

Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Technischen Universität München Am Biederstein
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann)

Analyse der neuronalen Expression von cGMP-abhängigen Proteinkinasen und IRAG mittels In-situ-Hybridisierung

Michael Maximilian Gaisa

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender:	Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier
Prüfer der Dissertation:	1. Univ.-Prof. Dr. F. Hofmann
	2. Priv.-Doz. Dr. Th. Kleppisch

Die Dissertation wurde am 12. Juni 2003 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15. Oktober 2003
angenommen.

meinen Eltern

1	<u>EINLEITUNG</u>	1
1.1	STICKSTOFFMONOXID (NO)	1
1.2	SYNTHESE VON NO UND cGMP	2
1.3	cGK ISOFORMEN	4
1.4	EXPRESSIONSMUSTER VON cGKI UND cGKII	6
1.5	FUNKTIONEN DER cGKI	6
1.6	FUNKTIONEN DER cGKII	9
1.7	NEURONALE FUNKTIONEN DER cGKS	9
1.8	STRUKTUR UND FUNKTION VON IRAG	10
1.9	ZIELSETZUNG DER PROMOTIONSARBEIT	12
2	<u>MATERIAL UND METHODEN</u>	13
2.1	KULTUR VON BAKTERIEN	13
2.1.1	VERWENDETER STAMM	13
2.1.2	NÄHRMEDIUM UND ANTIBIOTIKUM	13
2.1.3	ANZUCHT DER BAKTERIEN	14
2.2	VERWENDETES PLASMID	14
2.3	REINIGUNG VON NUKLEINSÄUREN	14
2.3.1	PHENOL-CHLOROFORM-EXTRAKTION	14
2.3.2	PRÄZIPITATION VON NUKLEINSÄUREN	15
2.3.3	KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	15
2.4	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA	15
2.5	ENZYMATISCHE MODIFIKATION VON DNA	16
2.5.1	RESTRIKTIONSENZYME	16
2.5.2	VERKNÜPFUNG VON DNA-FRAGMENTEN DURCH T4-DNA-LIGASE	17
2.6	AUFTRENNUNG UND ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN	18
2.6.1	AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	19
2.6.2	GELEXTRAKTION SPEZIFISCHER DNA-FRAGMENTE	19
2.7	SEQUENZANALYSE VON PLASMID-DNA	20

2.8	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR) UND RT-PCR	22
2.9	TRANSFORMATION VON BAKTERIEN	24
2.9.1	PRÄPARATION ELEKTROKOMPETENTER BAKTERIENZELLEN	24
2.9.2	TRANSFORMATION VON <i>E. COLI</i> MITTELS ELEKTROPORATION	24
2.10	ORGANPRÄPARATION FÜR DIE IN-SITU-HYBRIDISIERUNG	25
2.11	IN-SITU-HYBRIDISIERUNG	26
2.11.1	IN-VITRO-TRANSKRIPTION	28
2.11.2	PROTOKOLL FÜR DIE IN-SITU-HYBRIDISIERUNG	29
2.11.3	MIKROAUTORADIOGRAPHIE MITTELS FILMEMULSION	31
2.11.4	HISTOLOGISCHE FÄRBUNGEN	32
2.11.5	MIKROSKOPIE UND PHOTOGRAPHIE	32
3	<u>ERGEBNISSE</u>	<u>33</u>
3.1	HERSTELLUNG DER GENSONDEN FÜR DIE IN-SITU-HYBRIDISIERUNG	33
3.1.1	ISOFORMSPEZIFISCHE SONDEN FÜR CGKI α UND CGKI β	33
3.1.2	IRAG-GENSONDEN	35
3.2	ERGEBNISSE DER IN-SITU-HYBRIDISIERUNGSEXPERIMENTE	36
3.2.1	VERTEILUNGSMUSTER DER CGKI-ISOFORMEN IM GEHIRN	36
3.2.2	EXPRESSION VON CGKII	40
3.2.3	VERTEILUNGSMUSTER VON IRAG IM GEHIRN	41
3.3	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE	44
4	<u>DISKUSSION</u>	<u>46</u>
5	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	<u>51</u>
6	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	<u>52</u>
7	<u>ANHANG</u>	<u>65</u>
7.1	VERWENDETE ABKÜRZUNGEN	65
7.2	VERWENDETE OLIGONUKLEOTIDE	67

8 DANKSAGUNG

1 Einleitung

1.1 Stickstoffmonoxid (NO)

Das gasförmige Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO) ist an einer Vielzahl physiologischer Prozesse beteiligt. Das zunehmende Verständnis dieser komplexen Zusammenhänge und die Aussicht, daß sich durch pharmakologische Beeinflussung der assoziierten Signaltransduktionsmechanismen neue therapeutische Optionen eröffnen, haben in den letzten Jahren reges Forschungsinteresse entfacht. Eine Schlüsselrolle spielt NO u.a. auf immunologischer, kardiovaskulärer und neuronaler Ebene.

NO ist ein Radikal, das in größeren Mengen cytotoxische Wirkung entfaltet. Makrophagen und Granulozyten können durch bakterielle Lipopolysaccharide und Cytokine zur Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) stimuliert werden; diese unterscheidet sich, wie unter 1.2 ausgeführt, von den konstitutiven endothelialen (eNOS) und neuronalen (nNOS) NO-Synthasen und katalysiert die Produktion solcher (cytotoxischer) Mengen NO mit konsekutiv antiinfektöser und antiproliferativer Wirkung (Hibbs et al., 1987). Des Weiteren nimmt NO Einfluß auf die Synthese inflammatorischer Cytokine (Tiao et al., 1994; Harbrecht et al., 1995). Auch Zelldifferenzierung (Morbidelli et al., 1996) und Apoptose (Albina und Reichner, 1995) werden durch NO beeinflusst.

Bereits im Jahre 1978 wurde NO von Murad et al. als der „endothelium-derived relaxing factor“ (EDRF) identifiziert. Neben der Erniedrigung des Gefäßtonus (Palmer et al., 1987; Ignarro et al., 1987) induziert NO eine Reduktion der Thrombozytenadhäsions- und -aggregationsneigung (Azuma et al., 1986). Darüber hinaus vermindert NO die Adhäsion von Leukozyten an die Gefäßwand und bremst die Proliferation glatter Gefäßwandmuskelzellen (Garg und Hassid, 1989; Calderone et al., 1998). Da all diese Prozesse an der Pathogenese atheromatöser Gefäßerkrankungen beteiligt sind, wird NO als protektives Prinzip im vaskulären System angesehen.

Auch im Gastrointestinaltrakt spielt NO eine wichtige Rolle als sogenannter „atypischer“, NANC (nicht-adrenerg, nicht-cholinerger) Neurotransmitter inhibitorischer Neurone. So

vermittelt NO aus Magennerven die reflektorische Erweiterung des Magens auf Dehnungsreize sowie die Magenentleerung. NO-Synthase-haltige Nervenfasern in den Plexus submucosus und myentericus steuern die relaxierende Komponente der peristaltischen Welle (Bult et al., 1990; Burnstock et al., 1970).

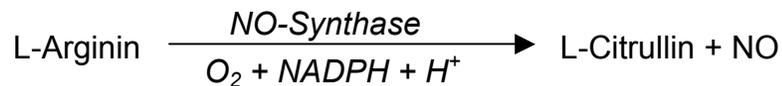
Daneben ist NO auch an der Reproduktion beteiligt. Einerseits beeinflusst es die hypothalamische Freisetzung von Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH), andererseits hat es großen Anteil am Zustandekommen der penilen Erektion.

Im Zentralnervensystem ist NO wohl kein Neurotransmitter im eigentlichen Sinne, es ist jedoch an der langfristigen Modulation synaptischer Transmission („long-term potentiation“ und „long-term inhibition“) und damit an so komplexen Leistungen wie Lernen und Gedächtnis beteiligt (Yamada, 1998).

Aufgrund seiner äußerst kurzen biologischen Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden entfaltet NO seine Wirkung vornehmlich auto-bzw. parakrin, d.h. einerseits auf die synthetisierende Zelle selbst sowie andererseits auf die den Syntheseort unmittelbar umgebenden Zellen. Zu den bislang identifizierten Regulationsmechanismen, an denen NO beteiligt ist, gehören die Produktion reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffradikale, die ADP-Ribosylierung von Proteinen sowie die Stimulation der löslichen (cytosolischen) Guanylylzyklase (sGC), welche zu einer Erhöhung der intrazellulären cGMP-Spiegel führt. cGMP, der intrazelluläre „second messenger“, hat drei bislang ermittelte Zielstrukturen: in einigen Zelltypen moduliert cGMP die Konzentration von cAMP durch Aktivierung bzw. Inhibierung cAMP-spezifischer Phosphodiesterasen (PDEs). In der Retina und im olfaktorischen System öffnet cGMP sog. cyclic-nucleotide-gated cation channels (CNGs), die bei der Signalübertragung in diesen sensorischen Systemen eine wichtige Rolle spielen; daneben aktiviert cGMP cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGKs) (Lohmann et al., 1997; Pfeifer et al., 1999).

1.2 Synthese von NO und cGMP

NO wird im Körper aus L-Arginin unter Katalyse der NO-Synthase gebildet. Bei der Reaktion wird ein Guanidinstickstoff des Arginins unter Bildung von Citrullin zu NO oxidiert.



Es existieren drei verschiedene Isoformen der NO-Synthase (NOS), eine neuronale nNOS (Bredt et al., 1990), eine endotheliale eNOS (Michel und Lamas, 1992) und eine induzierbare iNOS (Vie et al., 1992). Alle Formen bestehen aus einer N-terminalen Domäne mit Oxygenaseaktivität und einer C-terminalen Domäne mit Reduktaseaktivität (Liu und Gross, 1996), die durch ein Calmodulin-bindendes Peptid miteinander verbunden sind. Letzterem kommt eine wesentliche Bedeutung für die Regulation der Enzymaktivität zu. Der C-Terminus weist starke Homologien zu Cytochrom-P-450-Reduktasen auf; er enthält Bindungsstellen für NADPH, FAD und FMN. Innerhalb der FMN-bindenden Peptidsequenz findet sich bei der eNOS und nNOS eine inhibitorische Sequenz, die bei der iNOS fehlt (Salerno et al., 1997). N-terminal sind Bindungsstellen für Tetrahydrobiopterin und L-Arginin lokalisiert; daneben ist dort über einen Cysteinrest kovalent eine Hämgruppe gebunden (Klatt et al., 1992; White und Marletta, 1992). Um funktionell aktiv werden zu können, lagern sich zwei NOS-Moleküle über nicht-kovalente Wechselwirkung N-terminal aneinander (Crane et al., 1998). Unter Anstieg der intrazellulären Calciumkonzentration kommt es zur Bildung eines Komplexes aus Calcium und Calmodulin, der mit der NOS interagiert und eine Konformationsänderung induziert. Dadurch wird das inhibitorische Peptid verdrängt und eine Annäherung des reduzierenden C-Terminus des einen NOS-Moleküls an den oxidierenden N-Terminus des anderen NOS-Moleküls erreicht, wodurch die Elektronenübertragung ermöglicht wird, die letztlich zur Bildung von NO und Citrullin führt (Zusammenfassung siehe Lane und Gross, 2000). Im Gegensatz zur eNOS und nNOS, deren Aktivität Calcium-Calmodulin-abhängig reguliert wird, ist die iNOS in Ermangelung eines inhibitorischen Peptids ständig aktiv und kann folglich nur auf Ebene der Transkription reguliert (d.h. im Bedarfsfall induziert) werden.

Wie einleitend kurz erwähnt kommt es über NO-vermittelte Stimulation der im Cytosol lokalisierten, löslichen Guanylylzyklase (sGC) zur Synthese des intrazellulären „second messengers“ cGMP aus GTP. Die sGC ist ein NO-sensitives Heterodimer, das aus jeweils zwei funktionellen Untereinheiten besteht und eine prosthetische Häm-Gruppe enthält (Gerzer et al., 1981); diese scheint eine unabdingbare Voraussetzung für den

stimulatorischen Effekt von NO zu sein (Ignarro et al., 1982). Es existieren vier bislang identifizierte Untereinheiten dieses Enzyms: $\alpha_1, \alpha_2, \beta_1$ und β_2 , wobei auf Proteinebene lediglich die Heterodimere $\alpha_1\beta_1$ und $\alpha_2\beta_1$ (Russwurm et al., 1998) als katalytisch aktive Enzyme beschrieben sind. Die Untereinheiten können dabei in drei funktionelle Domänen unterteilt werden: eine C-terminale katalytische Domäne, einen zentralen Abschnitt und eine N-terminale Domäne, die essentiell für die Häm-Bindungseigenschaften der sGC ist (Foerster et al., 1996). NO stimuliert die sGC, indem es an die prosthetische Häm-Gruppe des Enzyms bindet, und führt dadurch zu einer bis zu 400fachen Aktivierung der Zyklastase (Humbert et al., 1990; Stone und Marletta, 1995). Wie für alle Zyklastasen, ist die Formation eines Dimers auch für die katalytische Aktivität der sGC entscheidend (Wedel et al., 1995).

Neben der sGC werden auch membranständige, sog. partikuläre Guanylylzyklasen (pGCs) unterschieden, unter deren Katalyse der second messenger cGMP synthetisiert wird. Zu den pGCs zählen die Isoformen GC-A, GC-B und GC-C. Auch sie bestehen jeweils aus mindestens zwei Untereinheiten, bilden Dimere (Thompson und Garbers, 1995), werden aber nicht über NO, sondern über natriuretische Peptide aktiviert (Chinkers et al., 1989); diese binden an eine extrazelluläre Domäne der Zyklastase und führen so zu einer Aktivierung des Enzyms. So wird beispielsweise das atriale natriuretische Peptid (ANP) bei Hypervolämie und konsekutiver atrialer Volumenbelastung freigesetzt, bindet an GC-A der Niere und reguliert in der Folge Diurese, Natriumsekretion und damit den systemischen Blutdruck.

1.3 cGK Isoformen

Wie unter 1.1 ausgeführt, induziert NO über Bindung und Aktivierung der sGC die Synthese des intrazellulären second messengers cGMP und damit indirekt die Aktivierung cGMP-abhängiger Proteinkinase (cGKs). Die cGKs zählen zur Familie der Serin/Threonin-Kinase; es existieren insgesamt drei Isoformen: cGKI α , cGKI β und cGKII (siehe Abbildung 1.1). Dabei werden cGKI und cGKII von zwei unterschiedlichen Genen kodiert. Für den N-Terminus der cGKI kodieren zwei alternativ gespleißte Exone, wodurch die beiden Isoformen cGKI α und β entstehen. Die Enzyme bestehen aus

jeweils drei funktionellen Domänen: einer N-terminalen Domäne, die einen Leucin-Zipper enthält, einer regulatorischen Domäne mit zwei cGMP-Bindungsstellen sowie einer katalytischen Domäne mit den MgATP- und Peptidbindungstaschen. Letztgenannte Domäne katalysiert die Übertragung des γ -Phosphates des ATP auf einen Serin/Threonin-Rest des Zielproteins (Zusammenfassung siehe Pfeifer et al., 1999). Über die N-terminale Domäne werden drei Funktionen vermittelt. Zum einen kommt es durch Vermittlung des im N-Terminus enthaltenen Leucin-Zippers zur Protein-Protein-Interaktion (cGKs sind Homodimere). Daneben ist die N-terminale Domäne an der (intramolekularen) Aktivierung bzw. Inhibierung des Enzyms beteiligt: durch Bindung jeweils eines cGMP-Moleküls an die cGMP-Bindungsstellen der regulatorischen Domäne kommt es zu einer Konformationsänderung, die zur Aufhebung der durch den N-Terminus bewirkten Inhibierung des katalytischen Zentrums führt und damit die enzymatische Phosphorylierung des Substratproteins erlaubt. Schließlich wird auch die Zielsteuerung der Enzyme zu verschiedenen subzellulären Strukturen durch den N-Terminus vermittelt.

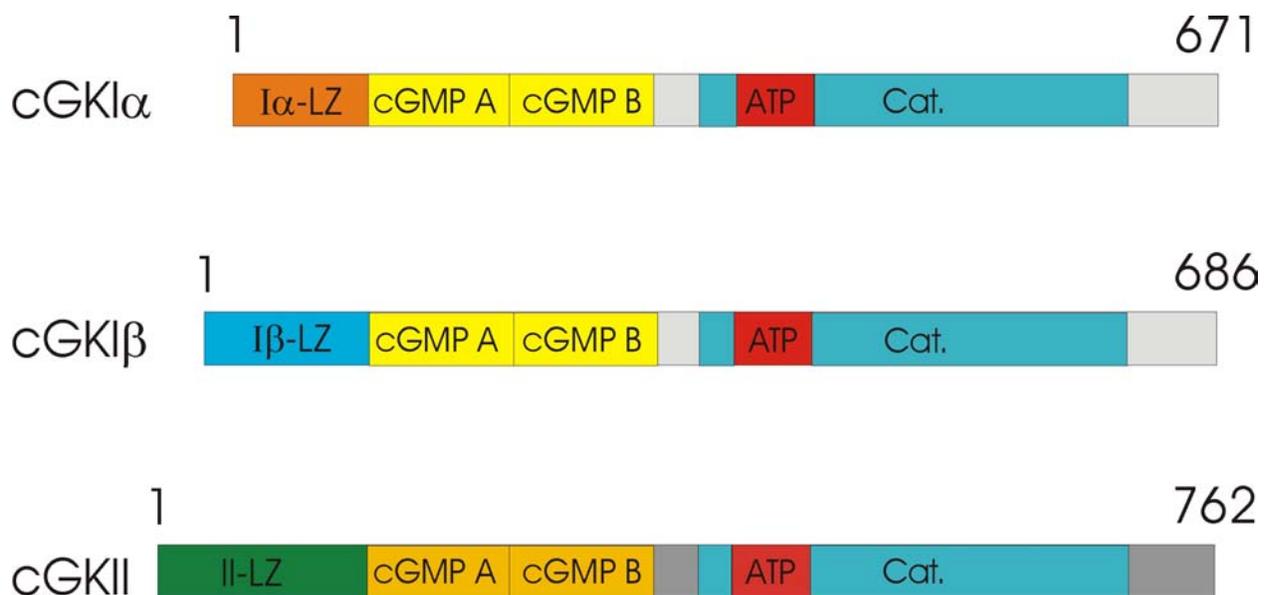


Abbildung 1.1 zeigt schematisch die drei Isoformen der cGMP-abhängigen Proteinkinasen. LZ: Leucin-Zipper; Cat.: katalytische Domäne. Zahlenangaben in Aminosäuren (aa).

1.4 Expressionsmuster von cGKI und cGKII

cGKI ist in verschiedenen glatten Muskelgeweben in hohen Konzentrationen exprimiert, u.a. in glatten Gefäßwandmuskelzellen, Uterus, Trachea und Gastrointestinaltrakt. Daneben findet sich cGKI in Thrombozyten, in der Niere und verschiedenen Hirnregionen (v.a. in Cerebellum und Hippocampus). Niedrigere Konzentrationen ließen sich in vaskulären Endothelzellen, Granulozyten, Chondrozyten und Osteoklasten detektieren (Keilbach et al., 1992; Kleppisch et al., 1999). Im Gegensatz dazu konnte cGKII nicht in Zellen des kardiovaskulären Systems nachgewiesen werden; die Expression beschränkt sich auf die Bürstensaummembran der intestinalen Mukosa (Markert et al., 1995), die juxtaglomerulären Zellen der Niere (Gambaryan et al., 1996), Chondrozyten (Pfeifer et al., 1996) sowie spezifische Hirnregionen (El-Husseini et al., 1995).

1.5 Funktionen der cGKI

Wie Untersuchungen an cGKI-defizienten Mäusen zeigen (Pfeifer et al., 1998), ist cGKI an der Kontrolle des vaskulären Tonus und damit an der Regulation des systemischen Blutdruckes beteiligt. Der Tonus glatter Muskelzellen wird durch Modulation der intrazellulären Calciumionenkonzentration ($[Ca^{2+}]_i$) reguliert. In den meisten glatten Muskelzellen wird die Kontraktion durch die rezeptorvermittelte Synthese von Inositol 1,4,5-trisphosphat (IP_3) initiiert. IP_3 induziert nach Bindung an den IP_3 -Rezeptor Typ 1 (IP_3R1) die Freisetzung von Calciumionen aus intrazellulären Calciumspeichern (endoplasmatisches Retikulum). Die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ vermittelt dann über Aktivierung der Ca^{2+} -Calmodulin-abhängigen Myosin-Leichtketten-Kinase (MLCK) die Kontraktion, indem MLCK die leichte Kette des Myosins (MLC) phosphoryliert und dadurch die Myosin-ATPase aktiviert. Daneben kann die Kontraktion glatter Muskelzellen bei konstanten $[Ca^{2+}]_i$ durch Veränderung der Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktile Apparates moduliert werden. cGKI nimmt auf verschiedenen Ebenen sowohl auf die Erhöhung der $[Ca^{2+}]_i$ als auch auf die Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktile Apparates Einfluß.

cGKI phosphoryliert IP₃R1 an zwei Positionen (Komalavilas und Lincoln, 1996), die darüber hinaus auch von cAMP-abhängigen Proteinkinase phosphoryliert werden können. Bis dato ist ungeklärt, in wie weit die Phosphorylierung des IP₃R1 durch cGKI einen direkten Effekt auf die Ca²⁺-Freisetzung *in vivo* hat (Haug et al., 1999).

Das im glatten Muskel dominierende cGKI-Isoenzym ist cGKIβ (Keilbach et al., 1992). cGKIβ copräzipitiert dort mit dem IP₃R1 und einem 125-135 kDa Protein, welches als Inositol 1,4,5-trisphosphat-Rezeptor-assoziiertes cGMP-Kinase-Substrat (IRAG) identifiziert wurde (Schlossmann et al., 2000). Es handelt sich dabei um ein neues Protein, das neben seiner starken Expression in glatten Muskelzellen auch in einer Vielzahl anderer Zellen und Gewebe nachweisbar ist. IRAG ist an der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) lokalisiert und weist strukturelle Homologien zu Jaw1, einem Protein des ER lymphoider Zellen (Behrens et al., 1994) sowie zum Genprodukt von *Mrv1* auf, einem potentiellen Tumorsuppressorgen, das an der Entstehung myeloischer Leukämien beteiligt ist (Shaughnessy et al., 1999).

IRAG wird von cGKIβ phosphoryliert und inhibiert in der Folge die IP₃-induzierte Ca²⁺-Freisetzung, ein Hinweis darauf, daß die Phosphorylierung von IRAG ein wesentlicher Mechanismus sein könnte, durch den NO/cGMP die [Ca²⁺]_i und damit den glatten Muskeltonus reduzieren.

Ein anderer Mechanismus, der zur Senkung der [Ca²⁺]_i führt, ist die direkte Phosphorylierung Ca²⁺-aktivierter K⁺-Kanäle (BK_{Ca2+}) durch cGKI (durch welches Isoenzym ist bislang nicht geklärt); durch Phosphorylierung dieser Kanäle kommt es zu einer Erhöhung der transmembranalen Ionenleitfähigkeit für K⁺ (Alioua et al., 1998; Fukao et al., 1999), damit zur Hyperpolarisation der Membran und in der Folge zu einer negativen Modulation spannungsabhängiger L-Typ Ca²⁺-Kanäle, wodurch der Ca²⁺-Influx reduziert wird. cGKI erhöht auch die Offenwahrscheinlichkeit von BK_{Ca2+}-Kanälen in einigen Hirnregionen (Furukawa et al., 1996), was nahelegt, daß die Regulation des Membranpotentials durch cGKI ein weitverbreitetes Phänomen ist.

Nicht zuletzt wird der Tonus glatter Muskulatur auch mittels Dephosphorylierung der leichten Kette des Myosins (MLC) durch die Myosinphosphatase (PP1M) gesenkt. PP1M ist ein trimeres Protein, bestehend aus einer 110-130 kDa regulatorischen Myosin-bindenden Untereinheit (MBS), einer 37 kDa katalytischen Untereinheit und einem 20 kDa Protein mit unbekannter Funktion. Einige Studien verdeutlichen, daß eine

reduzierte PP1M-Aktivität mit einer erhöhten Ca^{2+} -Sensitivität des kontraktile Apparates einhergeht (Kimura et al., 1996). Die regulatorische MBS der PP1M wird spezifisch von cGKI α phosphoryliert (Nakamura et al., 1999; Surks et al., 1999).

Der individuelle Beitrag der beschriebenen cGKI-abhängigen Mechanismen zur Regulation des glatten Muskeltonus kann in verschiedenen Geweben variieren. Zusammengefaßt sind diese Erkenntnisse ein Beleg dafür, daß der Signaltransduktionsweg von NO in glatten Muskelzellen und anderen Zelltypen sich über cGKI vollzieht und von herausragender physiologischer Relevanz ist.

Auch an der Regulation der Proliferation glatter Muskelzellen ist cGKI beteiligt. cGKI beeinflusst dabei die Aktivierung verschiedener Gene, die die Proliferation steuern; welche Signaltransduktionsmechanismen dabei von Bedeutung sind, wird kontrovers diskutiert. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, daß cGKI die Genexpression über die ERK/MAP-Kinase-Signalkaskade moduliert (Suhasingi et al., 1998; Komalavilas et al., 1999; Browning et al., 2000).

Endotheliale Zellen setzen NO (=EDRF) und Prostacyclin frei, Faktoren, die über eine Elevation der thrombozytären cAMP- und cGMP-Spiegel die Adhäsion der Blutplättchen an die Gefäßwand sowie deren Aggregation hemmen und dadurch mit der primären Hämostase interferieren. Thrombozyten exprimieren hohe Konzentrationen von cGKI, deren Aktivierung wie bereits erläutert NO-vermittelt über Stimulation der sGC und konsekutive Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels gesteuert wird. Massberg et al. konnten mit Hilfe von Thrombozyten cGKI-defizienter Mäuse die antiadhäsive und antiaggregatorische Funktion der cGKI belegen. Der kritische Mechanismus, der zur Aggregation führt, ist die Aktivierung des GP IIb/IIIa, das als Fibrinogenrezeptor fungiert und dessen Aktivierung durch cGKI inhibiert wird (Massberg et al., 1999). Es war gezeigt worden, daß das fokale Adhäsionsmolekül VASP cGKI-abhängig phosphoryliert wird und dieser Schritt notwendig ist, um die Aktivierung von GP IIb/IIIa zu verhindern (Horstrup et al., 1994). Nach Deletion des VASP-Gens bei der Maus zeigte sich jedoch, daß weder die Plättchenfunktion als solche noch die Aktivierung von GP IIb/IIIa entscheidend beeinträchtigt waren (Aszodi et al., 1999; Hauser et al., 1999). Aktivierung der cGKI inhibierte die Ca^{2+} -Freisetzung aus IP_3 -sensitiven Speichern bei Wildtyp- und VASP-defizienten Thrombozyten in ähnlichem Maße (Aszodi et al., 1999). Daher scheint die Freisetzung von Ca^{2+} aus IP_3 -sensitiven Speichern ein Schlüsselereignis bei der

Thrombozytenaktivierung und -aggregation zu sein und steht offenbar unter der Kontrolle von cGKI.

1.6 Funktionen der cGKII

Das Wissen um die Funktion cGMP-abhängiger Proteinkinasen vom Typ II befindet sich erst im Anfangsstadium; eine Beteiligung der cGKII an Phänomenen wie der intestinalen Sekretion, der renalen Reninfreisetzung sowie des Knochenwachstums konnte jedoch gezeigt werden.

Aktivierte cGKII phosphoryliert den „cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR) und forciert dadurch Chlorid- und Flüssigkeitssekretion in das intestinale Lumen (Vaandrager et al., 1998). Die cGKII scheint dabei von entscheidender Bedeutung für die von Guanylin bzw. STa (hitze stabiles Enterotoxin von *E. coli*) gesteuerte und über cGMP vermittelte Sekretion zu sein (Pfeifer et al., 1996; Vaandrager et al., 2000).

Gleichwohl der zugrundeliegende molekulare Mechanismus ungeklärt ist, moduliert cGKII die Reninfreisetzung in der Niere (Wagner et al., 1998).

Die Beteiligung von cGKII an der enchondralen Ossifikation und damit am Knochenwachstum konnte an cGKII-knockout-Mäusen demonstriert werden (Pfeifer et al., 1996). Auch hier ist der molekulare Mechanismus unklar.

1.7 Neuronale Funktionen der cGKs

Aktivitätsabhängige, molekulare Langzeitveränderungen der synaptischen Übertragung sind Grundlage der neuronalen Plastizität und damit so komplexer Leistungen wie Lernen und Gedächtnis. Bereits kurzzeitige, hochfrequente Aktivierung afferenter Impulse auf die Synapse kann ausreichen, um die Wirksamkeit der Synapse über einen längeren Zeitraum hinweg signifikant zu verstärken; ein Phänomen, das als „long-term potentiation“ (LTP) bezeichnet wird und an dem NO als Botenstoff nachweislich beteiligt ist. So ließ sich bei Mäusen mit einer gezielten Mutation der nNOS und eNOS eine Störung der LTP in der CA1 Region des Hippocampus aufzeigen (Son et al., 1996). Für

eine Beteiligung der cGKs an den involvierten Signaltransduktionsmechanismen, wie von Zhou et al. (1994) propagiert, fanden sich bei Untersuchungen an konventionellen (cGKI und cGKII) Doppelknockout-Mäusen allerdings keine Hinweise (Kleppisch et al., 1999). Die „long-term depression“ (LTD) im Cerebellum hingegen, ein weiteres Phänomen neuronaler Plastizität, im Rahmen dessen es durch niedrigfrequente synaptische Stimulation zu einer Abschwächung der synaptischen Übertragung kommt, scheint von cGKs beeinflusst zu sein (Feil, Hofmann, unveröffentlicht); im Cerebellum spielt die LTD wohl bei motorischen Lernprozessen eine Rolle (Sakurai, 1987). Die LTD im Gyrus dentatus allerdings wird offenbar in Abhängigkeit von der sGC-cGMP-cGK-Signalkaskade induziert (Wu et al., 1998), wobei hier eine Verbindung zu Lernvorgängen nicht hergestellt werden konnte.

In cerebellären Purkinjezellen phosphoryliert cGKI ein kleines Peptid, das in der Folge bevorzugt Phosphatase 1 (Hall et al., 1999) oder Phosphatase 2A (Endo et al., 1999) inhibiert.

cGKII-abhängige Proteinphosphorylierung scheint mit der neuronalen Aktivität des Thalamus verknüpft zu sein (El-Husseini et al., 1998). Außerdem weisen cGKII-defiziente Mäuse eine Reihe von Verhaltensauffälligkeiten auf (Werner et al., 2000).

Die Funktion sowohl der cGKI als auch der cGKII auf neuronaler Ebene bedarf weiterer Klärung.

1.8 Struktur und Funktion von IRAG

Wie unter 1.5 kurz erläutert, stellt IRAG einen erst kürzlich identifizierten, neuen Baustein in der NO/cGMP-Signaltransduktionskaskade dar. Dabei bildet IRAG einen makromolekularen Komplex mit IP₃R1 und cGKI β und vermittelt eine negative Modulation der IP₃-induzierten Ca²⁺-Freisetzung, deren exakter molekularer Mechanismus noch nicht lückenlos geklärt ist. Abbildung 1.2 zeigt schematisch die Struktur von IRAG, wie es aus bovinen, trachealen glatten Muskelzellen isoliert wurde (bIRAG). Sequenzanalysen ergaben, daß die Sequenz im Bereich zwischen den Aminosäuren 342 und 911 zu 42% homolog zum ebenfalls transmembranal am ER (allerdings ausschließlich in lymphoiden Zellen) lokalisierten Jaw1 ist. Es existieren jeweils vier verschiedene Transkripte, die jeweils für IRAGa, IRAGb und die N-

terminalen Deletionsformen Δ IRAGa und Δ IRAGb kodieren (siehe Abbildung 1.2). Die Δ IRAGa- und Δ IRAGb-Transkripte kodieren dabei für identische Proteine, die sich lediglich in der untranslatierten Region des 5'-Endes unterscheiden. Ein transmembranales Segment findet sich konstant am C-Terminus. Nur IRAGa verfügt zusätzlich über eine Transmembranhelix am N-terminalen Ende. Im zentralen Abschnitt des Proteins befindet sich eine coiled coil Domäne, über die Protein-Protein-Interaktionen vermittelt werden könnten. Die bislang identifizierten *in vitro* Phosphorylierungsstellen für cGKI β befinden sich vorwiegend C- und N-terminal der coiled coil Domäne; ein Hinweis darauf, daß die regulatorische Funktion in diesen dem Cytosol zugewandten Bereichen des Moleküls lokalisiert ist (Zusammenfassung s. Schlossmann et al., 2000).

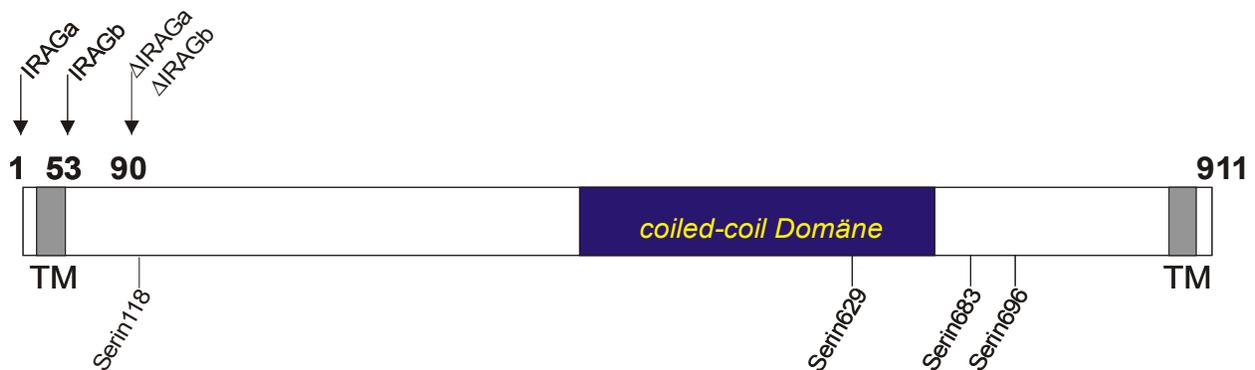


Abbildung 1.2 zeigt schematisch die Struktur von IRAG. TM bezeichnet jeweils die transmembranale Domäne. Angegeben sind des weiteren die vier Phosphorylierungsstellen (Ser118, Ser629, Ser683, Ser696). Zahlenangaben in Aminosäuren (aa).

Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, daß eine Interaktion zwischen IRAG und cGKI β unter Vermittlung der Peptidsequenz zwischen aa 152 und aa 184 von IRAG einerseits, und dem am N-Terminus von cGKI β lokalisierten Leucin-Zipper (aa 1-53) andererseits zustande kommt. Die sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beobachtete Interaktion wird dabei höchstwahrscheinlich elektrostatisch initiiert und ließ sich daneben weder für cGKI α noch für cGKI β belegen. cGKI β phosphoryliert IRAG an bis zu vier Serinresten. Die Phosphorylierung des Serins an Position 696 (Ser696) scheint dabei eine Schlüsselrolle

bei der Reduktion der Ca^{2+} -Freisetzung aus IP_3 -sensitiven Speichern zu spielen (Ammendola et al., 2001).

1.9 Zielsetzung der Promotionsarbeit

Weder über die Expression noch über die Funktion von IRAG im Zentralnervensystem (ZNS) lagen bislang Daten vor. Das Expressionsmuster von IRAG im Gehirn sollte daher mittels molekularbiologischer Methoden (In-situ-Hybridisierung) detektiert werden. Um eine eventuelle Kolo-kalisation von IRAG und cGKI β , wie sie in glatten Muskelzellen evident ist, auch auf neuronaler Ebene nachweisen zu können, fand im Rahmen dieser Arbeit das genannte Verfahren auch zur Bestimmung der ZNS-Lokalisation der cGKs einschließlich der cGKI-Isoformen α und β Anwendung.

2 Material und Methoden

2.1 Kultur von Bakterien

2.1.1 Verwendeter Stamm

Beim zur Amplifikation der Plasmide verwendeten Bakterienstamm handelt es sich um *Escherichia coli* (*E. coli*) XL1-Blue mit folgendem Genotyp: *F'::Tn10 proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15/recA1 endA1 gyrA96 (Nal^r) thi hsdR17 (rk-mk+) supE44 relA1 lac*.

2.1.2 Nährmedium und Antibiotikum

Zur Anzucht der Bakterien kam das Vollmedium Luria-Bertani (LB) zum Einsatz. Vor seiner Verwendung wurde das Medium durch zwanzigminütiges Autoklavieren bei 121°C und 2 bar sterilisiert.

Luria-Bertani-Medium, pH 7,2 – 7,5

Trypton (Gibco)	10 g
Hefeextrakt (Gibco)	5 g
NaCl	5 g
H ₂ O	ad 1000 ml

Zur Selektion plasmidtragender Bakterien wurde dem LB-Medium kurz vor der Anzucht das Antibiotikum Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Die Stammlösung, die Ampicillin-Natrium (Sigma) in einer Konzentration von 50 mg/ml enthält, wurde zuvor sterilfiltriert und in Aliquots bei –20°C aufbewahrt. Um Agarplatten herzustellen, wurde dem LB-Medium vor dem Autoklaviervorgang 15 g/l Agar (Gibco-BRL) hinzugefügt. Nach Abkühlen auf etwa 50°C wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg/ml zugegeben und das Medium in sterile Petrischalen gegossen.

2.1.3 Anzucht der Bakterien

Die Bakterien wurden in LB-(Fest- oder Flüssig-) Medium unter aeroben Bedingungen bei 37°C bebrütet. Flüssigkulturen wurden in Glasröhrchen oder Erlenmeyerkolben bei 37°C und 225 rpm inkubiert.

Zur Separation von (plasmidtragenden) Einzelkolonien wurden Bakteriensuspensionen auf ampicillinhaltigen LB-Agarplatten (s.o.) ausgestrichen, über 12 – 24 Stunden bei 37°C kultiviert und bis zu acht Wochen bei 4°C aufbewahrt. Zur längeren Aufbewahrung wurden Aliquots von Flüssigkulturen im Verhältnis 2 : 1 mit 50% Glycerin (ICN) versetzt, schockgefroren und bei –80°C archiviert.

2.2 Verwendetes Plasmid

pAL1

Dieser Vektor ist ein modifiziertes Derivat von pUC19; an den beiden Seiten der „multiple cloning site“ wurden die Sequenzen für den T3 bzw. den T7 RNA-Polymerase-Promotor und Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Asp*718 eingefügt (Ludwig et al., 1997). Er diente der Subklonierung und fand bei der In-vitro-Transkription von cRNA-Sonden für die In-situ-Hybridisierung Verwendung.

2.3 Reinigung von Nukleinsäuren

2.3.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Mit Hilfe der Phenol-Chloroform-Extraktion können Proteine (z.B. enzymatisch aktive) aus wässrigen Nukleinsäurelösungen entfernt werden. Dabei wurde die Nukleinsäurelösung zu gleichen Teilen mit Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, Roth) versetzt. Nach kräftigem Schütteln zum Zwecke der Durchmischung der Phasen (Emulsionsbildung) wurde abzentrifugiert, um eine erneute Trennung der Phasen zu erzielen (12000 x g, 5 min). Die wässrige Oberphase, die die Nukleinsäuren enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit Ethanol präzipitiert.

2.3.2 Präzipitation von Nukleinsäuren

Durch Präzipitation mit Ethanol können DNA-Fragmente und Plasmide gereinigt werden (Sambrook et al, 1989). Dazu wurde die Nukleinsäurelösung mit 1/10 Volumen 5M NaCl und dem 2,5fachen Volumen 100% Ethanol versetzt. Nach einstündiger Inkubation bei -20°C wurde die ausgefällte DNA abzentrifugiert ($12000 \times g$, 15min, 4°C), der Überstand dekantiert und das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation ($12000 \times g$, 5 min, 4°C) wurde das Pellet einem Trocknungsprozeß (Vakuumentrifuge/Speedvac) unterworfen und in einer geringen Menge sterilen Wassers aufgenommen.

2.3.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Nukleinsäuren absorbieren elektromagnetische Strahlung in einem Wellenlängenspektrum von 250 – 270 nm; dies ist auf die aromatischen Ringsysteme der DNA-Basen zurückzuführen. Die Nukleinsäurenkonzentration kann somit durch photometrische Extinktionsmessungen unter Anwendung des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt werden. Bei monochromatischem Licht der Wellenlänge 260 nm und einer Schichtdicke der verwendeten Quarzküvetten von 1 cm entspricht eine gemessene Extinktion von 1:

- 50 $\mu\text{g/ml}$ doppelsträngiger DNA,
- 40 $\mu\text{g/ml}$ einzelsträngiger RNA.

Die Reinheit von DNA und RNA (Verunreinigungen mit Protein oder Phenol erhöhen die Absorption bei 280 nm) kann aus dem Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ abgeschätzt werden. Dieser Quotient sollte über 1,7 liegen.

2.4 Isolierung von Plasmid-DNA

Plasmidisolierung und Reinigung mittels Säulenchromatographie

Zur Gewinnung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA kam der kommerziell verfügbare „E.Z.N.A.TM Plasmid Miniprep Kit I“ (Peqlab) zum Einsatz. Die Methode

basiert auf dem Prinzip des Zellaufschlusses durch modifizierte alkalische Lyse einerseits und auf den selektiven und reversiblen DNA-Bindungseigenschaften von Silikamembranen andererseits. Alle benötigten Puffer und Lösungen werden vom Hersteller gebrauchsfertig mitgeliefert. Die Präparation erfolgte gemäß der in beiliegendem Handbuch aufgelisteten Empfehlungen.

Die plasmidtragenden Einzelkolonien wurden in jeweils 5 ml eines ampicillinhaltigen LB-Flüssigmediums (Ampicillinkonzentration: 100 µg/ml) über Nacht bei 37°C und 225 rpm inkubiert. Am nächsten Morgen wurde die Bakteriensuspension durch Zentrifugation (12000 x g, 1 min, 4°C) pelletiert; die im Pellet enthaltenen, vitalen und plasmidtragenden Klone wurden mittels Zugabe der entsprechenden Lösungen alkalisch lysiert. Nach der Neutralisierung des alkalischen Lysats mit einer weiteren Lösung wurde der Ansatz durch Pelletieren (12000 x g, 1 min) des bakteriellen Debris geklärt und das geklärte Lysat auf eine HiBindTM-Miniprep-Säule geladen (in der Säule bindet die Plasmid-DNA an die enthaltene Silikamembran und kann durch einfaches Waschen von Kontaminationen und Enzyminhibitoren gereinigt werden). Im Anschluß an das Trocknen der Säule (Zentrifugation bei 12000 x g, 1 min) wurde die gereinigte Plasmid-DNA in 50 µl sterilen Wassers eluiert.

Im Anschluß daran wurde die DNA-Konzentration photometrisch überprüft und zur Kontrolle der Integrität des Plasmids eine Restriktionsanalyse durchgeführt. Die hochreine Plasmid-DNA konnte als Ausgangsmaterial für die PCR, Sequenzierung bzw. Transformation von Bakterien eingesetzt werden.

2.5 Enzymatische Modifikation von DNA

2.5.1 Restriktionsenzyme

Bei den Restriktionsendonukleasen, verkürzt Restriktionsenzyme genannt, handelt es sich um Endodesoxyribonukleasen mit der Eigenschaft, spezifische Nukleotidsequenzen innerhalb einer DNA-Doppelhelix zu erkennen und die DNA an definierten Positionen beider Stränge zu spalten (Sambrook et al., 1989). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Typ II-Restriktionsenzyme spalten ihr (DNA-)Substrat innerhalb oder

unmittelbar neben der palindromischen Erkennungssequenz. In Abhängigkeit von dem verwendeten Enzym kommt es zur Spaltung entweder an ein und derselben Position des DNA-Doppelstranges oder um ein oder mehrere Basenpaare versetzt; somit ergeben sich entweder glatte Enden (ohne Überhang, sog. „blunt ends“) oder einander komplementäre, 5'- bzw. 3'-überhängende „sticky ends“. In jedem Falle verfügen die durch enzymatische Spaltung freigelegten DNA-Enden über eine 5'-Phosphat- und eine 3'-OH-Gruppe; eine Tatsache, die die spätere enzymatische Neuverknüpfung (Ligation) kompatibler Enden möglich macht. Restriktionsenzyme werden mittels eines Buchstabencodes nach demjenigen Wirtsorganismus benannt, aus dem sie isoliert wurden.

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen, ihre Erkennungssequenzen, sowie diejenigen Puffer, in denen sie ihre höchste Aktivität entfalten, sind in Tabelle 2.1 zusammengefasst.

Restriktionsenzym	Hersteller	Erkennungssequenz	Puffer
<i>Asp718</i>	Roche	5'-G/GTACC-3'	Roche B
<i>BamHI</i>	NEB	5'-G/GATCC-3'	Roche B

Tabelle 2.1 Verwendete Restriktionsendonukleasen; die optimale Inkubationstemperatur betrug jeweils 37°C.

2.5.2 Verknüpfung von DNA-Fragmenten durch T4-DNA-Ligase

Unter ATP-Verbrauch kommt es durch Katalyse der T4-DNA-Ligase zur Knüpfung einer kovalenten Phosphodiesterbindung zwischen einem 3'-Hydroxyl- und einem 5'-Phosphatende doppelsträngiger DNA-Fragmente (Weiss et al, 1968). Im Rahmen dieser Arbeit fand dieses Enzym Verwendung, um Fremd- und Vektor-DNA kovalent zu rekombinanter Plasmid-DNA zu verknüpfen. T4-DNA-Ligase, linearisierter Vektor und Insert (Fremd-DNA) wurden in Ligasepuffer pipettiert und bei 16°C für etwa 16 h inkubiert, um anschließend das rekombinante Plasmid durch Transformation in *E. coli* einzuschleusen.

2.6 Auftrennung und Isolierung von DNA-Fragmenten

Nukleinsäuren werden bei ihrer Wanderung im elektrischen Feld nach Masse und Konformation (linear, offenzirkulär oder superhelikal) aufgetrennt. Das Zucker-Phosphat-Gerüst der Nukleinsäuren bedingt ihre negative Ladung, aufgrund derer sie bei der Elektrophorese zur Anode wandern; und zwar mit umso geringerer Geschwindigkeit, je größer sie sind. Die Wanderungsgeschwindigkeit linearer DNA-Fragmente im elektrischen Feld innerhalb einer Agarose-Gelmatrix verhält sich also umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Durch Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid können die elektrophoretisch getrennten Nukleotidfragmente im UV-Licht (302 nm) als diskrete Banden visualisiert werden. Ein DNA-Standard (1kb-Ladder, Gibco) zum Größenvergleich wurde simultan in eine separate Tasche des Agarosegels pipettiert. Zur Verlaufskontrolle der Elektrophorese wurde der Auftragspuffer mit farbigen Markern, Bromphenolblau und Xylencyanol, versehen, die die Elektrophoresefront markieren; dabei wandert Bromphenolblau mit DNA-Fragmenten von 10-100 bp Länge, Xylencyanol hingegen mit Fragmenten von circa 5 kb.

Verwendete Lösungen:

10 x TBE

Tris (USB)	0,9 M
Borsäure (Merck)	0,9 M
EDTA pH 8,0 (ICN)	20 mM

Elektrophoresepuffer

1 x TBE (1 Teil 10 x TBE + 9 Teile H₂O)

6 x Auftragspuffer

Ficoll Typ 400 (Sigma)	18%
EDTA pH 8,0	0,12 mM
TBE	6x
Bromphenolblau	0,15%
Xylencyanol FF (Sigma)	0,15%

Ethidiumbromid-Stammlösung

10 mg/ml (Sigma), wässrig

2.6.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die horizontale Agarosegelelektrophorese kam zur Anwendung, um DNA-Fragmente im Längenbereich von 15 bp bis 1 kb aufzutrennen. Für analytische wie präparative Zwecke wurden 0,8 bis 2%ige Gele verwendet (2%ige Gele für die Auftrennung kleinerer DNA-Fragmente <500 bp). Zur Herstellung des Geles wurde die Agarose in 1 x TBE gelöst und im Mikrowellenherd geschmolzen; nach Abkühlen der Lösung unter 50°C (vor dem Ausgießen in eine horizontale Elektrophoresekammer) wurde Ethidiumbromid zugesetzt (finale Konzentration im Gel: 800 ng/ml). Elektrophorese wurde mit 1 x TBE als Laufpuffer über circa 45 min. bei 150 V durchgeführt.

2.6.2 Gelextraktion spezifischer DNA-Fragmente

Zur Rückgewinnung eines spezifischen DNA-Fragmentes aus dem Laufgel nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde der "Gel Extraction Kit" (QIAGEN) verwendet. Das System stützt sich auf die selektiven DNA-Bindungseigenschaften von Silicagel-Membranen. Spezielle im Kit enthaltene Puffer- und Waschlösungen optimieren dabei die effiziente Rückgewinnung von DNA aus dem Agarosegel und die Entfernung von kontaminierenden Agentien. In Abhängigkeit von adäquaten Salzkonzentrationen und pH-Wert (gewährleistet durch die mitgelieferten Pufferlösungen) adsorbiert das betreffende DNA-Fragment an die Silicamembran, während Verunreinigungen diese

passieren; die gereinigte DNA kann dann mit Tris-Puffer oder Aqua bidestillata eluiert werden.

Zunächst wurde das interessierende DNA-Fragment mit Hilfe eines scharfen und sauberen Skalpells aus dem Agarosegel ausgeschnitten, abgewogen und in ein Reaktionsgefäß überführt. Im weiteren wurde nach den Angaben des Herstellers gemäß mitgeliefertem Handbuch verfahren, die mit der Silicagel-Membran versehene Säule beladen und nach mehreren Waschschritten das gereinigte DNA-Fragment mit 30 µl Aqua bidestillata durch Zentrifugation (1 min. bei 13000 x g) eluiert.

2.7 Sequenzanalyse von Plasmid-DNA

Die Sequenzanalyse rekombinanter Plasmid-DNA erfolgte gemäß dem „cycle sequencing“-Protokoll, einem kombinierten Ansatz aus der von Sanger et al. (1977) entwickelten Didesoxy-Kettenabbruchmethode einerseits und der Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion mit einer thermostabilen DNA-Polymerase andererseits. Die DNA-Polymerase synthetisiert dabei *in vitro* den komplementären Strang einer einzelsträngigen (Plasmid-) DNA-Matrize. Da im Rahmen der DNA-Synthese eine OH-Gruppe in 3'-Position der Nukleotide für die Verlängerung der Nukleotidkette erforderlich ist, kommt es in Anwesenheit von 2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) zu Kettenabbrüchen. Bei adäquater Wahl des Verhältnisses zwischen dNTPs und ddNTPs resultiert dabei eine Mischung von DNA-Fragmenten jeder möglichen Länge. Die unterschiedlich langen DNA-Fragmente werden durch den Einbau der mit jeweils charakteristischen Fluoreszenzfarbstoffen versehenen Didesoxynukleotide markiert. Da somit jede der vier Basen einen anderen Fluoreszenzmarker trägt, können Guanin, Cytosin, Adenin und Thymin in einem Ansatz sequenziert werden.

Sequenzierreaktion

Zum Zwecke der Synthese unterschiedlich langer, fluoreszierender DNA-Fragmente wurde folgender Ansatz verwendet:

Ready Reaction Mix (Perkin-Elmer)	4 μ l
Primer (0,8 pmol/ μ l)	4 μ l
Plasmid-DNA (50-500 ng)	1 μ l
Aqua bidestillata	ad 11 μ l

Der Ready Reaction Mix enthielt dabei die vier verschiedenen ddNTPs, die jeweils bei einer anderen Wellenlänge fluoreszieren (ddGTP: 540 nm, ddATP: 570 nm, ddTTP: 600 nm, ddCTP: 630 nm), die dNTPs sowie die Taq-Polymerase. Der Reaktionsansatz wurde kurz gemischt und in einem Thermocycler (BIOMETRA UNO-ThermoblockTM) amplifiziert, wobei die DNA zunächst für 2 min. bei 95°C denaturiert wurde. In der Folge schlossen sich 25 Zyklen des nachstehenden Protokolls an:

- a) Denaturierung: 95°C für 30 sec.
- b) Annealing: 50°C für 40 sec.
- c) Elongation: 60°C für 4 min.

Die Tatsache, daß bei der erläuterten Sequenzierreaktion nur ein Primer zugegeben wird, bedingt, daß es nur zu einer linearen Vermehrung der DNA-Matrize kommt, und nicht, wie bei der PCR, zu einer exponentiellen Amplifikation.

Das Reaktionsprodukt mußte mittels einer Gelfiltrationssäule (CentriSep Column, Perkin Elmer) von freien fluoreszierenden Nukleotiden gereinigt werden, indem es auf die erwähnte Säule pipettiert und für 2 min. bei 2500 rpm zentrifugiert wurde. Die gereinigte DNA wurde in einem Reaktionsgefäß aufgefangen und anschließend für 15 min. in einer Vakuumzentrifuge (SpeedVac) getrocknet. Das Pellet wurde in 20 μ l Template Suppression Reagent (Perkin Elmer) resuspendiert, für 3 min. bei 95°C denaturiert und in einen ABI PrismTM-Sequencer (Perkin Elmer) plaziert, der die Lösung in eine mit Polymer gefüllte Kapillare aspiriert. Durch die angelegte Spannung von 12,2 kV wandern die DNA-Fragmente in 5'-3'-Richtung durch einen Laserdetektor. Aus der Abfolge der von dem Laserdetektor bestimmten Farbsignale erfolgt dann die Errechnung der Nukleotidsequenz durch den Sequencer.

2.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und RT-PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) (Saiki et al., 1988; Sambrook et al., 1989) ist ein *in vitro*-Verfahren zur selektiven (exponentiellen) Amplifikation von definierten Nukleinsäuresequenzen. Dabei bedarf es zweier Oligonukleotid-Primer, die jeweils spezifisch an den kodierenden bzw. den nicht-kodierenden Strang des DNA-Fragmentes, das von Interesse ist, binden.

Zunächst wird die DNA-Matrize (Template) thermisch in zwei Einzelstränge aufgeschmolzen (Hitzenaturierung, 94°C), an die nach Erniedrigung der Temperatur die spezifischen Primer mit jeweils zu einem der Matrizenstränge komplementärer Sequenz binden (Annealing, 55°C). Ausgehend von diesem kurzen doppelsträngigen Bereich wird der fehlende, komplementäre Einzelstrang in 5'-3'-Richtung synthetisiert (Elongation, 72°C). Durch zyklische Repetition der Einzelschritte (Denaturierung, Annealing, Elongation) kommt es dabei idealerweise mit jedem Zyklus zu einer Verdoppelung der DNA und damit in einer Kettenreaktion zu einer exponentiellen, selektiven Anreicherung der durch die beiden Oligonukleotid-Primer flankierten DNA-Sequenz. Theoretisch entstehen bei n Zyklen 2^{n-1} amplifizierte Moleküle.

RNA wurde mit Hilfe der reversen Transkriptase (RT) in cDNA „re-transkribiert“ und durch PCR amplifiziert (RT-PCR).

Standardprotokoll

- Reagenzien

10 x PCR-Puffer (mit dNTPs)

KCl	500 mM
Tris pH 8,0	100 mM
MgCl ₂	15 mM
dATP, dCTP, dGTP, dTTP	je 2 mM

Taq-DNA-Polymerase (5 U/μl, Boehringer)

Für RT-PCR vor Gebrauch 1 : 9 in H₂O verdünnen

M-MLV-Reverse Transkriptase (200 U/ μ l, GibcoBRL)

Vor Gebrauch 1 : 19 in H₂O verdünnen

- **Reaktionsansatz (PCR)**

10 x PCR-Puffer	5,0 μ l
Primer A (25 pmol/ μ l)	0,5 μ l
Primer B (25 pmol/ μ l)	0,5 μ l
DNA (20 ng/ μ l)	1,0 μ l
Taq DNA-Polymerase	0,5 μ l
Aqua bidestillata	ad 50,0 μ l

- **Standardbedingungen für die Amplifikation** (für DNA-Fragmente bis ca. 1 kb)

Als thermostabile Polymerase fand die Taq DNA-Polymerase (Boehringer) Verwendung. Die Durchführung der PCR erfolgte in einem Thermocycler der Firma BIOMETRA (UNO-ThermoblockTM). 10-20 ng DNA dienten als Ausgangsmaterial. Der Reaktionsansatz wurde initial für 5 min. bei 94°C denaturiert. Dann setzten insgesamt 35 Zyklen mit Denaturierung, Primeranlagerung und Polymerisation ein, wie im folgenden angegeben:

- Denaturierung (94°C für 10 sec.)
- Annealing (55°C für 30 sec.)
- Elongation (72°C für 30 sec.)

Eine finale Polymerisation bei 72°C für 5 min. schloss sich an. Zur Verifizierung des Reaktionserfolges und der Integrität des Amplifikates wurde jeweils nach Ablauf der Reaktion eine gelelektrophoretische Kontrolle durchgeführt.

- **Reaktionsansatz (RT-PCR)**

RNA (0,1 μ g/ μ l)	5,0 μ l
Primer A (25 pmol/ μ l)	0,5 μ l
Primer B (25 pmol/ μ l)	0,5 μ l
10 x PCR-Puffer (mit dNTPs)	5,0 μ l
H ₂ O	34 μ l

Reverse Transkription

Denaturierung: 94°C, 5 min.

Langsam auf 50°C abkühlen (von 94°C auf 50°C in 10 min.; 0,07°C/sec)

5 µl M-MLV-RT (10 U/µl) zugeben

50°C, 20 min.

5 µl Taq-Polymerase (0,5 U/µl) zugeben

- **Amplifikation** (Bedingungen wie für die PCR, siehe oben)

2.9 Transformation von Bakterien

2.9.1 Präparation elektrokompenter Bakterienzellen

Als kompetente Zellen werden bakterielle Zellen bezeichnet, die befähigt sind, exogene DNA zu inkorporieren. Für die unter 2.9.2 erläuterte Prozedur wurde im Rahmen dieser Arbeit ausschließlich *E. coli* XL1-Blue verwendet. Die Präparation geeigneter Zellen erfolgte wie im folgenden beschrieben unter sterilen Bedingungen (Gefäße und Lösungen wurden autoklaviert); die Zellen müssen bei 4°C gewaschen werden. Außerdem sollten sie zwischen den Zentrifugationen stets auf Eis gelagert werden:

4 x 500 ml LB-Medium wurde mit jeweils 5 ml einer frischen über Nacht-Kultur angeimpft und bei idealer Wachstumstemperatur (37°C) unter Schütteln (225 rpm) inkubiert. Nach Erreichen einer OD₆₅₀ von 0,5 bis 0,6 (nach etwa 2-6 Stunden) wurden die Zellen durch Zentrifugation (5000 x g; 10 min.; 4°C) geerntet. Im Anschluß daran wurden die Zellen je zweimal mit 500 ml H₂O und zweimal mit 10% Glycerol gewaschen und jeweils 10 min. lang bei 5000 x g und 4°C pelletiert. Die so gewaschenen Zellen wurden in geringen Volumina 10% Glycerol (2 ml pro Liter Kultur) resuspendiert und in Aliquots von 200 µl bis 500 µl bei -80°C gelagert.

2.9.2 Transformation von *E. coli* mittels Elektroporation

Die Einschleusung von DNA in Bakterienzellen bezeichnet man als Transformation. Bei adäquatem Selektionsdruck, der sich durch Zugabe von Antibiotika zu den Nährmedien

erzielen läßt, wird ein in die Zelle geschleustes Plasmid stabil an die Tochtergeneration weitergegeben.

Durch einen kurzen Hochspannungsimpuls (Elektroporation) kann eine transiente Perforation der Zellhülle erreicht werden, die eine Aufnahme von Plasmid-DNA in die Zelle ermöglicht.

DNA-Lösungen mit hohem Salzgehalt (z.B. Ligationsansätze) müssen vor der Elektroporation einer 20-minütigen Tropfendialyse (Dialysemembran der Porengröße 0,025 µm, Millipore) gegen Aqua bidestillata unterzogen werden. Nach dem Auftauen der aliquotierten elektrokompenten *E. coli*-Zellen auf Eis wurde die salzfreie DNA-Lösung zugegeben, der Ansatz vorsichtig gemischt und circa 15 min. auf Eis inkubiert. Im Anschluß daran wurde die DNA-Zellsuspension luftblasenfrei in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette überführt, die Küvette sorgfältig getrocknet und rasch in die Halterung des Elektroporationsgerätes (Gene Pulser™, BIO-RAD) plziert. Nach Anlegen einer elektrischen Spannung (2,5 kV, Gene Pulser 25 mF, Pulse Controller 200 Ω) wurde die Zeitspanne bis zur Entladung verifiziert; sie liegt für *E. coli* bei 4,5 bis 5,0 msec. Im Anschluß an eine einstündige Erholungsphase in LB-Medium bei 37°C und 225 rpm wurden jeweils 50-200 µl der Bakteriensuspension auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Die erhaltenen Klone konnten auf die Anwesenheit des rekombinanten Plasmids hin überprüft werden, indem aus ausgewählten Klonen die postulierten Plasmide isoliert und gereinigt wurden; nach restriktionsenzymatisch vermittelter Linearisierung konnte deren Länge dann gelelektrophoretisch verifiziert werden.

2.10 Organpräparation für die In-situ-Hybridisierung

Sämtliche für die In-situ-Hybridisierung verwendeten Gehirne stammten von männlichen und weiblichen C57/B16-Mäusen. Die Tötung erfolgte durch craniocervicale Dislokation. Nach rascher Entnahme der Organe wurden diese in Isopentan, das in einer Trockeneis-Ethanol-Mischung gekühlt war, zügig eingefroren und bei -80°C gelagert. Mit Hilfe eines Kryotoms (Leica, Jung CM 3000) wurden später bei einer Temperatur von -20°C 16 µm dicke Gewebeschnitte angefertigt und auf einen Polylysin-

beschichteten Objektträger (Polylysin, Menzel Gläser) aufgebracht. Nach zwanzigminütigem Fixieren in 4%iger Paraformaldehydlösung und Dehydratation in einer aufsteigenden Ethanolreihe konnten die Schnitte in 95% Ethanol bei 4°C bis zur weiteren Verarbeitung (siehe 2.11.2) gelagert werden.

2.11 In-situ-Hybridisierung

Die In-situ-Hybridisierung bezeichnet ein molekularbiologisches Verfahren der Nukleinsäuren-Hybridisierung, welches direkt an einem Gewebeschnitt Anwendung findet, um Messenger-RNA Moleküle im Gewebe („*in situ*“) nachzuweisen und zu lokalisieren.

Hierfür wurde eine 122-362 bp lange DNA-Sequenz, deren Transkript einem Abschnitt der zu detektierenden mRNA entspricht, in einen Transkriptionsvektor (pAL1) kloniert. Nach Linearisierung des Plasmids unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *Bam*HI bzw. *Asp*718 wird mittels DNA-abhängiger RNA-Polymerasen nach spezifischer Bindung an den jeweiligen Promotor cRNA synthetisiert. Je nach Orientierung resultiert dabei der „Antisense“-Gegenstrang, der komplementär zur Boten-RNA ist, oder der „Sense“-cRNA-Einzelstrang mit identischer Nukleotidsequenz wie die mRNA. Durch Einbau von $\alpha^{35}\text{S}$ -UTP gelingt die radioaktive Markierung der RNA-Gensonden. Nach der Applikation entsprechend markierter Gensonden auf vorbehandelte Gewebeschnitte kommt es zur Formation eines stabilen mRNA/cRNA-Hybrids aus „Antisense“-Sonde einerseits und der Boten-RNA im Gewebe andererseits. Durch Zugabe von RNase A wird einzelsträngige, nicht spezifisch gebundene RNA enzymatisch abgebaut; dies gilt jedoch nicht für das doppelsträngige Hybrid. Die Visualisierung der Hybridisierung wird durch Autoradiographie erreicht.

Verwendete Lösungen**10 x PBS**

NaCl	80 g
KCl	2 g
Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei)	6,2 g
KH ₂ PO ₄	2 g
H ₂ O	ad 1000 ml

0,5 M EDTA pH 8,0

Na ₂ EDTA*2 H ₂ O	186,1 g
H ₂ O	ad 1000 ml
mit 5 M NaOH auf pH 8,0 einstellen	

5 x RNase A-Puffer

5 M NaCl	250 ml
1 M Tris pH 8,0	25 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	5 ml
H ₂ O	ad 500 ml

1 M TRIS

Tris-Base	121 g
H ₂ O	ad 1000 ml
pH mit HCl _{conc} auf 8,0 bzw. 7,5 einstellen.	

5 x Protease-Puffer

1 M Tris pH 8,0	250 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	25 ml
H ₂ O	ad 500 ml

3 M Natriumacetat pH 5,2

NaAcetat*3 H ₂ O	40,8 g
H ₂ O	ad 100 ml
mit Eisessig auf pH 5,2 einstellen.	

Alle oben genannten Lösungen wurden RNase-frei hergestellt und durch Autoklavieren sterilisiert.

1 M DTT

Dithiothreitol (ICN)	1,5 g
3M NaAcetat pH 5,2	33 µl
H ₂ O	ad 10 ml

sterilfiltrieren und aliquotiert bei -20°C lagern.

Box-Puffer

Formamid	50 ml
20 x SSC	20 ml
H ₂ O	ad 100 ml

50 % Dextran

Dextransulfat (MG=5x10⁵) 12,5 g
 H₂O ca. 12 ml
 3 h bei 68°C lösen
 H₂O ad 25 ml
 bei -20°C lagern

4 % PFA

Paraformaldehyd 6 g
 10 x PBS 15 ml
 H₂O ad 150 ml
 bei 60°C lösen, auf 4°C abkühlen,
 frisch zubereiten

Formamid (deionisiert)

Ionenaustauscherharz (Biorad) ca. 5 g
 Formamid ca. 45 ml
 bei 4°C lagern

H₂O_{DMPC}

Dimethylpyrocarbonat (DMPC) 1,0 g
 Aqua bidestillata ad 1000 ml
 über Nacht rühren, danach durch Auto-
 klavieren Reste von DMPC entfernen.

2.11.1 In-vitro-Transkription

Für die Herstellung der cRNA-Gensonden wurden in zwei getrennten Ansätzen jeweils etwa 12 µg der entsprechenden Plasmid-DNA mit *Bam*HI und *Asp*718 linearisiert und nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation in 11 µl H₂O_{DMPC} gelöst und bei -20° C gelagert. Zur Kontrolle der Integrität der DNA-Matrize und zum Ausschluß von evtl. enzymatischen Verunreinigungen wurde die In-vitro-Transkription mit jeder Sonde einmal ohne Zusatz des radioaktiv markierten Nukleotids, d.h. „kalt“, durchgeführt und die RNA-Produkte gelelektrophoretisch untersucht. Die T7-RNA-Polymerase bindet dabei an ihren spezifischen Promotor und synthetisiert einen RNA-Strang, dessen Nucleotidsequenz komplementär zur entsprechenden mRNA ist („Antisense“-Sonde). Die T3-RNA-Polymerase hingegen synthetisiert den Gegenstrang, der nicht komplementär, sondern identisch mit der Nucleotidsequenz der Boten-RNA ist („Sense“-Sonde). Im Anschluß an die In-vitro-Transkription unter Verwendung des Radionuklids $\alpha^{35}\text{S}$ -UTP erfolgte der enzymatische Abbau der DNA-Matrize durch Zugabe von DNase; der Ansatz wurde chromatographisch (NickTM Column, Pharmacia) aufgetrennt. Von den Fraktionen 1 bis 5 wurden jeweils 5 µl in ein Reaktionsgefäß überführt, 5 ml Szintillationsflüssigkeit zugegeben und die Aktivität im Szintillationszähler

gemessen; Fraktion 2 enthielt dabei die radioaktiv markierte Gensonde, die in Hybridisierungslösung auf eine Konzentration von 1×10^7 dpm/ml verdünnt wurde. Das notwendige Endvolumen der Hybridisierungslösung wurde wie folgt berechnet:

$$\text{ml (Hybr.-Lösung)} = \frac{390 \mu\text{l (Probenvolumen)} \times \text{cpm}/\mu\text{l (gemessene Aktivität)} \times 1,4 \text{ dpm/cpm (Effizienzfaktor)}}{1 \times 10^7 \text{ dpm/ml (gewünschte Konzentration)}}$$

RNase-freie Transfer-RNA (Roche) wurde zur Reduktion der Anzahl unspezifischer Bindungen und damit zur Suppression von Hintergrundsignal zugegeben. Dithiothreitol (DTT) diente als Antioxidans der Stabilisierung von Schwefel-35 ($\alpha^{35}\text{S}$).

Bei postulierten 8 ml Gesamtvolumen der Hybridisierungslösung ergeben sich folgende Einzelvolumina:

		finale Konzentration
tRNA (50 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	80 μl	0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
1 M DTT	80 μl	10 mM
1,25 x Hybr.-Puffer	6,4 ml	1 x
$\alpha^{35}\text{S}$ -Probe	390 μl	1×10^7 dpm/ml
H ₂ O (DMPC)	ad 8 ml	

2.11.2 Protokoll für die In-situ-Hybridisierung

Das Protokoll für die In-situ-Hybridisierung wurde in modifizierter Form von Simmons et al. (1989) übernommen.

- getrocknete, fixierte Gewebeschnitte wurden für 15 min. mit 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K in 1 x Proteasepuffer vorbehandelt.
- Waschen: 5 min. in 0,5 x SSC
- Zur Vermeidung unspezifischer Bindungen der Sonde an den Schnitten wurde das Gewebe acetyliert:

- 3-minütige Inkubation in 0,1 M TEA (Triethylammoniumacetat) pH 8,0
- 10 min. in 0,25%iger Acetanhydridlösung (in 0,1 M TEA)
- 2 Waschschrirte: je 2 min. in 2 x SSC
- Entwässerung der Schnitte:
 - je 3 min. in 50%, 70%, 95%, 100 %Ethanol
 - Lufttrocknung 5 min.
 - Vakuumtrocknung 30 min. (SpeedVac)
- Prähybridisierung:

Die Objektträger (OT) wurden in einer dicht verschließbaren Kammer horizontal auf einem Gitter plaziert und die Gewebeschnitte gleichmäßig mit der viskösen Prähybridisierungslösung, bestehend aus 8 Teilen 1,25 x Hybridisierungspuffer, 1 Teil 1 M DTT und 1 Teil Wasser, bedeckt. Um ein feuchtes Milieu in der Box aufrechtzuerhalten und damit ein Antrocknen der Hybridisierungslösung zu verhindern, wurde der Kammerboden mit saugfähigem Papier (Whatman) ausgekleidet und mit Box-Puffer getränkt. Die Prähybridisierung erfolgte für zwei Stunden bei 42°C (im Hybaid-Ofen).
- Hybridisierung:

Sense- und Antisense-Sonde (Konzentration der radioaktiv markierten Gensonde: 1×10^7 dpm/ml) wurden 10 min. lang im 65°C-Wasserbad erhitzt und nach Zugabe von 80 µl DTT zu 920 µl Probenlösung zentrifugiert (2 min., 2000 rpm). Anschließend wurden 30 bis 100 µl Sense- bzw. Antisense-Sonde auf die prähybridisierten Schnitte pipettiert; danach erfolgte eine Inkubation von etwa 16 Stunden bei 55°C (Hybaid-Ofen).
- Entfernen nicht-hybridisierter Sonde

Die OT wurden am Folgetag durch mehrere Waschschrirte von unspezifisch gebundener Sonde befreit. Zur Stabilisierung des im RNA/RNA-Hybrid gebundenen Schwefel-35 enthielten die Waschlösungen 1 mM DTT sowie 1 mM EDTA pH 8,0. Die mit Sense- bzw. Antisense-Sonde hybridisierten Schnitte wurden jeweils gleich behandelt:

- 2 Waschschrirte: je 10 min. in 2 x SSC
- RNase A-Verdau: 30 min. in 20 µg/µl RNase A in 1 x RNase A-Puffer; RNase A baut spezifisch einzelsträngige RNA ab, RNA/RNA-Hybride werden nicht verdaut.
- 2 Waschschrirte: je 10 min. in 2 x SSC
- 2 Waschschrirte: je 1 Stunde in 0,1 x SSC bei 60°C bis 70°C
- 3 Waschschrirte: je 10 min. in 0,5 x SSC
- Entwässern
 - je 3 min. in 50%, 70%, 95%, 100% Ethanol
Die verdünnten Ethanollösungen enthielten jeweils 2,3% Ammoniumacetat, um das RNA/RNA-Hybrid zu stabilisieren.
 - Lufttrocknung 5 min.
 - Vakuumtrocknung 30 min.
- Autoradiographie:

Die getrockneten Objektträger wurden auf Karton aufgeklebt; im Anschluß daran wurde ein Röntgenfilm (KODAK BioMax MR) aufgelegt, der nach einer Expositionszeit von 6 bis 20 Tagen (Lagerung bei 4°C) entwickelt wurde.

2.11.3 Mikroautoradiographie mittels Filmemulsion

Der Erfolg des Hybridisierungsvorganges und das makroskopische Verteilungsmuster der RNA/RNA-Hybride konnte anhand des Röntgenfilmes visualisiert werden. Um die Lokalisation der hybridisierten mRNA jedoch auf zellulärer Ebene bestimmen zu können, war eine Mikroautoradiographie notwendig. Hierfür mußten die Objektträger, die die hybridisierten Gewebeschnitte enthielten, mit einer Filmemulsion überzogen und nach einer Expositionszeit von etwa 6-8 Wochen entwickelt werden.

- Schmelzen der Filmemulsion NTB-2 (KODAK) bei 42°C im Wasserbad
- Einzelnes Eintauchen der staubfreien Objektträger in die Emulsion und etwa 3-stündiges Trocknen (in vertikaler Position) in einem Metallständer

- Überführung der getrockneten OT in einen lichtdichten Behälter mit ausreichend Trockenmittel (Silicagel) und Lagerung für 6-8 Wochen bei 4°C.

Entwicklung der Filmemulsion:

Die Entwickler- (KODAK Developer D-19) und Fixiererlösung (KODAK Fixer) wurden vor Gebrauch filtriert und auf 15° C temperiert. Der Entwicklungsvorgang gestaltete sich wie folgt:

- Entwicklungslösung 4 min.
- H₂O 10 sec.
- Fixiererlösung 5 min.
- H₂O 5 min.

2.11.4 Histologische Färbungen

Zur Kontrastierung der mikroautoradiographischen Signale und besseren Beurteilbarkeit der Morphologie der Gewebeschnitte wurden diese nach Entwicklung der Filmemulsion histologisch gefärbt. Verwendung fand hierbei Toluidinblau, wodurch sowohl Zellkerne als auch Zytoplasma blau zur Darstellung kommen. Nach der Färbung wurden die Präparate mit DePeX-Harz (Serva) und Deckgläschen eingedeckt.

2.11.5 Mikroskopie und Photographie

Die in beschriebener Weise behandelten Gewebeschnitte wurden mit Hilfe eines Zeiss Axioskops im Hell- und Dunkelfeld untersucht. Die photographische Dokumentation von 100- und 200-fachen Vergrößerungen erfolgte mit einer Contax 167 MT-Kamera. Bei dem verwendeten Film handelt es sich um einen KODAK Farbfilm (Elite Chrome, ISO 400).

3 Ergebnisse

IRAG wurde erst in jüngster Vergangenheit als neuer Baustein der NO/cGMP-Signalkaskade beschrieben. Dabei konnte in einer Vielzahl glatter Muskelgewebe eine Kolokalisation von IRAG einerseits und der cGKI-Isoform β (cGKI β) andererseits aufgezeigt werden, wobei IRAG, cGKI β und IP₃R1 einen makromolekularen, multimeren Komplex formieren (Schlossmann et al., 2000). Offenbar phosphoryliert cGKI β das IP₃-Rezeptor-assoziierte cGKI-Substrat (IRAG) an bis zu vier Serinresten; die Phosphorylierung von Serin 696 scheint dabei eine Schlüsselrolle bei der Suppression der Ca²⁺-Freisetzung aus IP₃-sensitiven Speichern zu spielen (Ammendola et al., 2001). Weder über die Expression und Funktion von IRAG auf neuronaler Ebene noch über das Verteilungsmuster der cGKI-Isoformen α und β im ZNS lagen bislang Daten vor, so daß unter anderem die interessante Frage nach einer eventuellen Kolokalisation von cGKI β und IRAG, wie sie in glatten Muskelzellen evident ist, unbeantwortet bleiben musste. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war die Klärung dieser Sachverhalte unter Verwendung molekularbiologischer Methoden (In-situ-Hybridisierung).

3.1 Herstellung der Gensonden für die In-situ-Hybridisierung

3.1.1 Isoformspezifische Sonden für cGKI α und cGKI β

Bereits in der Vergangenheit wurde mit Hilfe der In-situ-Hybridisierungstechnik die Expression von cGKI auf neuronaler Ebene untersucht (Werner, unveröffentlicht). Hier zeigten sich besonders starke Signale in Cerebellum, Hippocampus und Bulbus olfactorius. Nachdem die damals verwendete Sonde cGKI (common) jedoch innerhalb der sog. „common region“, die für die beiden Isoformen cGKI α und cGKI β homolog ist, lokalisiert ist, ließ sich eine eventuelle Divergenz im jeweiligen Expressionsmuster der beiden Subtypen auf diese Weise nicht ermitteln. Der Vektor für die cGKI (common)-Sonde umfasste dabei 501 Basenpaare von Nukleotid (nt) 1522-2023 des cGKI-Gens (Wernet et al., 1989; Referenz: EMBL Accession Number X16086).

Um nun subtypenspezifische Gensonden herstellen zu können, wurden diejenigen (posttranskriptionell alternativ gespleißten) Abschnitte der cGKI-Exone gewählt, die konsekutiv für die unterschiedlichen N-terminalen Domänen von cGKI α und cGKI β kodieren. Die Sonden umfassen dabei jeweils die gesamte N-terminale Domäne einschließlich des Leucin-Zippers (siehe Abbildung 3.1). Die Fragmente wurden jeweils mit Hilfe der PCR-Technik amplifiziert (2.8) und in den Transkriptionsvektor pAL1 (2.2) kloniert, der einen T3- und einen T7-RNA-Polymerase-Promotor sowie Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen *Bam*HI und *Asp*718 enthält (Ludwig et al., 1997). Die 5'-Enden der für die Amplifikation verwendeten Vorwärts-(F) bzw. Rückwärts-(R) Primer (Tabelle 3.1) waren mit den Erkennungssequenzen für *Bam*HI und *Asp*718 versehen (die Nukleotidsequenzen der Primer sind dem Anhang 7.2 zu entnehmen). Über diese Schnittstellen wurden die Fragmente in den linearisierten pAL1-Vektor eingefügt (Ligation, siehe 2.5.2). Im Anschluß an eine Kontroll-Transkription ohne Radionuklid wurden $\alpha^{35}\text{S}$ -markierte mRNA-Sonden mittels In-vitro-Transkription synthetisiert (2.11.1).

Gensonde	Primer	Lokalisation der Sonde <i>Innerhalb der cGKI-mRNA (nt)</i>	Datenbankreferenz
cGKI α	MG1F MG1R	7 bis 273 (entspricht Bereich aa 1 bis 89 des Translationsproduktes)	EMBL Accession No. X16086
cGKI β	MG2F MG2R	164 bis 475 (entspricht Bereich aa 1 bis 104 des Translationsproduktes)	EMBL Accession No. X54289

Tabelle 3.1 zeigt diejenigen Primerpaare, die zur Synthese der cGKI-Gensonden Verwendung fanden (Sequenzen siehe Anhang 7.2) sowie die Lokalisation der Sonden innerhalb der relevanten cGKI-mRNA samt Datenbankreferenz.

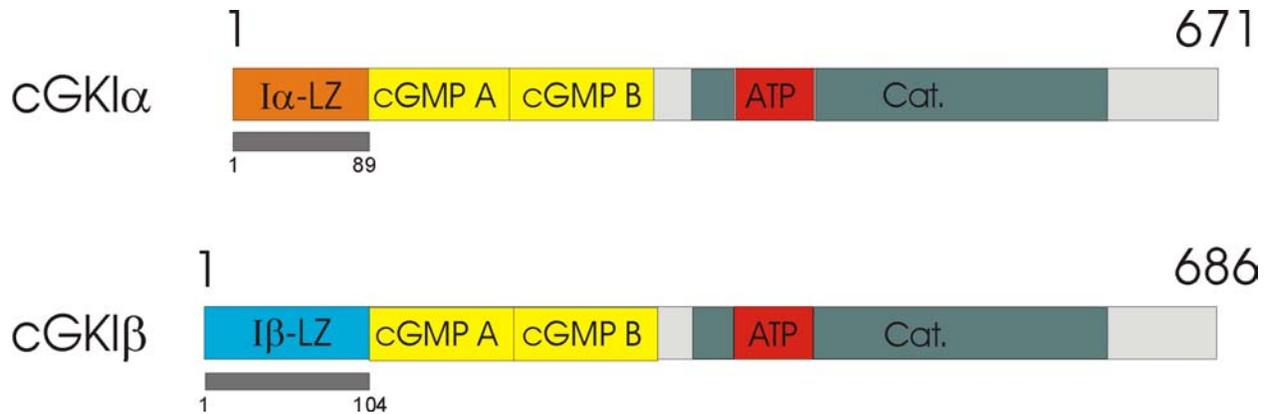


Abbildung 3.1 stellt schematisch die Lokalisation der Gensonden cGKI α und cGKI β innerhalb der isoformspezifischen cGKI-Proteinsequenz dar. Die Sonden umfassen dabei jeweils die gesamte N-terminale Domäne einschließlich des Leucin-Zippers (Alle Zahlenangaben entsprechen dabei aa, siehe auch Tabelle 3.1).

3.1.2 IRAG-Gensonden

Zum spezifischen Nachweis von IRAG-mRNA-Transkripten *in situ* wurden insgesamt drei verschiedene Gensonden konstruiert, die jeweils unterschiedliche Abschnitte des translatierten Bereiches abdecken. Die Lokalisation der Sonden ist Abbildung 3.2 zu entnehmen; die zur Amplifikation der Fragmente verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 3.2 aufgeführt. Des weiteren wurde für die Herstellung der Sonden verfahren wie unter 3.1.1 beschrieben. Die Integrität der Insertionen wurde durch Sequenzierung (2.7) beider Stränge verifiziert.

Gensonde	Primer	Lokalisation der Sonde innerhalb der IRAG-mRNA (nt)	Datenbankreferenz
IRAG#1	MG3F MG3R	550 bis 844 (entspricht Bereich aa 4 bis 101 des Translationsproduktes IRAGb)	GenBank Accession No. U63407
IRAG#2	MG4F MG4R	2136 bis 2498 (entspricht Bereich aa 531 bis 652 des Translationsproduktes IRAGb)	GenBank Accession No. U63407
IRAG#3	MG5F MG5R	2563 bis 2685 (entspricht Bereich aa 674 bis 715 des Translationsproduktes IRAGb)	GenBank Accession No. U63407

Tabelle 3.2 zeigt diejenigen Primerpaare, die zur Synthese der IRAG-Gensonden Verwendung fanden (Sequenzen siehe Anhang 7.2) sowie die Lokalisation der Sonden innerhalb der IRAG-mRNA einschließlich der Datenbankreferenz. Dabei sei darauf verwiesen, daß **Mrv1- und IRAG-mRNA der Maus in den relevanten Bereichen homolog** sind (siehe auch unter 1.5).

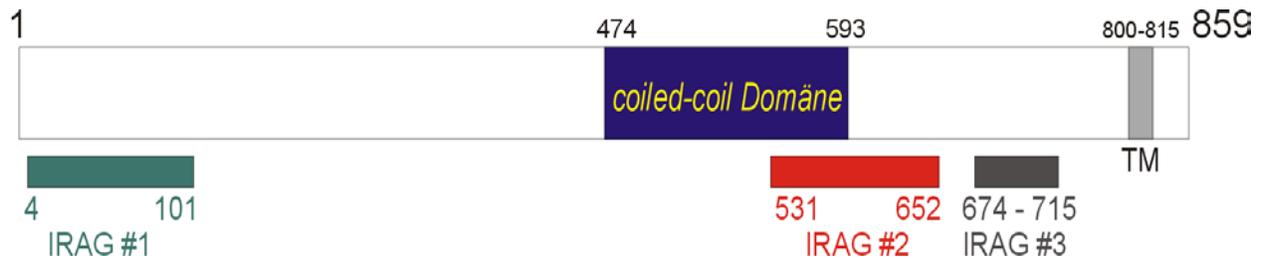


Abbildung 3.2 zeigt schematisch die Lokalisation der IRAG-Gensonden innerhalb der translatierten Region von IRAGb. TM bezeichnet die Transmembrandomäne. Alle Zahlenangaben (aa) beziehen sich auf IRAGb (siehe hierzu auch Tabelle 3.2).

3.2 Ergebnisse der In-situ-Hybridisierungsexperimente

Um die Spezifität der Hybridbildung zwischen der radioaktiv markierten cRNA-Sonde und der zu detektierenden mRNA zu validieren, wurden die Präparate stets in parallelen Ansätzen sowohl mit Antisense- als auch mit der Sensesonde behandelt. Der Nachweis der Reproduzierbarkeit der Resultate wurde dadurch erbracht, daß zur Herstellung der Gewebeschnitte die Gehirne mehrerer Mäuse präpariert und unabhängig voneinander in beschriebener Weise mit der entsprechenden Sonde hybridisiert wurden.

3.2.1 Verteilungsmuster der cGKI-Isoformen im Gehirn

Expression von cGKI α

Im Autoradiogramm zeigten sich nach In-situ-Hybridisierung mit der cGKI α -Gensonde selektiv deutliche Signale im Cerebellum (siehe Abbildung 3.3). Die Mikroautoradiographie im Anschluß an die Beschichtung der Objektträger mit Autoradiographieemulsion brachte eine Projektion des detektierten Signals auf die Purkinjezellschicht des cerebellären Cortex zu Tage (Abbildung 3.5 und 3.6). Dagegen ließ sich weder im Hippocampus noch im Bulbus olfactorius cGKI α -mRNA nachweisen (Abbildung 3.3). Diese Resultate vor dem Hintergrund des Verteilungsmusters von cGKI

(common) (Abbildung 3.4) deuten auf eine isolierte Expression der cGKI α in der Purkinjezellschicht des Cerebellums hin.

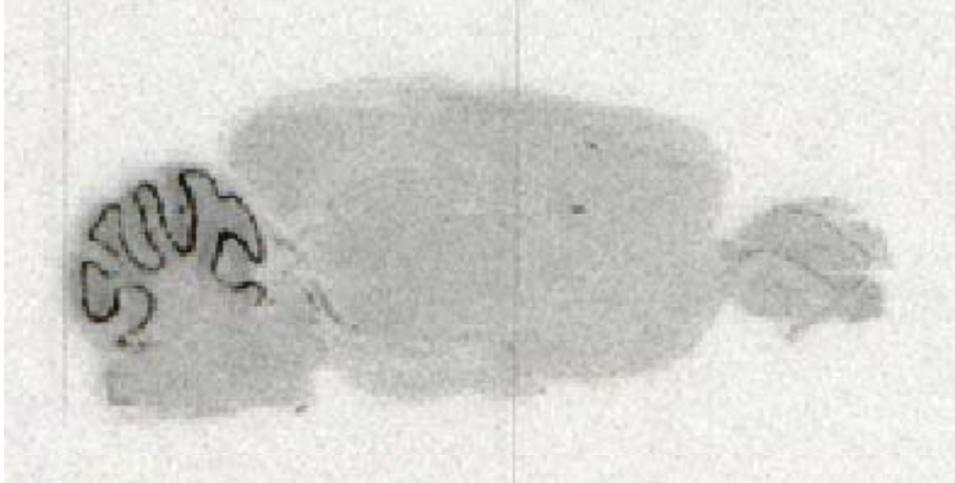
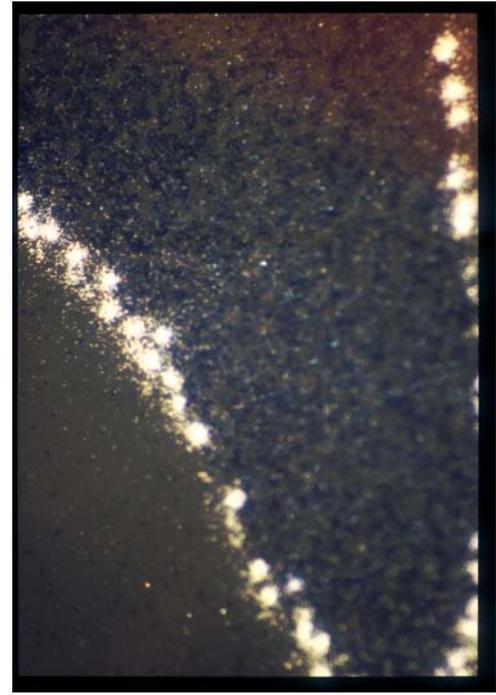


Abbildung 3.3 Bei sagittaler Schnittführung zeigen sich deutliche Signale der cGKI α -Sonde im cerebellären Cortex.



Abbildung 3.4 zeigt im Vergleich das Expressionsmuster der nicht isoformspezifischen cGKI-Sonde cGKI (common).

**Abbildung 3.5****Abbildung 3.6**

Die Abbildungen 3.5 und 3.6 verdeutlichen, daß sich die mikroautoradiographischen Signale der cGKI α -Sonde auf die Purkinjezellschicht des cerebellären Cortex projizieren (Aufnahmen im Dunkelfeld bei 100- bzw. 200-facher Vergrößerung).

Expression von cGKI β

Im Gegensatz zu cGKI α waren cGKI β -Transkripte im cerebellären Cortex nur schwach exprimiert (siehe Abbildung 3.7 -zum Vergleich ist in Abbildung 3.8 noch einmal die Signalverteilung, wie sie mit der cGKI (common)-Sonde erzielt wurde, dargestellt); auch hier konnte die Expression mittels Mikroautoradiographie weiter auf die Purkinjezellschicht eingegrenzt werden (ohne Abbildung). Deutlich war cGKI β jedoch im Hippocampus exprimiert (Abbildung 3.7). Die Expression verteilte sich dabei gleichmäßig auf die Pyramidenneurone der Regionen CA1 bis CA3 (Abbildung 3.9). Auch in der granulären Zellschicht des Gyrus dentatus, in äußeren Anteilen des Neokortex (Abbildung 3.9) und im Bulbus olfactorius (Abbildung 3.10) fanden sich deutliche Signale.

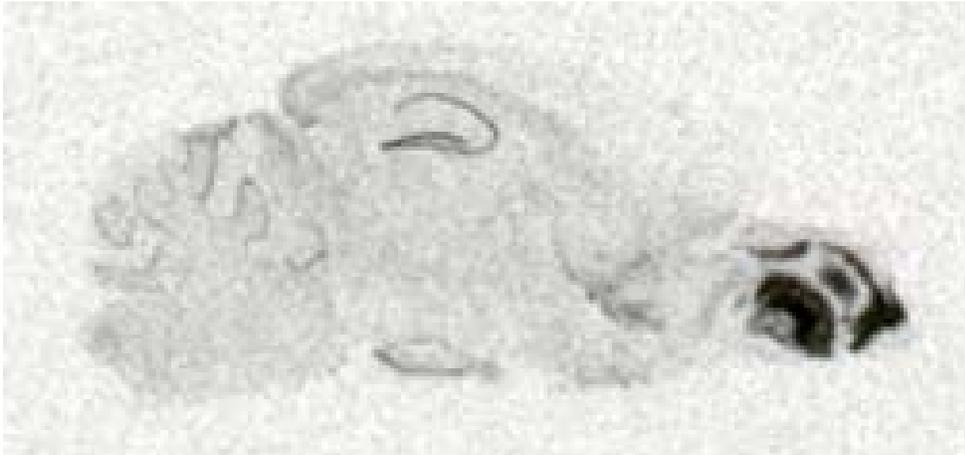


Abbildung 3.7 (isoformspezifische cGKI β -Sonde, Sagittalschnitt) zeigt hohe Signalintensität v.a. im Bereich des Hippocampus, Gyrus dentatus und Bulbus olfactorius. Details siehe Text.



Abbildung 3.8 zeigt zum Vergleich das Expressionsmuster der nicht isoform-spezifischen cGKI-Sonde cGKI (common).

**Abbildung 3.9****Abbildung 3.10**

Abbildung 3.9 erlaubt eine Eingrenzung der zellulären Expression von cGKI β auf die Ebene pyramidaler Neurone der hippocampalen Regionen CA1-CA3 sowie auf die granuläre Zellschicht des Gyrus dentatus. Außerdem sind äußere Anteile des Neokortex signalgebend. Abbildung 3.10 zeigt deutliche Signale im Bereich von Neuronen des Bulbus olfactorius (100- bzw. 200-fache Vergrößerung im Dunkelfeld).

3.2.2 Expression von cGKII

Wie im Falle der cGKI kam die In-situ-Hybridisierungstechnik auch zur Detektion des neuronalen Expressionsmusters von cGKII zur Anwendung. Dabei wurde eine von C. Werner konstruierte Gensonde (von 780 bp Länge) verwendet, die den Bereich zwischen den Nukleotiden (nt) 960 und 1740 der cGKII-mRNA umfasst (Uhler, 1993; Referenz: EMBL Accession Number L12460). Die Sonde brachte hohe Expressionsmuster im Bereich thalamischer Kerngebiete, daneben aber auch auf Ebene äußerer corticaler Schichten, des Septums, der Amygdala (Teil des limbischen Systems) und des Bulbus olfactorius zu Tage. Daneben fanden sich cGKII-Transkripte auch in verschiedenen spezifischen Kernen des Hirnstammes. Die Ergebnisse entsprechen den Resultaten, die bereits in der Vergangenheit mit dieser Sonde erzielt wurden, und kommen in Abbildung 3.11 zur Darstellung.



Abbildung 3.11 neuronales Expressionsmuster von cGKII. Es zeigen sich deutliche Signale in Thalamus, Amygdala, äußeren corticalen Schichten, Bulbus olfactorius und einzelnen Hirnstammkernen.

Die Analyse der cGKI- (unspezifisch sowie spezifisch nach den Isoformen α und β unterschieden) und der cGKII-Expression im Gehirn diente dem Vergleich des neuronalen Expressionsmusters der cGKs mit dem von IRAG.

3.2.3 Verteilungsmuster von IRAG im Gehirn

Zur Detektion des Verteilungsmusters von IRAG im Gehirn der Maus wurden frontale und sagittale Gewebeschnitte in beschriebener Weise mit den unter 3.1.2 erläuterten Gensonden IRAG#1, #2 und #3 behandelt. Um die Integrität der Prozedur zu verifizieren, kam die In-situ-Hybridisierungstechnik auch unter Verwendung der jeweiligen „sense“-Sonde in parallelen Ansätzen zur Anwendung. Hierbei zeigte sich in keinem der Fälle ein Hybridisierungssignal, so daß von der Spezifität der Sonden ausgegangen werden konnte (vergleiche Abbildung 3.12b).

Die In-situ-Hybridisierung mit den Sonden IRAG#1, #2 und #3 ergab identische, stets reproduzierbare Resultate. Autoradiographische Signale zeigten sich dabei isoliert im Thalamus (siehe Abbildungen 3.12a und 3.13). Weder im Hippocampus, noch in Cerebellum oder Bulbus olfactorius waren Signale erkennbar. In der

Mikroautoradiographie zeigte sich auf zellulärer Ebene eine Anreicherung von Silberkörnern im Bereich zahlreicher thalamokortikaler Umschaltkerne; diese waren etwas unscharf in einzelnen anterioren und v.a. in posterioren Kerngebieten des Thalamus lokalisiert (siehe Abbildungen 3.14 und 3.15). Die höchste Signalintensität zeigte sich im Bereich des Überganges zwischen Gyrus dentatus und den Nuclei laterodorsales und lateroposteriores thalami bzw. in zentraler gelegenen Abschnitten der hinteren Kerngruppe des Thalamus (Abbildung 3.15).

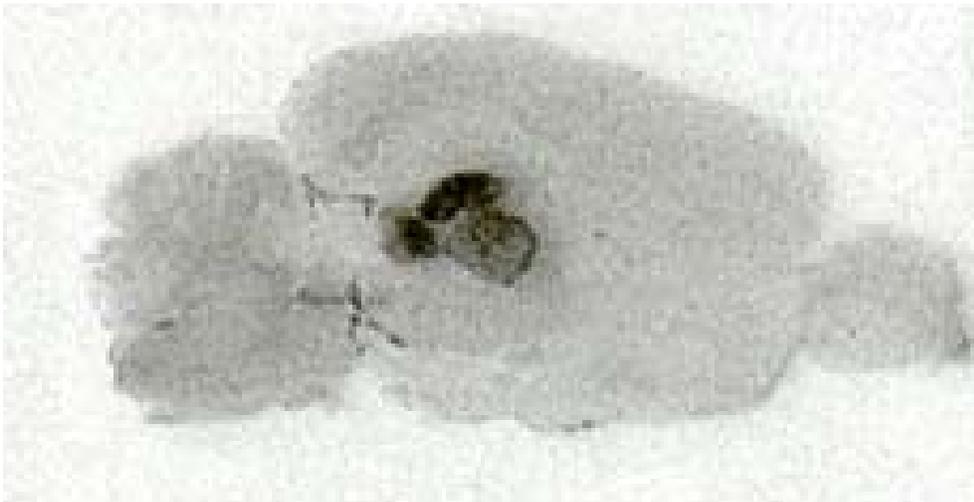


Abbildung 3.12a Sagittalschnitt IRAG, Sonde#2, Antisense; signalgebend sind diverse thalamokortikale Umschaltkerne.

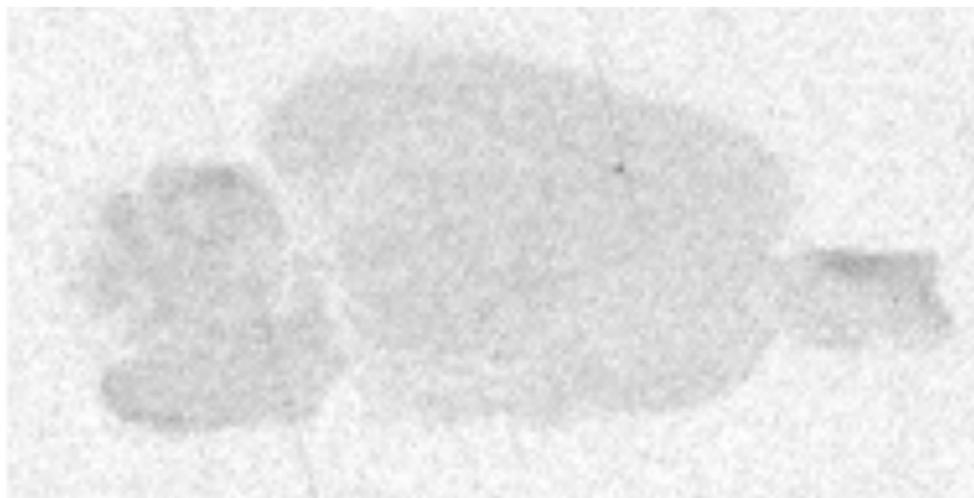


Abbildung 3.12b Sagittalschnitt IRAG, Sonde#2, Sense; kein spezifisches Signal

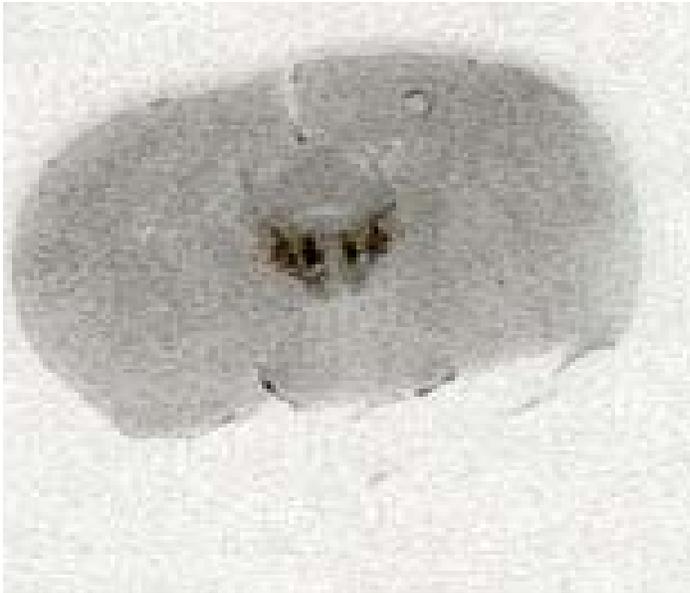


Abbildung 3.13 Frontalschnitt IRAG, Sonde#2, Antisense

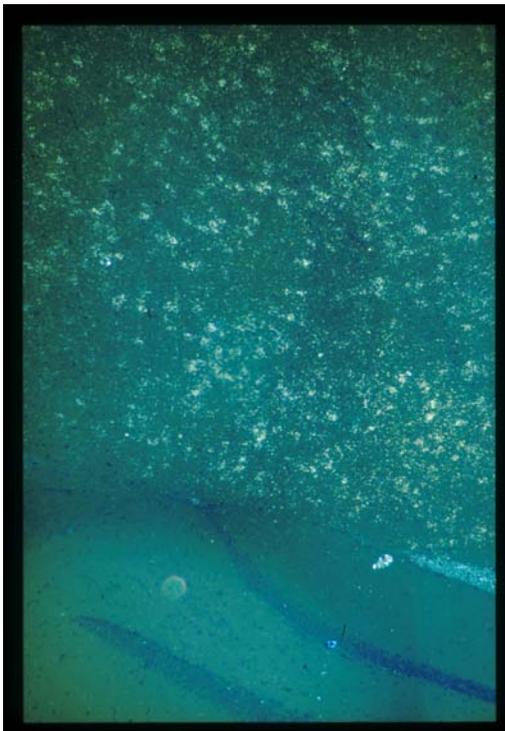


Abbildung 3.14

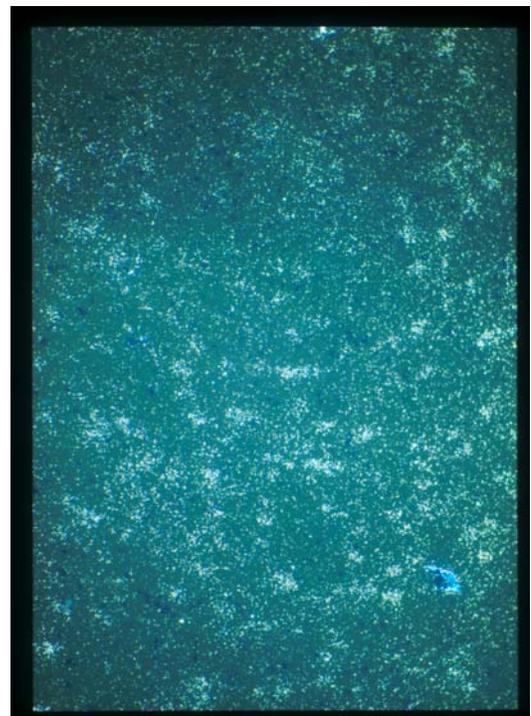


Abbildung 3.15

Die Abbildungen zeigen deutliche mikroautoradiographische Signale der IRAG#2-Sonde im Bereich des Überganges zwischen Gyrus dentatus und den Nuclei laterodorsales und lateroposteriores thalami (Abbildung 3.14) bzw. in zentraler gelegenen Abschnitten der hinteren Kerngruppe des Thalamus (Abbildung 3.15). (Aufnahmen bei 100- bzw. 200-facher Vergrößerung im Dunkelfeld)

3.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

<i>Gehirnregion</i>	<i>cGKI</i> <i>(common)</i>	<i>cGKIα</i>	<i>cGKIβ</i>	<i>cGKIII</i>	<i>IRAG</i>
Bulbus olfactorius	+++	-	+++	++	-
Cortex cerebri (Neokortex)	++	-	++	++	-
Hippocampus Pyramidenneurone in Region CA1	+++	-	+++	-	-
CA2	+++	-	+++	-	-
CA3	+++	-	+++	-	-
Gyrus dentatus (granuläre Schicht)	+++	-	+++	-	-
Amygdala	-	-	-	++	-
Thalamus	-	-	-	+++	+++
Cerebellum (Purkinjenzellschicht)	+++	+++	+	-	-

Tabelle 3.3 Expression der mRNA-Transkripte von cGKI (common), cGKI α , cGKI β , cGKI II und IRAG im Gehirn der Maus. Die Signalintensität wurde wie folgt quantifiziert:

+++ starke, ++ moderate, + geringe, - keine Expression.

Bei der In-situ-Hybridisierung mit der nicht isoformspezifischen cGKI-Gensonde (cGKI common) projizierten starke Signale auf Neurone des Bulbus olfactorius, auf Pyramidenneurone der Regionen CA1 bis CA3 des Hippocampus, die granuläre Zellschicht des Gyrus dentatus sowie auf die Purkinjenzellschicht des Cerebellums. Moderate Expression fand sich in äußeren Schichten des Neokortex, keine Expression hingegen im Thalamus.

Die für die cGKI-Isoform α spezifische Gensonde brachte deutliche Signale ausschließlich im Bereich der Purkinjzellschicht des cerebellären Cortex zu Tage. Vor dem Hintergrund des Verteilungsmusters der cGKI (common)-Sonde deutet dies auf eine isolierte Expression der cGKI α im Cerebellum hin, wohingegen die übrigen Signale der cGKI (common)-Sonde wohl der β -Isoform zuzuordnen sind. Für die Gensonde der letztgenannten Isoform ergab sich nämlich in Kongruenz zur Signalverteilung der nichtisoformspezifischen Sonde cGKI (common) starke Expression in Bulbus olfactorius, Hippocampus und Gyrus dentatus sowie moderate Expression im Neokortex; auf cerebellärer Ebene jedoch konnten nur geringe Signalintensitäten erfaßt werden.

Die Signalintensität der cGKI β -Gensonde war im Bereich thalamischer Kerngebiete am größten, gefolgt von moderater Expression in Amygdala, Bulbus olfactorius und Neokortex. Daneben zeigten sich schwächere Signale in einzelnen Hirnstammkernen; keine Signale hingegen waren in Cerebellum, Hippocampus oder Gyrus dentatus detektierbar.

Unerwartet ergab die In-situ-Hybridisierung mit jeder der insgesamt drei synthetisierten IRAG-Gensonden ausschließlich auf Ebene thalamocorticaler Umschaltkerne deutliche Signale. Expression war darüber hinaus weder für den Bulbus olfactorius, noch für Neokortex, Hippocampus, Gyrus dentatus, Amygdala oder Cerebellum evident.

4 Diskussion

Bereits Anfang der neunziger Jahre des letzten Jahrhunderts wurde postuliert, daß aktivitätsabhängige, molekulare Langzeitveränderungen synaptischer Kommunikation dem Phänomen der neuronalen Plastizität und damit komplexen Lernprozessen und Gedächtnisleistungen zugrunde liegen. Der Begriff „long-term potentiation“ (LTP) bezeichnet dabei eine positive Modulation synaptischer Übertragung bereits durch kurzzeitige, hochfrequente Stimulation des afferenten Neurons (Bliss und Collingridge, 1993); ein Prozess, an dem NO als retrograder Transmitter wohl maßgeblich beteiligt ist. Dabei soll NO Ca^{2+} -Calmodulin-abhängig unter Katalyse der nNOS im postsynaptischen Neuron synthetisiert werden und nach Diffusion in das präsynaptische Terminal zelluläre Mechanismen in Gang setzen, die LTP induzieren. Für eine solche Beteiligung von NO an diesem Phänomen spricht die Tatsache, daß LTP in der CA1-Region des Hippocampus bei Mäusen, die eine gezielte Mutation der nNOS trugen, signifikant supprimiert war (Son et al., 1996). Der Hippocampus ist Teil des limbischen Systems, das in die Regulation unbewußter vitaler Reaktionen und Verhaltensweisen eingreift und eine Schlüsselrolle bei der Integration angeborener und erlernter Verhaltensmuster spielt, letztlich also Lernen und Gedächtnis moduliert. Die Annahme, daß die cGMP/cGK-Signalkaskade als Effektor für den retrograden Transmitter NO relevant ist, basiert auf der Beobachtung, daß Inhibitoren der cGK die Induktion von LTP blockieren, während Aktivatoren der cGK einen stimulierenden Effekt haben (Zhuo et al., 1994). Abgesehen von der CA1-Region des Hippocampus scheint NO LTP auch im Gyrus dentatus zu induzieren (Wu et al., 1997). Passend dazu konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß die cGKI-Isoform β vor allem in den hippocampalen Regionen CA1 bis CA3 sowie im Gyrus dentatus stark exprimiert ist. Allerdings ist die Beteiligung von cGMP/cGK an der Induktion von LTP zumindest für die CA1-Region des Hippocampus fraglich, seit bekannt wurde, daß bei cGKI- und cGKII-Doppelknockout-Mäusen die Induktion von LTP in diesem Bereich unbeeinträchtigt blieb (Kleppisch et al., 1999). Das intrazelluläre Zielmolekül von NO scheint in beiden Fällen eher eine ADP-Ribosyl-Transferase als die sGC zu sein (Wu et al., 1998).

Ein weiteres Phänomen neuronaler Plastizität ist die „long-term depression“ (LTD). Dabei bedingt niedrigfrequente Stimulation eine Abschwächung synaptischer

Transmission (Mulkey und Malenka, 1992). Eine Sonderform der LTD wurde für das Cerebellum gezeigt. Gleichwohl über die genaue Funktion des Kleinhirns keine abschließende Klarheit besteht, wird angenommen, daß das Cerebellum entscheidend an motorischen Lernprozessen beteiligt ist. Purkinjezellen stellen den einzig bislang bekannten Ausgangspunkt efferenter Impulse aus dem cerebellären Cortex dar; sie projizieren auf tiefer gelegene Kerngebiete (Raymond et al., 1996). Exzitatorische Afferenzen über sog. Kletter- und Parallelfasern modulieren dabei die (inhibitorischen) Efferenzen aus den Purkinjezellen. Zeitgleiche Stimulation der Purkinjezellen sowohl über Kletterfasern als auch über Parallelfasern führt zu einer anhaltenden Reduktion der synaptischen Übertragung zwischen Parallelfaser und Purkinjezelle, ein Phänomen, das als cerebelläre LTD bezeichnet wird (Sakurai, 1987). NO wird in Körnerzellen, Korbzellen und Bergman'schen Gliazellen synthetisiert und von Parallelfasern freigesetzt, während die Zielmoleküle von NO innerhalb der Purkinjezellen lokalisiert sind. Das legt nahe, daß NO als anterograde Botenstoff der cerebellären LTD fungiert (Lev-Ram et al., 1995). Die Beteiligung der cGMP/cGK-Signalkaskade an diesem Phänomen wird kontrovers diskutiert. So konnte gezeigt werden, daß die Induktion der LTD in Purkinjezellen *in vitro* durch sGC- (Boxall und Garthwaite, 1996) und cGK-Inhibitoren (Lev-Ram et al., 1997) blockiert wird. Zusammen mit anderen Ergebnissen, die einzelne Effektoren des assoziierten Signaltransduktionsmechanismus auf Ebene von Purkinjezellen detektierten (Lohmann et al., 1981; Keilbach et al., 1992), deutet nicht zuletzt die im Rahmen dieser Arbeit präsentierte, starke Expression der cGKI-Isoform α in diesem Bereich auf eine mögliche Beteiligung der cGKI α an motorischen Lernprozessen hin. Im Einklang damit steht die Beobachtung, daß die cerebelläre LTD bei cGKI-defizienten Mäusen beeinträchtigt zu sein scheint (Kleppisch et al., 1999).

Auch die Induktion von LTD im Gyrus dentatus ist wohl von der Aktivierung der sGC/cGMP/cGK-Kaskade abhängig (Wu et al., 1998). Die im Rahmen der In-situ-Hybridisierungsexperimente erhaltenen, deutlichen Signale der cGKI β -Gensonde im Bereich des Gyrus dentatus könnten auf eine Beteiligung von cGKI β an diesem Phänomen hinweisen. Jedoch konnte im Gegensatz zur cerebellären LTD eine Verbindung zwischen LTD im Hippocampus und Gyrus dentatus einerseits und Lernprozessen andererseits bislang nicht hergestellt werden.

Mit Hilfe der cGKII-Gensonde konnte eine besonders starke Expression der cGKII im Thalamus aufgezeigt werden. Auch auf Ebene von Amygdala, Bulbus olfactorius und äußeren Anteilen des Neokortex waren deutliche Signale nachweisbar. NO im Thalamus stammt von afferenten Impulsen aus der Formatio reticularis des Hirnstammes. Diese Neurone in den Nuclei pedunculo-pontinus und laterodorsalis spielen eine Schlüsselrolle bei der Regulation thalamischer Aktivität (Steriade und McCarley, 1990). Die Freisetzung von NO aus diesen Afferenzen zum Thalamus hängt vom neuronalen Erregungszustand ab und ist in der Tiefschlafphase stark erniedrigt (Williams et al., 1997). In thalamischen Neuronen bedingt NO eine Erhöhung des intrazellulären cGMP-Spiegels und die konsekutive Phosphorylierung von Substratproteinen, einschließlich der Autophosphorylierung von cGKII (El-Husseini et al., 1998). Auch die Autophosphorylierung von cGKII ist während des Tiefschlafes in Übereinstimmung mit der supprimierten NO-Freisetzung reduziert; ein Hinweis darauf, daß ein direkter Zusammenhang zwischen thalamischer Aktivität und cGKII-abhängiger Proteinphosphorylierung besteht.

cGMP-abhängige Proteinkinasen (cGKs) sind neben ihrer kontroversen Rolle im ZNS in eine Vielzahl physiologischer Signaltransduktionsmechanismen involviert, die u.a. mit dem glatten Muskeltonus, der Plättchenaggregation, der Zellmotilität und -proliferation, der intestinalen Flüssigkeitssekretion, mit dem Knochenwachstum, der Reninsekretion und dem gerichteten Wachstum von Nervenfasern interferieren (Francis und Corbin, 1994; Lincoln et al., 1994; Pfeifer et al., 1999; Hofmann et al., 2000; Eigenthaler et al., 1999). Bisher wurden nur wenige Proteine identifiziert, die als Substrat der cGKs phosphoryliert werden und bei der Regulation der oben genannten Funktionen eine Rolle spielen. Zu diesen Proteinen zählen die cGMP-hydrolysierende Phosphodiesterase 5 (Wyatt et al., 1998), die große Untereinheit des maxiKCa²⁺-Kanals (Alioua et al., 1998; Fukao et al., 1999), CRP2 (Huber et al., 2000), Telokin (MacDonald et al., 2000), VASP (Butt et al., 1994), CFTR (Pfeifer et al., 1996; Vaandrager et al., 1998), das cerebelläre G-Substrat (Endo et al., 1999; Hall et al., 1999) und IRAG (Schlossmann et al., 2000). Daneben werden zusätzliche Proteine wie die Myosin-bindende Untereinheit (MBS) der Myosinphosphatase (Nakamura et al., 1999; Surks et al., 1999) oder RhoA (Sauzeau et al., 2000) als *in vivo*- Substrate der cGKI diskutiert, die den glatten Muskeltonus beeinflussen.

IRAG, erst kürzlich als neuer Baustein der NO/cGMP-Signalkaskade beschrieben, konnte in einer Vielzahl glatter Muskelgewebe nachgewiesen werden und bildet dort einen makromolekularen, multimeren Komplex mit cGKI β und IP₃R1 (Schlossmann et al., 2000). In glatten Muskelzellen phosphoryliert cGKI β IRAG an bis zu vier Serinresten, wobei die Phosphorylierung von Serin 696 wesentlich für die Suppression der Ca²⁺-Freisetzung aus IP₃-sensitiven Speichern zu sein scheint (Ammendola et al., 2001). Auf Ebene glatter Muskelzellen sind cGKI β und IRAG also kolokalisiert. Die im Rahmen der vorliegenden In-situ-Hybridisierungsexperimente detektierte Gewebsverteilung für IRAG-Transkripte war insofern unerwartet, als sich lediglich einige anteriore und vor allem posteriore Thalamuskernsignale darstellten. Die vordere Kerngruppe des Thalamus gilt als wichtige Schaltstelle zwischen Hypothalamus und limbischem System, wohingegen die Nuclei posteriores thalami funktionell als optisch-akustisches Assoziationsgebiet interpretiert werden. Weder im Hippocampus noch in Gyrus dentatus oder Bulbus olfactorius war IRAG-Expression nachweisbar, während sich gerade in diesen Hirnregionen die höchste Signalintensität für cGKI β -Transkripte fand. Auf diese Weise konnte eine Kolokalisation von cGKI β und IRAG, wie sie in glatten Muskelzellen evident ist, auf neuronaler Ebene nicht etabliert werden.

Wie durch den Vergleich der Verteilungsmuster von cGKI β und IRAG ersichtlich, findet sich in beiden Fällen Expression im Bereich thalamokortikaler Umschaltkerne, wobei das Expressionsmuster zumindest teilweise überlappt. Ob und inwiefern hiermit funktionelle Implikationen verbunden sind, ist unklar und bedarf weiterer Klärung. Offenbar findet eine direkte Interaktion jedoch lediglich zwischen IRAG und der aminoterminalen Region von cGKI β , die den Leucin-Zipper enthält, statt (Ammendola et al., 2001).

Das im Rahmen dieser Arbeit aufgezeigte neuronale Verteilungsmuster von IRAG ist auch insofern unerwartet, als das IRAG-Homolog *Mrvi1*, ein potentiell Tumorsuppressorgen, das an der Entstehung myeloischer Leukämien beteiligt ist, mittels In-situ-Hybridisierung im Bereich verschiedener motorischer Kerngebiete und im Hippocampus detektiert wurde (Shaughnessy et al., 1999). Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu dem in dieser Arbeit präsentierten neuronalen Expressionsmuster von IRAG. In mehreren, voneinander unabhängigen Ansätzen mit insgesamt drei

verschiedenen, jeweils im translatierten Bereich lokalisierten Gensonden konnte das beschriebene Verteilungsmuster jedoch stets konstant reproduziert werden.

Zum jetzigen Zeitpunkt kann über die funktionelle Rolle von IRAG im ZNS keine Aussage getroffen werden. Ein vielversprechender Ansatz, der einen wertvollen Beitrag zur Klärung dieser komplexen Frage leisten könnte, ist die Schaffung einer IRAG-defizienten Mauslinie.

5 Zusammenfassung

Dem gasförmigen Signalmolekül Stickstoffmonoxid (NO) kommt im zentralen Nervensystem (ZNS) eine Schlüsselrolle bei der Modulation aktivitätsabhängiger, molekularer Langzeitveränderungen der synaptischen Übertragung (LTP; LTD) zu. Solch anhaltende Alterationen der synaptischen Transmission gelten als Grundlage der neuronalen Plastizität und damit so komplexer Phänomene wie Lernen und Gedächtnis. Anatomisch sind Strukturen des limbischen Systems, so z.B. Hippocampus oder Gyrus dentatus, topographisch wie funktionell mit diesen Phänomenen verknüpft. Die molekulare Beteiligung der sGC/cGMP/cGK-Kaskade an den involvierten Signaltransduktionsmechanismen wurde in der Vergangenheit vielfach kontrovers diskutiert. Die funktionelle Rolle der cGKs im ZNS ist bislang noch nicht eindeutig geklärt. Neuere Erkenntnisse deuten darauf hin, daß neben der fraglichen Beteiligung der cGKs an der Induktion von LTP bzw. LTD ein direkter Zusammenhang zwischen der Aktivität des Thalamus und cGKII-abhängiger Proteinphosphorylierung besteht.

Ob und inwiefern IRAG, das erst in jüngster Zeit als Baustein der NO/cGMP-Signalkaskade in glatten Muskelgeweben beschrieben wurde, in diesem Kontext eine Rolle spielt, war bislang ungeklärt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression der cGKs auf neuronaler Ebene mit der von IRAG im Hinblick auf eine eventuelle Kongruenz des Verteilungsmusters verglichen. Im Mittelpunkt standen dabei In-situ-Hybridisierungsstudien am Gehirn der Maus. Erstmals wurden zur Analyse der Lokalisation der cGKI-Isoformen α und β isoformspezifische Gensonden verwendet. Die Untersuchungen zeigten eine isolierte Expression der cGKI α im cerebellären Cortex; cGKI β hingegen war in Strukturen des limbischen Systems, v.a. in Hippocampus und Gyrus dentatus, hoch exprimiert. cGKII-Transkripte konnten u.a. deutlich im Thalamus detektiert werden.

IRAG-Expression war isoliert auf einzelne thalamische Kerngebiete beschränkt, so daß sich eine Kolokalisation von cGKI β und IRAG, wie sie in glatten Muskelzellen evident ist, auf neuronaler Ebene nicht etablieren ließ.

6 Literaturverzeichnis

Albina, J. E., und Reichner, J. S. (1995). Nitric oxide in inflammation and immunity. *New Horiz* **3**, 46-64.

Alioua, A., Tanaka, Y., Wallner, M., Hofmann, F., Ruth, P., Meera, P., und Toro, L. (1998). The large conductance, voltage-dependent, and calcium-sensitive K⁺ channel, Hslo, is a target of cGMP-dependent protein kinase phosphorylation in vivo. *J Biol Chem* **273**, 32950-6.

Ammendola, A., Geiselhöringer, A., Hofmann, F., und Schlossmann J. (2001). Molecular Determinants of the Interaction between the Inositol 1,4,5-Trisphosphat Receptor-associated cGMP Kinase Substrate (IRAG) and cGMP Kinase I β . *J Biol Chem* **276**, 24153-24159.

Aszodi, A., Pfeifer, A., Ahmad, M., Glauner, M., Zhou, X. H., Ny, L., Andersson, K. E., Kehrel, B., Offermanns, S., und Fassler, R. (1999). The vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) is involved in cGMP- and cAMP-mediated inhibition of agonist-induced platelet aggregation, but is dispensable for smooth muscle function. *Embo J* **18**, 37-48.

Azuma, H., Ishikawa, M., und Sekizaki, S. (1986). Endothelium-dependent inhibition of platelet aggregation. *Br J Pharmacol* **88**, 411-5.

Behrens, T. W., Jagadeesh, J., Scherle, P., Kearns, G., Yewdell, J., und Staudt, L. M. (1994). Jaw1, A lymphoid-restricted membrane protein localized to the endoplasmic reticulum. *J Immunol* **153**, 682-90.

Bliss, T. V., und Collingridge, G. L. (1993). A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature* **361**, 31-9.

Boxall, A. R., und Garthwaite, J. (1996). Long-term depression in rat cerebellum requires both NO synthase and NO- sensitive guanylyl cyclase. *Eur J Neurosci* **8**, 2209-12.

Bredt, D. S., Hwang, P. M., und Snyder, S. H. (1990). Localization of nitric oxide synthase indicating a neural role for nitric oxide. *Nature* **347**, 768-70.

Browning, D. D., McShane, M. P., Marty, C., und Ye, R. D. (2000). Nitric oxide activation of p38 mitogen-activated protein kinase in 293T fibroblasts requires cGMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **275**, 2811-6.

Bult, H., Boeckxstaens, G. E., Pelckmans, P. A., Jordaens, F. H., Van Maercke, Y. M., und Herman, A. G. (1990). Nitric oxide as an inhibitory non-adrenergic non-cholinergic neurotransmitter. *Nature* **345**, 346-7.

Burnstock, G., Campbell, G., Satchell, D., und Smythe, A. (1970). Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut. *Br J Pharmacol* **40**, 668-88.

Butt, E., Abel, K., Krieger, M., Palm, D., Hoppe, V., Hoppe, J., und Walter, U. (1994). cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol Chem* **269**, 14509-17.

Calderone, A., Thaik, C. M., Takahashi, N., Chang, D. L., und Colucci, W. S. (1998). Nitric oxide, atrial natriuretic peptide, and cyclic GMP inhibit the growth-promoting effects of norepinephrine in cardiac myocytes and fibroblasts. *J Clin Invest* **101**, 812-8.

Chinkers, M., Garbers, D. L., Chang, M. S., Lowe, D. G., Chin, H. M., Goeddel, D. V., und Schulz, S. (1989). A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature* **338**, 78-83.

Crane, B. R., Arvai, A. S., Ghosh, D. K., Wu, C., Getzoff, E. D., Stuehr, D. J., und Tainer, J. A. (1998). Structure of nitric oxide synthase oxygenase dimer with pterin and substrate. *Science* **279**, 2121-6.

Eigenthaler, M., Lohmann, S. M., Walter, U., und Pilz, R. B. (1999). Signal transduction by cGMP-dependent protein kinases and their emerging roles in the regulation of cell adhesion and gene expression. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **135**, 173-209.

El-Husseini, A. E., Bladen, C., und Vincent, S. R. (1995). Molecular characterization of a type II cyclic GMP-dependent protein kinase expressed in the rat brain. *J Neurochem* **64**, 2814-7.

El-Husseini, A. E., Bladen, C., Williams, J. A., Reiner, P. B., und Vincent, S. R. (1998). Nitric oxide regulates cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylation in rat brain. *J Neurochem* **71**, 676-83.

Endo, S., Suzuki, M., Sumi, M., Nairn, A. C., Morita, R., Yamakawa, K., Greengard, P., und Ito, M. (1999). Molecular identification of human G-substrate, a possible downstream component of the cGMP-dependent protein kinase cascade in cerebellar Purkinje cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 2467-72.

Foerster, J., Harteneck, C., Malkewitz, J., Schultz, G., und Koesling, D. (1996). A functional heme-binding site of soluble guanylyl cyclase requires intact N-termini of alpha 1 and beta 1 subunits. *Eur J Biochem* **240**, 380-6.

Francis, S. H., und Corbin, J. D. (1994). Progress in understanding the mechanism and function of cyclic GMP- dependent protein kinase. *Adv Pharmacol* **26**, 115-70.

Fukao, M., Mason, H. S., Britton, F. C., Kenyon, J. L., Horowitz, B., und Keef, K. D. (1999). Cyclic GMP-dependent protein kinase activates cloned BKCa channels

expressed in mammalian cells by direct phosphorylation at serine 1072. *J Biol Chem* **274**, 10927-35.

Furukawa, K., Barger, S. W., Blalock, E. M., und Mattson, M. P. (1996). Activation of K⁺ channels and suppression of neuronal activity by secreted beta-amyloid-precursor protein. *Nature* **379**, 74-8.

Gambaryan, S., Hausler, C., Markert, T., Pohler, D., Jarchau, T., Walter, U., Haase, W., Kurtz, A., und Lohmann, S. M. (1996). Expression of type II cGMP-dependent protein kinase in rat kidney is regulated by dehydration and correlated with renin gene expression. *J Clin Invest* **98**, 662-70.

Garg, U. C., und Hassid, A. (1989). Nitric oxide-generating vasodilators and 8-bromocyclic guanosine monophosphate inhibit mitogenesis and proliferation of cultured rat vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest* **83**, 1774-7.

Gerzer, R., Hofmann, F., und Schultz, G. (1981). Purification of a soluble, sodium-nitroprusside-stimulated guanylate cyclase from bovine lung. *Eur J Biochem* **116**, 479-86.

Hall, K. U., Collins, S. P., Gamm, D. M., Massa, E., DePaoli-Roach, A. A., und Uhler, M. D. (1999). Phosphorylation-dependent inhibition of protein phosphatase-1 by G-substrate. A Purkinje cell substrate of the cyclic GMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* **274**, 3485-95.

Harbrecht, B. G., und Billiar, T. R. (1995). The role of nitric oxide in Kupffer cell-hepatocyte interactions. *Shock* **3**, 79-87.

Haug, L. S., Jensen, V., Hvalby, O., Walaas, S. I., und Ostvold, A. C. (1999). Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by cyclic nucleotide-dependent kinases in vitro and in rat cerebellar slices in situ. *J Biol Chem* **274**, 7467-73.

Hauser, W., Knobloch, K. P., Eigenthaler, M., Gambaryan, S., Krenn, V., Geiger, J., Glazova, M., Rohde, E., Horak, I., Walter, U., und Zimmer, M. (1999). Megakaryocyte hyperplasia and enhanced agonist-induced platelet activation in vasodilator-stimulated phosphoprotein knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 8120-5.

Hibbs, J. B., Taintor, R. R., und Vavrin, Z. (1987). Macrophage cytotoxicity: role for L-arginine deiminase and imino nitrogen oxidation to nitrite. *Science* **235**, 473-6.

Hofmann, F., Ammendola, A., und Schlossmann, J. (2000). Rising behind NO: cGMP-dependent protein kinases. *J Cell Sci* **113**, 1671-6.

Horstrup, K., Jablonka, B., Honig-Liedl, P., Just, M., Kochsiek, K., und Walter, U. (1994). Phosphorylation of focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein at Ser157 in intact human platelets correlates with fibrinogen receptor inhibition. *Eur J Biochem* **225**, 21-27.

Huber, A., Neuhuber, W. L., Klugbauer, N., Ruth, P., und Allescher, H. D. (2000). Cysteine-rich protein 2, a novel substrate for cGMP kinase I in enteric neurons and intestinal smooth muscle. *J Biol Chem* **275**, 5504-11.

Humbert, P., Niroomand, F., Fischer, G., Mayer, B., Koesling, D., Hinsch, K. D., Gausepohl, H., Frank, R., Schultz, G., und Bohme, E. (1990). Purification of soluble guanylyl cyclase from bovine lung by a new immunoaffinity chromatographic method. *Eur J Biochem* **190**, 273-8.

Ignarro, L. J., Buga, G. M., Wood, K. S., Byrns, R. E., und Chaudhuri, G. (1987). Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 9265-9.

Ignarro, L. J., Cirino, G., Casini, A., und Napoli, C. (1999). Nitric oxide as a signaling molecule in the vascular system: an overview. *J Cardiovasc Pharmacol* **34**, 879-86.

Ignarro, L. J., Degnan, J. N., Baricos, W. H., Kadowitz, P. J., und Wolin, M. S. (1982). Activation of purified guanylate cyclase by nitric oxide requires heme. Comparison of heme-deficient, heme-reconstituted and heme-containing forms of soluble enzyme from bovine lung. *Biochim Biophys Acta* **718**, 49-59.

Keilbach, A., Ruth, P., und Hofmann, F. (1992). Detection of cGMP dependent protein kinase isozymes by specific antibodies. *Eur J Biochem* **208**, 467-73.

Kimura, K., Ito, M., Amano, M., Chihara, K., Fukata, Y., Nakafuku, M., Yamamori, B., Feng, J., Nakano, T., Okawa, K., Iwamatsu, A., und Kaibuchi, K. (1996). Regulation of myosin phosphatase by Rho and Rho-associated kinase (Rho-kinase). *Science* **273**, 245-8.

Klatt, P., Schmidt, K., und Mayer, B. (1992). Brain nitric oxide synthase is a haemoprotein. *Biochem J* **288**, 15-7.

Kleppisch, T., Pfeifer, A., Klatt, P., Ruth, P., Montkowski, A., Fassler, R., und Hofmann, F. (1999). Long-term potentiation in the hippocampal CA1 region of mice lacking cGMP-dependent kinases is normal and susceptible to inhibition of nitric oxide synthase. *J Neurosci* **19**, 48-55.

Komalavilas, P., und Lincoln, T. M. (1996). Phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor. Cyclic GMP-dependent protein kinase mediates cAMP and cGMP dependent phosphorylation in the intact rat aorta. *J Biol Chem* **271**, 21933-21938.

Komalavilas, P., Shah, P. K., Jo, H., und Lincoln, T. M. (1999). Activation of mitogen-activated protein kinase pathways by cyclic GMP and cyclic GMP-dependent protein kinase in contractile vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem* **274**, 34301-9.

Lane, P., und Gross, S. S. (2000). The autoinhibitory control element and calmodulin conspire to provide physiological modulation of endothelial and neuronal nitric oxide synthase activity. *Acta Physiol Scand* **168**, 53-63

Lev-Ram, V., Jiang, T., Wood, J., Lawrence, D. S., und Tsien, R. Y. (1997). Synergies and coincidence requirements between NO, cGMP, and Ca²⁺ in the induction of cerebellar long-term depression. *Neuron* **18**, 1025-38.

Lev-Ram, V., Makings, L. R., Keitz, P. F., Kao, J. P., und Tsien, R. Y. (1995). Long-term depression in cerebellar Purkinje neurons results from coincidence of nitric oxide and depolarization-induced Ca²⁺ transients. *Neuron* **15**, 407-15.

Lincoln, T. M., Komalavilas, P., und Cornwell, T. L. (1994). Pleiotropic regulation of vascular smooth muscle tone by cyclic GMP- dependent protein kinase. *Hypertension* **23**, 1141-7.

Liu, Q., und Gross, S. S. (1996). Binding sites of nitric oxide synthases. *Methods Enzymol* **268**, 311-24.

Lohmann, S. M., Vaandrager, A. B., Smolenski, A., Walter, U., und De Jonge, H. R. (1997). Distinct and specific functions of cGMP-dependent protein kinases. *Trends Biochem Sci* **22**, 307-12.

Lohmann, S. M., Walter, U., Miller, P. E., Greengard, P., und De Camilli, P. (1981). Immunohistochemical localization of cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 653-7.

Ludwig, A., Flockerzi, V., und Hofmann, F. (1997). Regional expression and cellular localization of the alpha1 and beta subunit of high voltage-activated calcium channels in rat brain. *J Neurosci* **17**, 1339-49.

MacDonald, J. A., Walker, L. A., Nakamoto, R. K., Gorenne, I., Somlyo, A. V., Somlyo, A. P., und Haystead, T. A. (2000). Phosphorylation of telokin by cyclic nucleotide kinases and the identification of in vivo phosphorylation sites in smooth muscle. *FEBS Lett* **479**, 83-8.

Markert, T., Vaandrager, A. B., Gambaryan, S., Pohler, D., Hausler, C., Walter, U., De Jonge, H. R., Jarchau, T., und Lohmann, S. M. (1995). Endogenous expression of type II cGMP-dependent protein kinase mRNA and protein in rat intestine. Implications for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Clin Invest* **96**, 822-30.

Massberg, S., Sausbier, M., Klatt, P., Bauer, M., Pfeifer, A., Siess, W., Fassler, R., Ruth, P., Krombach, F., und Hofmann, F. (1999). Increased adhesion and aggregation of platelets lacking cyclic guanosine 3',5'-monophosphate kinase I. *J Exp Med* **189**, 1255-64.

Michel, T., und Lamas, S. (1992). Molecular cloning of constitutive endothelial nitric oxide synthase: evidence for a family of related genes. *J Cardiovasc Pharmacol* **20**, S45-9.

Morbidelli, L., Chang, C. H., Douglas, J. G., Granger, H. J., Ledda, F., und Ziche, M. (1996). Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium. *Am J Physiol* **270**, H411-5.

Mulkey, R. M., und Malenka, R. C. (1992). Mechanisms underlying induction of homosynaptic long-term depression in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* **9**, 967-75.

Murad, F., Mittal, C. K., Arnold, W. P., Katsuki, S., und Kimura, H. (1978). Guanylate cyclase: activation by azide, nitro compounds, nitric oxide, and hydroxyl radical and inhibition by hemoglobin and myoglobin. *Adv Cyclic Nucleotide Res* **9**, 145-58.

Nakamura, M., Ichikawa, K., Ito, M., Yamamori, B., Okinaka, T., Isaka, N., Yoshida, Y., Fujita, S., und Nakano, T. (1999). Effects of the phosphorylation of myosin phosphatase by cyclic GMP- dependent protein kinase. *Cell Signal* **11**, 671-6.

Palmer, R. M., Ferrige, A. G., und Moncada, S. (1987). Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* **327**, 524-6.

Pfeifer, A., Aszodi, A., Seidler, U., Ruth, P., Hofmann, F., und Fassler, R. (1996). Intestinal secretory defects and dwarfism in mice lacking cGMP- dependent protein kinase II. *Science* **274**, 2082-6.

Pfeifer, A., Klatt, P., Massberg, S., Ny, L., Sausbier, M., Hirneiss, C., Wang, G. X., Korth, M., Aszodi, A., Andersson, K. E., Krombach, F., Mayerhofer, A., Ruth, P., Fassler, R., und Hofmann, F. (1998). Defective smooth muscle regulation in cGMP kinase I-deficient mice. *Embo J* **17**, 3045-51.

Pfeifer, A., Ruth, P., Dostmann, W., Sausbier, M., Klatt, P., und Hofmann, F. (1999). Structure and function of cGMP-dependent protein kinases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **135**, 105-49.

Raymond, J. L., Lisberger, S. G., und Mauk, M. D. (1996). The cerebellum: a neuronal learning machine? *Science* **272**, 1126-1131.

Russwurm, M., Behrends, S., Harteneck, C., und Koesling, D. (1998). Functional properties of a naturally occurring isoform of soluble guanylyl cyclase. *Biochem J* **335**, 125-30.

Ruth, P. (1999). Cyclic GMP-dependent protein kinases: understanding in vivo functions by gene targeting. *Pharmacol Ther* **82**, 355-72.

Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-91.

Sakurai, M. (1987). Synaptic modification of parallel fibre-Purkinje cell transmission in in vitro guinea-pig cerebellar slices. *J Physiol* **394**, 463-80.

Salerno, J. C., Harris, D. E., Irizarry, K., Patel, B., Morales, A. J., Smith, S. M., Martasek, P., Roman, L. J., Masters, B. S., Jones, C. L., Weissman, B. A., Lane, P., Liu, Q., und Gross, S. S. (1997). An autoinhibitory control element defines calcium-regulated isoforms of nitric oxide synthase. *J Biol Chem* **272**, 29769-77.

Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

Sanger, F., Nicklen, S., und Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5463-7.

Sauzeau, V., Le Jeune, H., Cario-Toumaniantz, C., Smolenski, A., Lohmann, S. M., Bertoglio, J., Chardin, P., Pacaud, P., und Loirand, G. (2000). Cyclic GMP-dependent protein kinase signaling pathway inhibits RhoA- induced Ca²⁺ sensitization of contraction in vascular smooth muscle. *J Biol Chem* **275**, 21722-9.

Schlossmann, J., Ammendola, A., Ashman, K., Zong, X., Huber, A., Neubauer, G., Wang, G. X., Allescher, H. D., Korth, M., Wilm, M., Hofmann, F., und Ruth, P. (2000). Regulation of intracellular calcium by a signalling complex of IRAG, IP3 receptor and cGMP kinase Ibeta. *Nature* **404**, 197-201.

Shaughnessy, J. D., Largaespada, D. A., Tian, E., Fletcher, C. F., Cho, B. C., Vyas, P., Jenkins, N. A., und Copeland, N. G. (1999). Mrvi1, a common MRV integration site in BXH2 myeloid leukemias, encodes a protein with homology to a lymphoid-restricted membrane protein Jaw1. *Oncogene* **18**, 2069-2084.

Simmons, D. M., Arriza, J. L., und Swanson, L.W. (1989). A complete protocol for in situ hybridization of messenger RNAs in brain and other tissues with radio-labeled single-stranded RNA probes. *J Biotech* **12(3)**, 169-181.

Son, H., Hawkins, R. D., Martin, K., Kiebler, M., Huang, P. L., Fishman, M. C., und Kandel, E. R. (1996). Long-term potentiation is reduced in mice that are doubly mutant in endothelial and neuronal nitric oxide synthase. *Cell* **87**, 1015-23.

Stone, J. R., und Marletta, M. A. (1995). Heme stoichiometry of heterodimeric soluble guanylate cyclase. *Biochemistry* **34**, 14668-74.

Suhasini, M., Li, H., Lohmann, S. M., Boss, G. R., und Pilz, R. B. (1998). Cyclic-GMP-dependent protein kinase inhibits the Ras/Mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol* **18**, 6983-94.

Surks, H. K., Mochizuki, N., Kasai, Y., Georgescu, S. P., Tang, K. M., Ito, M., Lincoln, T. M., und Mendelsohn, M. E. (1999). Regulation of myosin phosphatase by a specific interaction with cGMP- dependent protein kinase Ialpha. *Science* **286**, 1583-7.

Thompson, D. K., und Garbers, D. L. (1995). Dominant negative mutations of the guanylyl cyclase-A receptor. Extracellular domain deletion and catalytic domain point mutations. *J Biol Chem* **270**, 425-30.

Tiao, G., Rafferty, J., Ogle, C., Fischer, J. E., und Hasselgren, P. O. (1994). Detrimental effect of nitric oxide synthase inhibition during endotoxemia may be caused by high levels of tumor necrosis factor and interleukin-6. *Surgery* **116**, 332-7.

Uhler, M. D. (1993). Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain. *J Biol Chem* **268**, 13586-91.

Vaandrager, A. B., Bot, A. G., Ruth, P., Pfeifer, A., Hofmann, F., und De Jonge, H. R. (2000). Differential role of cyclic GMP-dependent protein kinase II in ion transport in murine small intestine and colon. *Gastroenterology* **118**, 108-114.

Vaandrager, A. B., Smolenski, A., Tilly, B. C., Houtsmuller, A. B., Ehlert, E. M., Bot, A. G., Edixhoven, M., Boomaars, W. E., Lohmann, S. M., und de Jonge, H. R.

(1998). Membrane targeting of cGMP-dependent protein kinase is required for cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel activation. *Proc Natl Acad*

Wagner, C., Pfeifer, A., Ruth, P., Hofmann, F., und Kurtz, A. (1998). Role of cGMP-kinase II in the control of renin secretion and renin expression. *J Clin Invest* **102**, 1576-82.

Wedel, B., Harteneck, C., Foerster, J., Friebe, A., Schultz, G., und Koesling, D. (1995). Functional domains of soluble guanylyl cyclase. *J Biol Chem* **270**, 24871-5.

Weiss, B., Thompson, A., und Richardson, C. C. (1968). Ezymatic breakage and joining of deoxyribonucleic acid. VII. Properties of the enzyme-adenylate intermediate in the polynucleotide ligase reaction. *J Biol Chem* **243**, 4556-63.

Werner, C., Sillaber, I., Spanagel, R. und Hofmann, F. (2000). Reduced ethanol sensitivity and enhanced ethanol consumption in cGMP-kinase 2 deficient mice. *N-S Archiv Pharmacol* **361**, R104.

Wernet, W., Flockerzi, V., und Hofmann, F. (1989). The cDNA of the two isoforms of bovine cGMP-dependent protein kinase. *FEBS Lett* **251**, 191-6.

White, K. A., und Marletta, M. A. (1992). Nitric oxide synthase is a cytochrome P-450 type hemoprotein. *Biochemistry* **31**, 6627-31.

Williams, J. A., Vincent, S. R., und Reiner, P. B. (1997). Nitric oxide production in rat thalamus changes with behavioral state, local depolarization, and brainstem stimulation. *J Neurosci* **17**, 420-7.

Wu, J., Wang, Y., Rowan, M. J., und Anwyl, R. (1997). Evidence for involvement of the neuronal isoform of nitric oxide synthase during induction of long-term potentiation and long-term depression in the rat dentate gyrus in vitro. *Neuroscience* **78**, 393-8.

Wu, J., Wang, Y., Rowan, M. J., und Anwyl, R. (1998). Evidence for involvement of the cGMP-protein kinase G signaling system in the induction of long-term depression, but not long-term potentiation, in the dentate gyrus in vitro. *J Neurosci* **18**, 3589-96.

Wyatt, T. A., Naftilan, A. J., Francis, S. H., und Corbin, J. D. (1998). ANF elicits phosphorylation of the cGMP phosphodiesterase in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* **274**, H448-55.

Yamada, K. (1998). [Role of nitric oxide in learning and memory processes]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* **111**, 87-96.

Zhuo, M., Hu, Y., Schultz, C., Kandel, E. R., und Hawkins, R. D. (1994). Role of guanylyl cyclase and cGMP-dependent protein kinase in long-term potentiation. *Nature* **368**, 635-9.

7 Anhang

7.1 Verwendete Abkürzungen

ATP	Adenosin-5'-triphosphat	DNA	Desoxyribonukleinsäure
BK _{Ca} ²⁺	Ca ²⁺ -aktivierter K ⁺ -Kanal	dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
bp	Basenpaar	dpm	desintegrations per minute
cAMP	zyklisches Adenosin-3'-5'-monophosphat	DTT	Dithiothreitol
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure	<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator	EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
cGK	cGMP-abhängige Proteinkinase	EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
cGMP	zyklisches Guanosin-3'-5'-monophosphat	EMBL	European Molecular Biology Laboratory
Ci	Curie (1 Ci = 3,7x10 ¹⁰ Bq)	gb	GenBank
CNG	(cyclic nucleotide gated) durch zyklische Nukleotide aktiviert	GC	Guanylylzyklase
cpm	counts per minute	IP3	Inositol 1,4,5-trisphosphat
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure	IP3R1	Inositol 1,4,5-trisphosphat-Rezeptor Typ 1
Da	Dalton	IRAG	IP3-Rezeptor-assoziiertes cGMP-Kinase-Substrat
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosid-5'-triphosphat	LB	Luria-Bertani
DMPC	Dimethylpyrocarbonat	LTD	Long-term depression

LTP	Long-term potentiation	rpm	rotations per minute
MBS	Myosin binding subunit	RT	Raumtemperatur bzw. reverse Transkriptase
MLC(K)	Myosin light chain (kinase)	sGC	lösliche Guanylylzyklase
mRNA	messenger Ribonukleinsäure	SSC	Standard Saline Citrat
NADPH	Nikotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat	STa	hitzestabiles Enterotoxin von <i>E. coli</i>
OD	Optische Dichte	TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
OT	Objektträger	TE	Tris-EDTA-Puffer
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung	TEA	Triethylammoniumacetat
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)	Tris	α, α, α -Tris-(hydroxymethyl)-methylamin
PDE	Phosphodiesterase	tRNA	Transfer-RNA
PFA	Paraformaldehyd	U	Unit, Einheit
PP1M	Myosinphosphatase (Proteinphosphatase 1)	UV	ultraviolett
RNA	Ribonukleinsäure		

7.2 Verwendete Oligonukleotide

Gensonde	Primerpaar Lokalisation (nt) und Referenz	Sequenz in 5'-3'-Richtung
cGKI α	MG1F (7-27) EMBL X16086 MG1R (253-273) EMBL X16086	5'-CGC GGA TCC ATG AGC GAG CTG GAG GAA GAC-3' 5'-CGG GGT ACC CCG CCT TTC GGA TTT GGT GAA CTT-3'
cGKI β	MG2F (164-184) EMBL X54289 MG2R (455-475) EMBL X54289	5'-CGC GGA TCC ATG GGC ACC CTG CGG GAT TTA-3' 5'-CGG GGT ACC CCG CTG TGG ACT CTT GGG GTA GAA-3'
IRAG#1	MG3F (550-569) gb U63407 MG3R (823-844) gb U63407	5'-CGC GGA TCC GCG CAT TCC TGA GGA TGA GGA GC-3' 5'-CGG GGT ACC CCG CTT GTC CTC TTC TGA GAT GCT G-3'
IRAG#2	MG4F (2136-2157) gb U63407 MG4R (2477-2498) gb U 63407	5'-CGC GGA TCC GCG ACT GCG AAC ACC GGG AGA CCT A-3' 5'-CGG GGT ACC CCG GCA GGT TCA GGG CAT TAA ACT T-3'
IRAG#3	MG5F (2563-2583) gb U63407 MG5R (2665-2685) gb U 63407	5'-CGC GGA TCC GCG GAA GAG CAG CAT CTC CGT CTC-3' 5'-CGG GGT ACC CCG CTC GTC TCC TCC AGA CAG CTT-3'

Wie der Sequenz zu entnehmen ist, enthielten die mit F bezeichneten Vorwärtsprimer jeweils eine spezifische Restriktionsschnittstelle für BamHI (5'-G/GATCC-3'), die mit R bezeichneten Rückwärtsprimer dagegen jeweils eine spezifische Erkennungssequenz für die Restriktionsendonuklease Asp718 (5'-G/GTACC-3').

8 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt all jenen, die Anteil am Entstehen und Gelingen dieser Arbeit hatten.

Herrn Prof. Dr. Franz Hofmann danke ich für die freundliche Aufnahme an seinem Institut und seine erfrischend undiplomatische Art, sich an der Lösung größerer und kleinerer systematischer Probleme zu beteiligen. Zu besonderem Dank jedoch bin ich den Herren Dres. Aldo Ammendola und Jens Schlossmann verpflichtet, die mit Interesse, konstruktiver Kritik und einem schließlich genialen Entwurf den Fortgang dieser Arbeit begleitet haben. Das stets geduldige Geleit in die Sphären der Molekularbiologie durch diese Herren wird mir in guter Erinnerung bleiben.

Sehr herzlich danken möchte ich des weiteren Frau Dr. Else Marais für ihre trotz meiner Tendenz zur Reinvencion des Rades unerschütterliche Unterstützung und hilfreiche technische Anleitung. Gleiches gilt für Dr. Claudia Werner, Dr. Andreas Ludwig und Dr. Sven Moosmang, denen ich zahlreiche konstruktive Anregungen verdanke.

Für das angenehme Arbeitsklima und die freundschaftliche Atmosphäre sei dem gesamten "Erdgeschoß" Dank und Anerkennung gezollt, besonders aber meinen Laborkollegen Angela ("GG") Geiselhöringer, Susi ("darf ich mein Mikroskop auf deinen Schreibplatz stellen") Kühbandner, Matthias ("Sausi") Sausbier und Wiebke ("wie sag ich's am gemeinsten") Wolfgruber. Meinen Mitmediziner Peter Pöschl klage ich dafür an, in einer konzertierten Aktion mit Dr. Aldo Ammendola meine (ohnehin rudimentären) fußballerischen Ambitionen umfassend vernichtet zu haben.

Mein Dank richtet sich ans gesamte Institut, einschließlich derer, die hier namentlich keine Erwähnung fanden.

Salve et valeant.