cGKI-defizienten und Wildtyp-Spinalganglien des Embryonalstadiums E14 beobachtet werden (Abb. 45 B), auch nicht nach Inkubation der Spinalganglien mit 1 mM 8-pCPT-cGMP.



Abb. 45: Expression der Dnmt3a in Spinalganglien

A: Die Lysate von Spinalganglien der Entwicklungsstadien E12, E13 und E14 wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Detektion der Banden erfolgte mit einem monoklonalen Antikörper gegen Dnmt3a und einem sekundären, HRP-gekoppelten Antikörper. In allen drei untersuchten Entwicklungsstadien konnte eine Expression beider Isoformen der Dnmt3a in den Spinalganglien beobachtet werden, wobei die Dnmt3a2-Expression überwog. Parallel wurde die geladene Proteinmenge mit einem Antikörper gegen γ -Tubulin überprüft. **B:** Die Expression der Dnmt3a unterschied sich nicht in Lysaten von E14 Wildtyp (+/+) bzw. cGKI-defizienten (-/-) Spinalganglien. Die geladene Proteinmenge wurde wie in A mit γ -Tubulin überprüft.

3.4.2.5. Untersuchungen zur subzellulären Verteilung der Dnmt3a und cGKIa

Die subzelluläre Verteilung der Dnmt3a und cGKI α wurde zunächst in HEK293-Zellen untersucht, welche beide Proteine endogen exprimieren ((Kim et al., 2002) und eigene Untersuchung). Dafür wurden zunächst von den Zellen eine Zytosol-Fraktion, eine Membran-Fraktion und eine Kern-Fraktion präpariert, und die Lysate, nach Auftrennung im SDS-Gel, im Western Blot mit dem monoklonalen Antikörper gegen Dnmt3a und dem polyklonalen cGKI α -Antikörper analysiert. Als Kontrolle für die Anreicherung wurde γ -Tubulin verwendet, welches nur in der Zytosol- und Membranfraktion zu detektieren sein sollte. Eine schwache Expression konnte allerdings auch in der Kern-Fraktion detektiert werden. Die cGKI α konnte vorwiegend in der Zytosol-Fraktion. Eine schwächere Expression konnte auch in der Kern-Fraktion detektiert werden, allerdings kann hier nicht ausgeschlossen werden, dass in der angereicherten Kern-Fraktion noch zytosolische Bestandteile enthalten sind, die zu der Expression führen (Abb. 46 A). Die Dnmt3a1 konnte nur in der Kern-Fraktion detektiert werden. Die Isoform Dnmt3a2 wird entweder nicht oder nur sehr schwach in HEK293-Zellen exprimiert, da sie mit den geladenen Proteinmengen in keiner der Fraktionen detektiert werden konnte. Allerdings konnte in der Zytosol-Fraktion mit dem Antikörper gegen Dnmt3a eine Bande auf Höhe der 116 kD Markerbande (vermutlich eine Isoform der Dnmt3b (Dnmt3b1 bzw. Dnmt3b2) detektiert werden (Abb. 46 B).



Abb. 46: Subzelluläre Verteilung der cGKIa und Dnmt3a in HEK293-Zellen

Die Lysate der angereicherten Zytosol-, Membran-und Kern-Fraktionen von HEK293-Zellen wurden nach Auftrennung im SDS-Gel, im Western Blot mit einem Antikörper gegen cGKI α (A) bzw. einem Antikörper gegen Dnmt3a (B) und einem sekundären, HRP-gekoppelten Antikörper analysiert. Als Kontrolle für die Anreicherung der Fraktionen wurden die Blots parallel mit γ -Tubulin gefärbt. Nähere Erläuterungen siehe Text. C: HEK293-Zellen wurden mit einem Antikörper gegen cGKI α und einem Cy3-gekoppelten, sekundären Antikörper gefärbt. Eine starke Expression der cGKI α wurde im Zytoplasma detektiert und in einer Vielzahl der Zellen auch in den Nukleoli des Zellkerns. Zur besseren Orientierung ist das Phasenkontrastbild der gefärbten Zellen gezeigt. Maßbalken: 10 µm

Parallel wurde die Expression beider Proteine immunzytologisch in den HEK293-Zellen untersucht. cGKIα wurde auch hier hauptsächlich im Zytoplasma detektiert, teilweise jedoch auch in den Nukleoli des Zellkerns (Abb.46 C). Obwohl der monoklonale Antikörper gegen Dnmt3a gut im Western Blot funktionierte, erwies er sich für immunzytologische Untersuchungen als nicht geeignet, weshalb auch von geplanten immunhistochemischen Untersuchungen z.B. der Spinalganglien und des Rückenmarks abgesehen wurde. Daher wurden für weitere immunzytologische Untersuchungen zur subzellulären Verteilung von Dnmt3a1 und cGKIα COS 7-Zellen mit pcDNA3.1[cGKIα] und FLAG-Dnmt3a1 kotransfiziert und auf Objekträgern kultiviert. Um zu untersuchen, ob eine Stimulation der

Kinase eine Umverteilung beider Proteine in der Zelle bewirkt wurde ein Teil der Zellen für 45 min mit 1 mM 8-pCPT-cGMP stimuliert, der andere Teil unstimuliert belassen, anschließend kurz gewaschen und fixiert. Nach der Permeabilisierung der Zellen mit 0,1 % TritonX-100 wurde sowohl die Expression von cGKIa mit dem polyklonalen, isoformspezifischen Antikörper und einem Cv3-gekoppelten, sekundären Antikörper untersucht als auch die Verteilung von Dnmt3a1 mit einem monoklonalen Antikörper gegen FLAG (M a M2, Fa. Sigma) und einem sekundären Alexa 488-Antikörper. Dnmt3a1 konnte sowohl in stimulierten als auch unstimulierten Zellen immer im Kern lokalisiert werden, unter Aussparung der Nukleoli. Die c $GKI\alpha$ hingegen zeigte kein einheitliches Verteilungsmuster. Bezüglich des Zellkerns variierte die Expression der Kinase von einer deutlichen Färbung, über eine moderate Färbung bis zu einer sehr schwachen bzw. keiner Färbung. In allen Fällen waren die Nukleoli von einer Färbung ausgespart. Im Zytoplasma wurde die cGKIα in allen Zellen gefunden, meistens mit einer asymmetrisch verstärkten Expression im perinukleären Bereich. Zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen konnte kein Unterschied im Verteilungsmuster der cGKIa beobachtet werden. In vielen kotransfizierten COS 7-Zellen konnte also eine deutliche oder partielle Kolokalisation von cGKIa mit Dnmt3a1 im Zellkern beobachtet werden (Abb. 47).



Abb. 47: Kolokalisation von cGKIa und Dnmt3a1 in COS 7-Zellen

COS 7-Zellen wurden mit cGKIα und FLAG-Dnmt3a1 kotransfiziert und einer Zweifach-Immunfärbung unterzogen. cGKIα wurde mit einem isoformspezifischen, polyklonalen Antikörper und einem Cy3-gekoppelten, sekundären Antikörper (rote Färbung; A1, B1, C1, D1) detektiert, Dnmt3a1 mit einem monoklonalen anti-FLAG Antikörper und einem sekundären Alexa 488-Antikörper (grüne Färbung, A2, B2, C2, D2). Die Färbungen wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops dokumentiert. Die Überlagerung beider Färbungen (A3, B3, C3, D3) zeigt eine deutliche (A3, B3, C3) partielle (B3) oder keine (D3) Kolokalisation der cGKIα und der Dnmt3a1 im Zellkern. Maßbalken: 20μm

3.4.2.6. Untersuchungen zur Interaktion der cGKIα mit anderen Mitgliedern der DNA-Methyltransferasen

Neben der Dnmt3a als Interaktionspartner der cGKIα wurden auch zwei andere interessante DNA-Methyltransferasen als Kandidaten für eine Interaktion mit der Kinase untersucht. Dies ist zum einen die Dnmt3b1, welche wie die Dnmt3a zu den so genannten *de novo* Methyltransferasen zählt. Beide zeigen besonders im Bereich der Methyltransferase-Domäne, deren Sequenz bei der Dnmt3a den cDNA-Sequenzen der Hefe-Klone 4 und 8 entsprach, eine hohe Sequenzähnlichkeit (Abb. 48). Zudem konnten vier putative cGK/cAK-spezifische Phoshorylierungskonsensussequenzen für die Dnmt3b1 gefunden werden (Abb. 48, Tab. 5).

Dnmt3b1	MKGDSRHLNEEEGASGYEECIIVNGNFSDQSSDTK	35
Dnmt3a1	MPSSGPGDTSSSSLEREDDRKEGEEQEENRGKEERQEPSATARKVGRPGR	50
Dnmt3b1	DAPSPPVLEAICT-EPVCTPETRG <mark>RR</mark> S <mark>S</mark> SRLSKRE	69
Dnmt3a1	KRKHPPVESSDTPKDPAVTTKSQPMAQDSGPSDLLPNGDLEKRSEPQPEE	100
Dnmt3b1	VSSLLNYTQDMTGDGDRDDEVDDGNGSDILMPKLTR	105
Dnmt3a1	GSPAAGQKGGAPAEGEGTETPPEASRAVENGCCVTKEGRGASAGEGKEQK	150
Dnmt3b1	ETKDTRTRSESPAVRTRHSNGTSSLERQRASPRITRGRQGRHHVQ	150
Dnmt3a1	QTNIESMKMEGSRGRLRGGLGWESSLRQRPMPRLTFQAGDPYYISKRKRD	200
Dnmt3b1	EYPVEFPATRSRRRRASSSASTPWSSPASVDFMEEVTPKSVSTP	194
Dnmt3a1	EWLARWKREAEKKAKVIAVMNAVEENQASGESQKVEEASPPAVQQPTDPA	250
Dnmt3b1	SVDLSQDGDQEGMDTTQVDAESRDGDSTEYQDDKEFGIGDLVWGKIKGFS	244
Dnmt3a1	SPTVATTPEPVGGDAGDKNATKAADDEPEYEDGRGFGIGELVWGKLRGFS	300
Dnmt3b1 Dnmt3a1	WWP-Domane WWPAMVVSWKATSKRQAMPGMRWVQWFGDGKFSEISADKLVALGLFSQHF WWPGRIVSWWMTGRSRAAEGTRWVMWFGDGKFSVVCVEKLMPLSSFCSAF	294 350
Dnmt3b1	NLATFNKLVSYRKAMYHTLEKARVRAGKTFSSSPGESLEDQLK	337
Dnmt3a1	HQATYNKQPMYRKAIYEVLQVASSRAGKLFPACHDSDESDSGKAVEVQNK	400
Dnmt3b1	PMLEWAHGGFKPTGIEGLKPNKKQPVVNKSKVRRSDSRNLEPRRRENKS <mark>R</mark>	387
Dnmt3a1	QMIEWALGGFQPSGPKGLEPPEEEKNP-YKEVYTD	434
Dnmt3b1	RRTTNDSAASESPPPKRLKTNSYGGKDRGEDEESRERMASEVTNNKG	434
Dnmt3a1	MWVEPEAAAYAPPPPAKKP <mark>RK</mark> STTEKPKVKEIIDERTRERLVYEVRQKCR	484
Dnmt3b1 Dnmt3a1	> Cystein-reiche Domane NLEDRCLSCGKKNPVSFHPLFEGGLCQSCRDRFLELFYMYDEDGYQSYCT NIEDICISCGSLNVTLEHPLFIGGMCQNCKNCFLECAYQYDDDGYQSYCT	484 534
Dnmt3b1	VCCEGRELLLCSNTSCCRCFCVECLEVLVGAGTAEDAKLQEPWSCYMCLP	534
Dnmt3a1	ICCGGREVLMCGNNNCCRCFCVECVDLLVGPGAAQAAIKEDPWNCYMCGH	584
Dnmt3b1	QRCHGVLRRRKDWNMRLQDFFTTDPDLEEFEPPKLYPAIPAAKRRPIRVL	584
Dnmt3a1	KGTYGLLRRREDWPSRLQMFFANNHD-QEFDPPKVYPPVPAEKRKPIRVL	633
Dnmt3b1 Dnmt3a1	DNA-Methyltransferase Domäne SLFDGIATGYLVLKELGIKVEKYIASEVCAESIAVGTVKHEGQIKYVNDV SLFDGIATGLLVLKDLGIQVDRYIASEVCEDSITVGMVRHQGKIMYVGDV	634 683
Dnmt3b1	<mark>RK</mark> I <mark>T</mark> KKNIEEWGPFDLVIGGSPCNDLSNVNPARKGLYEGTGRLFFEFYHL	684
Dnmt3a1	RSVTQKHIQEWGPFDLVIGGSPCNDLSIVNPARKGLYEGTGRLFFEFYRL	733

Dnmt3b1	LNYTRPKEGDNRPFFWMFENVVAMKVNDKKDISRFLACNPVMIDAIKVSA	734
Dnmt3a1	LHDARPKEGDDRPFFWLFENVVAMGVSDKRDISRFLESNPVMIDAKEVSA	783
Dnmt3b1	AHRARYFWGNLPGMNRPVMASKNDKLELQDCLEFSRTAKLKKVQTITTKS	784
Dnmt3a1	AHRARYFWGNLPGMNRPLASTVNDKLELQECLEHGRIAKFSKVRTITTRS	833
Dnmt3b1	NSIRQGKNQLFPVVMNGKDDVLWCTELERIFGFPAHYTDVSNMGRGARQK	834
Dnmt3a1	NSIKQGKDQHFPVFMNEKEDILWCTEMERVFGFPVHYTDVSNMSRLARQR	883
	<	
Dnmt3b1	LLGRSWSVPVIRHLFAPLKDYFACE	859
Dnmt3a1	LLGRSWSVPVIRHLFAPLKEYFACV	908

Abb. 48: Vergleich der Proteinsequenzen von Maus Dnmt3b1 und Dnmt3a1

Der Vergleich wurde mit dem Programm "Lasergene MegAlign" (DNAStar) nach ClustalW (Slow/Accurate, Gonnet) durchgeführt. Identische Aminosäuresequenzen beider Proteine sind grau unterlegt (Zahlen rechts geben die Aminosäureposition an). Dnmt3b1 enthält vier, Dnmt3a1 eine putative cGK/cAK-spezifische Phosporylierungskonsensussequenz (schwarz unterlegt).

Aminosäureposition des Serins	Phosporylierungs-	Phosphorylierungs-				
bzw. Threonins	konsensussequenz	wahrscheinlichkeit (NetPhos)				
Dnmt3a1						
457	P <mark>RK</mark> S T TEKP	0.875				
Dnmt3a2						
238	P <mark>RK</mark> S T TEKP	0.875				
Dnmt3b1						
62	G <mark>RR</mark> S <mark>S</mark> SRLS	0.997				
390	S <mark>RR</mark> R T TNDS	0.962				
391	R <mark>RR</mark> T T NDSA	0.988				
638	V <mark>RK</mark> I T KKNI	0.670				
Dnmt1						
160	T <mark>RR</mark> T T RQTT	0.875				
245	L <mark>RR</mark> H T RELS	0.543				
254	L <mark>RR</mark> K <mark>S</mark> KEDP	0.999				
324	K <mark>rr</mark> K t trkk	0.995				
325	R <mark>RK</mark> T T RKKL	0.987				
604	Q <mark>RR</mark> A T RRVM	0.979				
981	Y <mark>RK</mark> Y <mark>S</mark> DYIK	0.135				

Tab. 5: Vergleich der putativen cGK/cAK-spezifischen Phosphorylierungskonsensussequenzen von Maus Dnmt3a1, Dnmt3a2, Dnmt3b1 und Dnmt1

Die Proteinsequenzen wurden mit den Programmen PROSITE und NetPhos 2,0 auf putative cGK/cAKspezifische Phosporylierungskonsensussequenzen untersucht. Es konnten für die Dnmt3a1 und Dnmt3a2 je eine, für die Dnmt1b vier und für die Dnmt1 sieben solcher Phosporylierungskonsensussequenzen gefunden werden. Angegeben sind die Aminosäurepositionen der Serins (S) bzw. des Threonins (T), das Konsensus-Motiv sowie die allgemeine Phosphorylierungswahrscheinlichkeit dieser Aminosäure. Zum anderen wurde die DNA-Methyltransferase 1 (Dnmt1) hinsichtlich einer Interaktion mit der cGKIα untersucht. Die Dnmt1 gehört zum Typus der so genannten Erhaltungs-Methyltransferasen und weist kaum eine Sequenzähnlichkeit mit der Dnmt3a auf. 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). Auch die Sequenz der Dnmt1 wies wie die Dnmt3a und Dnmt3b1 putative cGK/cAK-spezifische Phosphorylierungskonsensussequenzen auf (Tab.5).

3.4.2.6.1. Dnmt1, nicht Dnmt3b1 kann cGKIa in COS 7-Zellen kopräzipitieren

Um zu untersuchen, ob Dnmt1 und Dnmt3b1 in der Lage sind mit cGKIa zu interagieren, wurden COS 7-Zellen mit cGKIa und FLAG-Dnmt1 bzw. FLAG-Dnmt1b1 kotransfiziert. Als Negativkontrollen wurden die COS 7-Zellen allein mit cGKIa transfiziert. Die Präzipitation von FLAG-Dnmt1 und FLAG-Dnmt3b1 wurde wieder mit dem monoklonalen Antikörper M5 (anti-Flag) analysiert sowie die Kopräzipitation von cGKIa mit dem polyklonalen Antikörper gegen die cGKIa-Isoform. Im Eluat der mit cGKIa und FLAG-Dnmt1 kotransfizierten COS 7-Zellen konnte die cGKIa mit anti-FLAG Antikörpern kopräzipitiert werden, nicht jedoch in dem Eluat der mit cGKIa und FLAG-Dnmt3b1 kotransfizierten COS 7-Zellen und der Kontrolle (Abb. 49 A, B). Um näher einzugrenzen welche Region der Dnmt1 mit der cGKIa interagiert, wurden die Zellen mit dem FLAGfusionierten N-Terminus bzw. dem FLAG-fusionierten C-Terminus der Dnmt1 transfiziert. Die Ergebnisse der Immunpräzipitation zeigten jedoch, dass sowohl der N-Terminus als auch der C-terminus in der Lage waren mit cGKIa zu interagieren (Abb. 49 C), wobei jedoch zu bemerken ist, dass sich der N-Terminus (Aminosäuren 1-1134) und der C-Terminus (Aminosäuren 1087-1620), beider Flag-Konstrukte in einer Region von 48 Aminosäuren überlappten und somit mit diesen Konstrukten nicht auszuschließen war, dass evtl. diese Region entscheidend für die Interaktion war. Die cGKIa konnte, wie bereits bei der Immunpräzipitation mit Dnmt3a1, verglichen mit der Expression im Lysat, nicht im Eluat ankonzentriert werden. Auch wurde sie im Überstand detektiert, was wiederum nicht auf eine permanente/dauerhafte Interaktion schließen ließ (Abb. 49 C).



Abb. 49: Untersuchungen zur Koimmunpräzipitation von Dnmt1 und cGKIa sowie Dnmt1b1 und cGKIa

A: COS 7-Zellen wurden entweder mit cGKI α und FLAG-Dnmt1, cGKI α und FLAG-Dnmt1b1 oder als Negativkontrolle nur mit cGKI α transfiziert. Die Immunpräzipitation (IP) erfolgte mit dem Agarose gekoppelten, monoklonalen anti-FLAG-Antikörper M2 (Fa. Sigma). Die Eluate der IP wurden anschließend mit der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot (WB) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Präzipitation der FLAG-Fusionsproteine wurde mit dem monoklonalen anti-FLAG-Antikörper M5 (Fa. Sigma) überprüft. Die Kopräzipitation von cGKI α wurde mit dem isoformspezifischen polyklonalen Antikörper (Rb α cGKI α) analysiert und konnte in den IP-Eluaten von cGKI α und FLAG-Dnmt1 kotransfizierten COS 7-Zellen präzipitiert werden, nicht jedoch in den Eluaten von cGKI α und FLAG-Dnmt3b1 kotransfizierten COS 7-Zellen sowie in der Kontrolle. B: Detailiertere Untersuchung der Immunpräzipitation von mit cGKI α und FLAG-Dnmt1b1 transfizierten COS 7-Zellen. Ein Aliquot des für die IP eingesetzten Zellysats (L: Lysat) sowie ein Aliquot des Überstands (Ü: Überstand) nach der IP wurden zusammen mit einem Aliquot des IP-Eluats (E: Eluat) im Volumenverhältnis L: Ü: E = 1 %: 1 %: 0,3 % des initial für die IP eingesetzten Zellextraktes auf das Gel geladen. Dnmt3b1 war nicht in der Lage cGKI α zu präzipitieren. C: COS 7-Zellen wurden entweder mit cGKI α und FLAG-NT-Dnmt1, cGKI α und FLAG-CT-Dnmt1 oder als Negativkontrolle nur mit cGKI α

transfiziert. Die Aliquots des Lysats, Überstands und Eluats wurden im Volumenverhältnis L: Ü: E = 2 %: 2 %: 0,8 % (WB: M α M5) bzw. L: Ü: E = 0,6 %: 0,6 %: 0,6 %: 0,6 % (WB: Rb α cGKI α) des initial für die IP eingesetzten Zellextraktes auf das Gel geladen. Die Immunpräzipitation mit dem anti-FLAG-Antikörper resultierte erwartungsgemäß in einer Aufkonzentrierung der FLAG-Fusionsproteine. Sowohl der FLAG-fusionierte N-Terminus der Dnmt1 als auch der C-Terminus waren in der Lage mit cGKI α zu interagieren, jedoch konnte nur ein kleiner Teil der eingesetzten cGKI α (L) kopräzipitiert (E) werden, während ein großer Teil der Kinase nicht präzipitiert wurde (Ü). **I. AK-Kette:** leichte Kette des Antikörpers; **s. AK-Kette:** schwere Kette des Antikörpers

3.4.2.6.2. Untersuchungen zur subzellulären Verteilung der Dnmt1 und cGKIa

Für immunzytologische Untersuchungen zur subzellulären Verteilung von Dnmt1 und cGKIa wurden COS 7-Zellen mit pcDNA3.1[cGKIa] und GFP-Dnmt1 kotransfiziert und auf Objekträgern in DMEM mit 10 % FCS kultiviert. Die Zellen wurden dann über Nacht in FCSfreiem DMEM kultiviert und für 45 min mit 1 mM 8-pCPT-cGMP stimuliert bzw. unstimuliert belassen, anschließend kurz gewaschen und fixiert. Nach der Permeabilisierung der Zellen mit 0,1 % TritonX-100 wurde die Expression von cGKIa mit dem polyklonalen, isoformspezifischen Antikörper und einem Cy3-gekoppelten, sekundären Antikörper untersucht. Die Verteilung von Dnmt1 konnte durch die Kopplung an GFP (grün fluoreszierendes Protein) direkt mit dem konfokalen Mikroskop detektiert werden. Dnmt1 konnte sowohl in stimulierten als auch unstimulierten Zellen immer im Kern lokalisiert werden. Für die cGKIa wurde, wie schon bei der Kotransfektion mit Dnmt3a, ein variables Verteilungsmuster beobachtet. Die Kinase wurde im Zellkern entweder kaum, moderat oder deutlich exprimiert. Das Zytoplasma war in allen Zellen gefärbt, wobei wieder meistens der perinukleäre Bereich um den gesamten Kern oder nur einseitig stärker gefärbt war. Zwischen 8-pCPT-cGMP-stimulierten und unstimulierten Zellen konnte kein Unterschied im Verteilungsmuster der cGKIa beobachtet werden. Eine Kolokalisation beider Proteine konnte in einigen Zellen im Zellkern beobachtet werden (Abb. 50).



Abb. 50: Kolokalisation von cGKIa und Dnmt1 in COS-7-Zellen

COS 7-Zellen wurden mit cGKIα und GFP-Dnmt1 kotransfiziert und mit einem cGKIα-isoformspezifischen, polyklonalen Antikörper und einem Cy3-gekoppelten, sekundären Antikörper (rote Färbung; A1, B1, C1, D1) behandelt. Dnmt1 wurde durch direkte Fluoreszenz des gekoppelten GFP (green fluoreszenz protein) detektiert (grüne Färbung, A2, B2, C2, D2). Die Färbungen wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops dokumentiert. Die Überlagerung beider Färbungen (A3, B3, C3, D3) zeigte z.T. eine deutliche Kolokalisation (C3, D3) der cGKIα und der Dnmt1 im Zellkern. Maßbalken: 20μm