

**Aus der Neurologischen Universitätsklinik Tübingen  
Abteilung Allgemeine Neurologie  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. J. Dichgans**

Expression des *protein inhibitor of nitric oxide  
synthase* in der Retina adulter Ratten

INAUGURAL-DISSERTATION  
Zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der Medizinischen Fakultät  
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Michael Schott  
aus Bad Hersfeld

2003

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Professor. Dr. C. D. Claussen

Professor Dr. M. Bähr

Privatdozent Dr. J. B. Schulz

***AMICUS CERTUS IN RE INCERTA CERNITUR***



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Das Modell der Axotomie	1
1.2	Stickstoffmonoxid (NO) beeinflusst Signaltransduktionsprozesse und kann neurotoxisch oder neuroprotektiv im ZNS wirken	1
1.3	Signaltransduktion	2
1.3.1	Im ZNS wird das NO-Signal intrazellulär häufig durch zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) weitergeleitet	2
1.3.2	Proteinkinasen (PK) wirken in Hirngewebe und glatter Muskulatur über den NO-cGMP-Pfad	3
1.3.3	Zyklooxygenase (COX) und NO(-Produktion) beeinflussen sich wechselseitig	4
1.3.4	Andere durch NO beeinflusste Enzyme	4
1.4	Welche Rolle spielt NO in traumatisiertem neuronalen Gewebe?	5
1.4.1	Neuroprotektion durch NO	5
1.4.2	Toxische Eigenschaften von NO	6
1.5	NO Biosynthese und die Regulation der Stickstoffmonoxidsynthase (NOS)	7
1.6	Struktur und Funktion PINs: Inhibitor von nNOS und ubiquitär exprimiertes Gen - Beteiligung am Zytoskelett in <i>Drosophila melanogaster</i>	9
1.6.1	Struktur des PIN-Proteins	10
1.6.2	Struktur des PIN-Gens	10
1.6.3	Lokalisation und Funktion	12
1.6.4	Wirkmechanismen der nNOS-Inhibition	14
1.7	Aufgabenstellung und Zielsetzung	16
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>17</b>
2.1	Allgemeine Materialien	17
2.1.1	Geräte	17
2.1.2	Standardpuffer und -lösungen	17
2.1.3	Enzyme	18
2.1.4	Software zur Datenverarbeitung	18
2.1.5	Tiere	18
2.2	Methoden	19
2.2.1	Axotomie des <i>Nervus opticus</i>	19
2.2.2	Nachweis von Nukleinsäuren	20
2.2.3	Nachweis von Proteinen: <i>Western blot</i> und Immunhistochemie	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>34</b>
3.1	Nachweis von PIN-mRNS in der Retina durch in situ Hybridisierung (ISH)	34
3.2	Bestimmung der PIN-Expression mittels semiquantitativer polymerase chain reaction (PCR)	36
3.3	Quantifizierung der PIN-Expression mittels quantitativer Echtzeit polymerase chain reaction (QE-PCR)	38
3.4	Nachweis des PIN-Proteins im <i>Western blot</i>	40
3.5	Immunfluoreszenzfärbungen zum Proteinnachweis von PIN und nNOS in der Retina	41
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>43</b>
4.1	PIN als ubiquitär exprimiertes Gen und hochkonserviertes Protein	48
4.2	PIN ist an der Apoptoseregulation durch COX-2 beteiligt	51
4.3	Ausblick	54
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>55</b>

6	Verzeichnisse .....	57
6.1	Literaturverzeichnis .....	57
6.2	Abkürzungsverzeichnis .....	73
6.3	Bezugsquellenverzeichnis .....	77
7	Danksagung .....	78
8	Lebenslauf .....	79

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Modell der Axotomie

Viele neurologische Krankheiten führen zum Verlust von Neuronen. Die Transektion des *Nervus opticus* (ON) von Ratten dient als Modell, um neurodegenerative Erkrankungen, zerebrovaskuläre und traumatische Läsionen des zentralen Nervensystems (ZNS) und ihre Pathophysiologie zu untersuchen. Neben der in dieser Arbeit verwendeten Durchtrennung des ON dicht am hinteren Pol des Auges (ca. 2 mm) in der *Orbita*, der intraorbitalen Axotomie (Kermer et al., 2001), besteht auch die Möglichkeit der intrakraniellen Axotomie, die 8-9 mm vom posterioren Pol des Auges entfernt, in der Schädelhöhle durchgeführt wird. (Berkelaar et al., 1994; Rabacchi et al., 1994). Durch die Axotomie des ON von adulten Ratten sterben über 80% der retinalen Ganglienzellen (RGZn) innerhalb der ersten beiden Wochen (Villegas Perez et al., 1988; Mansour-Robaey et al., 1994). Das Zellüberleben konnte in axotomierten Retinae (ARe) durch die Konzentrationserhöhung von antiapoptotisch wirksamem BCL-2<sup>1</sup> bzw. Inhibition von proapoptotischen Cysteinproteasen (Caspasen) sowie der Gabe von Neurotrophen vorübergehend erhöht werden (Weishaupt und Bähr, 2001; Yip und So, 2000). Die intravitreale Gabe von *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) erhöhte 6 d nach Axotomie das Zellüberleben signifikant gegenüber den Kontrollen (Klöcker et al., 1998). Durch die gleichzeitige Inhibition von Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) durch N- $\omega$ -Nitro-L-Argininmethylester (L-NAME) bzw. Gabe von N-Tert-Butyl-(2-Sulfonphenyl)-Nitron (S-PBN), einem Radikalfänger, konnte das Zellüberleben der RGZn auf 55% bzw. 68% gegenüber 27% Zellüberleben bei alleiniger BDNF Verabreichung gesteigert werden (Klöcker et al., 1998).

## 1.2 Stickstoffmonoxid (NO) beeinflusst Signaltransduktionsprozesse und kann neurotoxisch oder neuroprotektiv im ZNS wirken.

NO ist ein Signalmolekül mit großer Bedeutung für das kardiovaskuläre System, das Immunsystem und das zentrale Nervensystem. Im Gehirn ist NO verantwortlich für

---

<sup>1</sup> Das Gen wurde aus einem B-Zelllymphom (*b-cell-lymphoma*) isoliert

glutamatvermittelten Anstieg der cGMP-Spiegel (Schmidt und Walter, 1994) und ist wahrscheinlich an Prozessen der Apoptose (Bonfoco et al., 1995), Synaptogenese, der neuronalen Entwicklung (Wang et al., 1995) und Langzeit-Potenzierung (*long term potentiation potentiation*; Garthwaite und Boulton, 1995) und durch Traumata verursachte Neurotoxizität beteiligt (Iadecola, 1997). Weil NO nicht wie andere Neurotransmitter in Vesikeln gespeichert werden kann, wird seine Freisetzung vor allem über die Aktivität des NO produzierenden Enzyms, NOS, reguliert.

Die gleichzeitige Aktivierung von N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren und die Bildung von NO in ischämischem Hirngewebe lässt vermuten, dass NOS an der glutamatvermittelten Exzitotoxizität beteiligt ist (Choi, 1994). Diese Hypothese wird durch Experimente bestätigt, in denen Zellen durch Inhibition der NO-Synthese gerettet wurden. Sowohl der in neuronalen Kulturen durch NMDA-Neurotoxizität als auch der an Hirngewebe durch Okklusion der *Arteria cerebri media* (OMCA) hervorgerufene Schaden wurde reduziert (Dawson et al., 1991; Nowicki et al., 1991). Zahlreiche folgende Untersuchungen am Ischämiemodell tragen dazu bei, die unterschiedlichen Reaktionen der drei Isoformen des NO-produzierenden Enzyms, NOS, deren enzymatische Aktivität und ihre Regulation sowie die dadurch hervorgerufenen Veränderungen in geschädigtem neuronalen Gewebe besser zu verstehen und einzuordnen. Die Beteiligung von NO an signalgebenden Prozessen im ZNS und die durch erhöhte NO-Konzentrationen verursachten Schäden spielen dabei eine wichtige Rolle.

### **1.3 Signaltransduktion**

1.3.1 Im ZNS wird das NO-Signal intrazellulär häufig durch zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) weitergeleitet.

In zahlreichen Hirnregionen wie Kortex, Striatum und Hippocampus führt neuronale Erregung über kalziumabhängige NO-Bildung zur Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase (Garthwaite und Boulton, 1995). In glatten Muskelzellen und Thrombozyten wird über NO-stimulierte Akkumulation von cGMP die Relaxation und Inhibition der Thrombozytenaggregation eingeleitet. Im Gegensatz zu den relativ



profunden Kenntnissen der cGMP-Wirkung an glatten Muskelzellen ist die Funktion von cGMP im ZNS noch unvollständig erforscht.

In den Fotorezeptoren der Retina wird der im Dunkeln auftretende Einstrom von  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  von cGMP-abhängigen Kanälen kontrolliert. In bipolaren Zellen der Retina konnten cGMP-kontrollierte Kanäle (Nawy und Jahr, 1990; Shiells und Falk, 1990), in RGZn mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) Transkripte dieser Kanäle nachgewiesen werden, die denen in stäbchenförmigen Fotorezeptoren ähneln (Ahmad et al., 1994). Arbeiten mit der *Patch-Clamp*-Technik an isolierten RGZn wiesen cGMP-aktivierte, unspezifische Kationenkanäle nach. Demnach wurde vermutet: RGZn werden durch NO-Bildung in benachbarten amakrinen Zellen depolarisiert (Ahmad et al., 1994).

### 1.3.2 Proteinkinasen (PK) wirken in Hirngewebe und glatter Muskulatur über den NO-cGMP-Pfad.

In glatten Muskelzellen werden die meisten Effekte von cGMP auf die Aktivierung von cGMP-abhängiger PK (cG-PK) zurückgeführt (Francis und Corbin, 1994). Neben der in Purkinjezellen gefundenen cG-PK-1, konnte cG-PK-2 im gesamten Hirngewebe von Mäusen identifiziert werden (Uhler, 1993). Obwohl noch viele Fragen bezüglich der Verteilung dieser Isoform in den verschiedenen Hirnregionen bestehen, wird die Rolle von cG-PK im Transduktionsmechanismus für den NO-cGMP-Pfad im ZNS untersucht. Ein Kandidat unter den Zielproteinen von cG-PK ist DARP-32. Dieses dopamin- und cAMP-regulierte Phosphoprotein kann in Gegenwart von NO durch die cG-PK selbst phosphoryliert werden (Tsou et al., 1993). In seiner phosphorylierten Form ist DARP-32 ein potenter Inhibitor der Proteinphosphatase 1. NO könnte durch diesen Mechanismus Rezeptorproteine im phosphorylierten Zustand halten und so indirekt die Signaltransduktion beeinflussen (Garthwaite und Boulton, 1995).

### 1.3.3 Zyklooxygenase (COX) und NO(-Produktion) beeinflussen sich wechselseitig.

Zyklooxygenase ist ein durch NO beeinflusstes Enzym, das die Synthese von Prostaglandinen (PGn), Thromboxan A<sub>2</sub> und von Prostazyklin maßgeblich bestimmt. Wie bei der löslichen Guanylylzyklase bindet NO direkt an die hämenthaltende Region von COX. In hypothalamischen Fragmenten erhöht NO die PGE-Freisetzung (Rettori et al., 1993). NO stimuliert PGE<sub>2</sub> via COX in Abhängigkeit von cGMP in Makrophagenzelllinien (Salvemini et al., 1993). Beweise für eine direkte Aktivierung von COX durch NO fehlen bisher, vermutet wurde die Inhibition einer Autoinaktivierung von COX (Smith et al., 1991). Vor kurzem erschien eine Veröffentlichung, in der auch die umgekehrte Induktion beschrieben wurde (s.u.; Chang et al., 2000).

### 1.3.4 Andere durch NO beeinflusste Enzyme

NO kann an Eisen-Schwefel-Zentren von zahlreichen Enzymen binden und so ihre Aktivität erniedrigen (Nathan, 1992). Unter ihnen befinden sich die Cis-Aconitase (Zitratzyklus), NADH-Ubiquinonoxidoreduktase (mitochondraler Komplex 1) und Succinatubiquinonoxidoreduktase (mitochondraler Komplex 2). NO kann die Ribonukleotidreduktase inhibieren und so die DNS-Synthese beeinflussen (Garthwaite und Boulton, 1995). Glyceralaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase wird durch NO-stimulierte ADP Ribosilierung inhibiert und greift so in die Glykolyse ein (Brune et al., 1994).

## **1.4 Welche Rolle spielt NO in traumatisiertem neuronalen Gewebe?**

Die Rolle NOs in traumatisiertem neuronalen Gewebe ist insbesondere am Ischämiemodell untersucht worden. Die hier vorgestellten neuroprotektiven oder – toxischen Wirkungen von NO beziehen sich, soweit nicht anders erwähnt, auf dieses Modell.

### **1.4.1 Neuroprotektion durch NO**

NO führt als potenter Vasodilatator, Inhibitor der Plättchenaggregation und Leukozytenadhäsion zu einem verbesserten postischämischen Blutfluss. Die lösliche Guanylylzyklase (s.o.) wird stimuliert, und cGMP relaxiert die glatten Muskelzellen in zerebralen Gefäßen. Ein weiterer von löslicher Guanylylzyklase unabhängiger Mechanismus, der Vasodilatation bewirkt, ist die Aktivierung kalziumabhängiger Kaliumkanäle, deren Kanalproteine wahrscheinlich nitrosiliert werden (Bolotina et al., 1994). Verbesserte Mikrovaskularisation wird durch Aktivierung der Guanylylzyklase, Inhibition der 12-Lipoxygenase und Interaktionen mit den CD11-CD18-Glykoproteinkomplexen sowie der Inhibition der Genexpression der Adhäsionsmoleküle hervorgerufen (De Caterina et al., 1995). Des Weiteren könnte NO über die Inhibition des NMDA-Rezeptors schützend wirken. Vermutet wird die Nitrosilierung von Thiolresten an der *redox modulatory site*. Die dadurch hervorgerufene Bildung von Disulfidbrücken behindert dauerhaft den Kalziumstrom durch den Kanal und könnte so zu einer reduzierten NMDA-vermittelten Neurotoxizität beitragen (Lei et al., 1992). Eine andere Hypothese geht davon aus, dass NO oder seine Derivate über eine allosterische Veränderung des NMDA-Rezeptors seine Blockade durch bivalente Ionen vereinfacht (Fagni et al., 1995). Die durch Wasserstoffperoxid auftretenden Noxen können durch NO reduziert werden (Wink et al., 1993). Unter bestimmten Umständen kann NO den negativen Effekten von Sauerstoffradikalen entgegenwirken, indem es Superoxidanionen von andern zellulären Interaktionspartnern löst (Ignarro, 1995). Durch die Reaktion mit Alkoxy- und Peroxyradikalen inhibiert NO die Fortsetzung von Kettenreaktionen der Radikale.

#### 1.4.2 Toxische Eigenschaften von NO

NO kann durch Reaktion mit Superoxidanionen Peroxynitrit bilden, einem stark schädigenden Oxidanz (Beckman et al., 1990). NO kann eine Eisenfreisetzung bewirken. Das ungebundene Eisen führt dann seinerseits über die Fentonreaktion zur Lipidperoxidation und freien Radikalbildung (Gross und Wolin, 1995). Über die oben erwähnten Enzyme Glyceraldehyd-3-Phosphatdehydrogenase, die mitochondrialen Aconitasen, kann die zelluläre Energieversorgung beeinträchtigt werden. Die ATP-Versorgung der Zellen wird ebenfalls durch die Inhibition der Kreatininkinase durch NO gestört (Gross et al., 1996). Die Hemmung der Ribonukleotidreduktase, dem geschwindigkeitslimitierenden Enzym der DNS-Synthese (Gross und Wolin, 1995) führt durch Deaminierung zur Schädigung der DNS (Nguyen et al., 1992).

**Tabelle 1: NO: Neuroprotektion versus Toxizität**

<b>NO-vermittelte Neuroprotektion</b>		
Erleichtert den Blutfluss	Limitiert Exzitotoxizität	Reduziert oxidativen Schaden
Vasodilatation	inhibiert Kalziumeinstrom am NMDA-Rezeptor durch	reagiert mit Peroxidationen, Alkoxy- und Peroxyradikale
inhibierte Plättchenaggregation	Thiolnitrosylierung	
inhibierte Leukozyten Adhäsion	NO-Metallkomplexbildung	
<b>NO-vermittelte Toxizität</b>		
Oxidative Schädigung	Gestörte Energieerzeugung	DNS-Schäden
Peroxyradikalbildung	S-Nitrosylierung und Hemmung von GAPDH und CK	Fe/Tyrosylradikal hemmen die Ribonukleotidreduktase
Eisenverlust	Fe-S Clusterbildung und Inhibition von Aconitase und den mitochondrialen Komplexen I und II	DNS-Strangbrüche
Lipidperoxidation		
CK=Kreatinkinase; DNS=Desoxyribonukleinsäure; Fe=Eisen; GAPDH=Glyceraldehydphosphatdehydrogenase; NMDA=N-Methyl-D-Aspartat; NO=Stickstoffmonoxid; S=Schwefel		

modifiziert nach Iadecola (1997) und Frey et al. (1998)

### **1.5 NO Biosynthese und die Regulation der Stickstoffmonoxidsynthase (NOS)**

Aus L-Arginin wird von NOS durch eine NADPH- und O<sub>2</sub>-abhängige Oxidation NO und Citrullin gebildet (Stuehr und Griffith, 1992). Drei Isoformen von NOS wurden bisher kloniert. Neuronale NOS (nNOS/NOS-1), immunologische oder induzierbare NOS (iNOS/NOS-2) und endotheliale NOS (eNOS/NOS-3; Griffith und Stuehr, 1995). Das dimere Enzym verfügt über eine N-terminale Oxygenasedomäne und eine C-terminale Reduktasedomäne. Der Elektronenfluss von der einen Domäne zur anderen wird durch die Bindung von Calmodulin

beeinflusst (Abu-Sou und Stuehr, 1993). Gekoppelter Elektronenfluss, also die ungehinderte Passage der Elektronen von NADPH über die durch Calmodulin verknüpften Domänen auf L-Citrullin, ist wesentlich auf die Anwesenheit von L-Arginin (Olken und Marletta, 1993; Rogers und Ignarro, 1992) als Substrat und gebundenes Calmodulin angewiesen (Abu-Soud und Stuehr, 1993; Heinzel et al., 1992). In ihrer Abwesenheit, z. Bsp. bei L-Arginin Mangel in ischämischen Neuronen, tritt als Folge eines entkoppelten Elektronentransfers die Bildung einer Mischung von NO und Superoxidanionen auf, die in der Lage ist, zytotoxisches Peroxynitrit zu bilden (Xia und Zweier, 1997; Frey et al., 1998; Heinzel et al., 1992).

**Tabelle 2: Isoformen der NOS und ihre Regulation**

	nNOS/NOS-1	iNOS/NOS-2	eNOS/NOS-3
Expression	konstitutiv	zytokininduziert, Lipopolysaccheride	konstitutiv
Gewebe	Neuronen, Magen, Niere, Lunge	Entzündungszellen, Epithel, glatte Muskelzellen	Endothel
Aktivitäts- regulation	Kalzium	keine	Kalzium
Funktion	Neuromodulation, Hyperalgesie, Magen- /Nierenprotektion	Entzündungsreaktion, unspezifische Immunabwehr	Vasodilatation, Antithrombose

aus: Frey et al. (1998)

Während die neuronale NO-Synthase (nNOS) und die endotheliale Isoform (eNOS) konstitutiv exprimiert werden und von der zellulären Kalziumkonzentration abhängig sind, wird die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) durch Zytokine stimuliert und ist von der vorhandenen Kalziumkonzentration unabhängig.

Auf der Ebene der Genexpression konnte für iNOS eine Induktion durch Lipopolysaccheride (LPS), den Transkriptionsfaktor NFκB und den interferon-regulierenden Faktor (IRF-1) gezeigt werden (Für eine Übersicht s. Nathan und Xie, 1994). In der vermuteten Promotorregion von eNOs wurden Konsensussequenzen des Aktivatorproteins 1 und 2 und des nukleären Faktor 1 gefunden (Ignarro, 1995).

nNOS Transkripte weisen eine hohe Diversität auf. Verschiedenartige primäre Exons werden zu einem gleichartigen sekundären gespleißt (Ignarro, 1995). Die posttranskriptionale Regulation kann durch Beeinflussung der mRNS-Stabilität, post-

translationale Regulation durch Modulation der Proteinstabilität oder Proteinphosphorylierung angeregt werden und bietet einen effizienten Mechanismus, um die katalytische Aktivität des Enzyms zu reduzieren (Nathan und Xie, 1994; Dawson et al., 1993). Kürzlich wurden mittels eines *yeast two-hybrid* Systems zwei mit NOS interagierende Proteine entdeckt, die dessen Aktivität modifizieren können: 1) *Carboxy-terminal PDZ ligand of nNOS* (CAPON) konkurriert mit dem *postsynaptic density protein* (PSD) 95, einem Adaptorprotein, das über eine PDZ-PDZ-Verbindung nNOS an NMDA-Rezeptoren bindet und so zu einer kalziumabhängigen Aktivierung von nNOS führt (Bredt und Snyder, 1990; Brenman und Bredt, 1996). In caponüberexprimierenden Zellen liegen weniger PSD95/NMDA-Rezeptorkomplexe als in den Kontrollen vor (Jaffrey et al., 1998). 2) Der *protein inhibitor of nNOS* (PIN) reduziert die Enzymaktivität von nNOS und wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht (Jaffrey und Snyder, 1996).

### **1.6 Struktur und Funktion PINs: Inhibitor von nNOS und ubiquitär exprimiertes Gen - Beteiligung am Zytoskelett in *Drosophila melanogaster***

Bei der Verwendung einer hippocampalen cDNS-Bank band PIN an die Aminosäuren (AS) 163-245 von nNOS (Jaffrey und Snyder, 1996). Die Bindungsregion PINs liegt außerhalb der PDZ-Domäne, einer für die Verbindung mit synaptischen Strukturen wichtige Region, und auch außerhalb der calmodulinbindenden Region (s.o.). Durch *Northern blots* wurde ein 0,9 kB langes Transkript mit den höchsten Spiegeln in den Hoden, intermediärer Expression im Gehirn und der niedrigsten Expression in peripherem Gewebe detektiert. Nur Zelllysate von *human embryonal kidney 293* (HEK 293)-Zellen, die mit nNOS transfiziert sind, binden an ein immobilisiertes Glutathion-S-Transferase (GST)-PIN-Protein. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die PIN-bindende Region in e- und iNOS nicht vorhanden ist. In Kotransfektionsexperimenten von nNOS und PIN in HEK-293-Zellen ist PIN in Abhängigkeit von seiner Konzentration in der Lage, die kalziuminduzierte cGMP-Bildung (s. Abs. lösliche Guanylylzyklase) signifikant zu inhibieren (ebenda). Wie in Gel-*shift*-Untersuchungen gezeigt wurde, verhindert GST-PIN (Jaffrey und Snyder,

1996) die für die nNOS-Funktion wichtige Dimerisierung (Hevel et al., 1991; Klatt et al., 1995).

### 1.6.1 Struktur des PIN-Proteins

Die Struktur des 89 AS großen und 10 kD schweren Proteins (Jaffrey und Snyder, 1996) wurde durch Kernspinresonanz (NMR)-Spektroskopie weiter aufgeklärt (Tochio et al., 1998). Das Protein besteht aus zwei langen  $\alpha$ -Helices und antiparallelen  $\beta$ -Faltblattstrukturen. Die Konfiguration von vier  $\beta$ -Strängen bildet eine den Lösungsmitteln zugewandte, hydrophobe Oberfläche, die von positiv geladenen AS umgeben ist. Innerhalb dieser Oberfläche wurde eine an Calmodulin (Babu et al., 1988) erinnernde Vertiefung detektiert und die Bindung PINs an die negativ geladenen AS der PIN-bindenden Region nNOSs über dieser Vertiefung vermutet (Tochio et al., 1998). Durch *chemical shift index analysis* wurde der Bruch eines  $\beta$ -Stranges in der Region Ile 8 identifiziert. Die Benennung mit  $\beta 0$  wurde wegen des unregelmäßigen Vorkommens dieses Stranges vorgenommen. Mittels Röntgenstrukturanalyse konnte gezeigt werden, dass PIN in Abhängigkeit vom pH-Wert entweder vorwiegend als Monomer (pH 8) oder als Dimer (pH 6) vorliegt (Liang et al., 1999). Die PIN-bindenden Region von nNOS (PINB; AS 161 – 245; Jaffrey und Snyder, 1996) ging mit PIN Verbindungen im stöchiometrischen Verhältnis von 2:1 ein. (s. Abb. 1; Fan et al., 1998). Aus den in den NMR-spektroskopischen Messungen hervorgegangenen Daten und Deletionsmutanten wurde am C-terminalen Ende von PINB ein für die Bindung mit PIN wesentliches, 17-AS-großes Peptid (Met-228 – His-244) identifiziert (Fan et al., 1998).

### 1.6.2 Struktur des PIN-Gens

In Genomanalysen von PIN an Hasen-DNS wurden drei Exons, die über eine Distanz von 2,3 kB genomischer DNS verteilt sind, gefunden (Jeong et al., 1998). Das vermutete Startkodon war in Exon 2, das Stoppkodon (TAG) in Exon 3 lokalisiert. Eine Konsensuspolyadenylierungssequenz (AATAA) befindet sich 273 Bp abwärts vom Translationsende. Eine AT-reiche Sequenz aufwärts vom AATAA Motiv in Richtung 5'-Ende enthält ein ATTTA Motiv, für das mRNS-destabilisierende Eigenschaften am granulozyten-/makrophagenkolonienstimulierenden Faktor (Shaw und Kamen, 1986)



und Endothelin-1 (Inoue et al., 1989) nachgewiesen werden konnten. Ob die Stabilität des mRNA-Transkripts durch dieses Motiv beeinträchtigt wird, ist derzeit noch nicht geklärt. Der Startpunkt der Transkriptionsinitiation liegt 98 Bp aufwärts des ersten Nukleotids des Startkodons. Die Promotorregion enthält keine TATA-Box. Neben einer CCAAT-Box an der Position des Nukleotids (NT) -98 wurden Sequenzen, die das CCAAT/*enhancer binding protein* erkennt (C/EBP; NT -480,-1056, -1191), CG-reiche Regionen zwischen den NTn -191 und -359, zwei mögliche *Sp-1* bindende Domänen (NT -56, -67), eine myeloische Zinkfingerkonsensussequenz (MZFKS; NT -77), zwei zusätzliche *Sp-1*-bindende Domänen (NT -249, -401), eine *heat shock factor-2* Domäne (HSF-2S; NT -160) und eine AP-2 Domäne (NT 297) lokalisiert. Weiter aufwärts in 5'-Richtung der DNS finden sich weitere mögliche Bindungsstellen für eine andere MZFKS (NT -658), eine GATA-Boxfamilie (NT -898), hepatischen nukleären Faktor 3 $\beta$  (HNF-3  $\beta$ ; NT -927) und das *cdxA* Homeoprotein (NT -1015). Die Bindungsstelle für den *upstream stimulating factor* (USF) überlappt sich mit der des *sterol regulatory element-binding protein 1* (SREBP1) an Nukleotid -965 (Jeong et al., 1998). Die CG-reichen potentiellen Bindungsstellen für SP1 werden in TATA-boxlosen Genen für die Transkription durch die RNS-Polymerase 2 benötigt (Blake et al., 1990; Kadonaga und Tjian, 1986) und können durch SP1-SP1 Interaktionen oder Interaktionen mit den Transkriptionsfaktoren AP-2 (Mitchell et al., 1987), C/EBP $\beta$  (Lee et al., 1997; Merika und Orkin, 1995) oder SREBP1 (Yieh et al., 1995) zu einer vermehrten Transkription führen. Die große Ähnlichkeit der Promotorregion PINs mit denen vieler Haushaltsgene stimmt mit den von Jaffrey und Snyder (1996) gemachten Beobachtungen einer konstitutiven Expression überein. HSF-2 wird vornehmlich in den Hoden exprimiert und könnte die hohen PIN-Spiegel in diesem Gewebe erklären (Jaffrey und Snyder, 1996). Zwei Pseudogene PINs wurden im Hasengenom aufgespürt. Eines konnte als prozessiertes Pseudogen ohne Intronsequenzen ausgemacht werden (Jeong et al., 1998).

Die strukturellen Untersuchungen von PIN legen nahe, dass PIN nicht nur mit nNOS, sondern aufgrund seiner Calmodulin ähnelnden Bindungsregion mit mehreren Interaktionspartnern reagieren kann. Mehrere mit PIN-interagierende Proteine konnten anhand ihrer minimalen PIN-bindenden Motive durch synthetische Peptide identifiziert werden (Rodriguez-Crespo et al., 2001).

### 1.6.3 Lokalisation und Funktion

Nach Untersuchungen mittels Immunoblots zur Verteilung von PIN und nNOS in den unterschiedlichen Hirnarealen von Ratten liegen hohe Proteinspiegel PINs in Kortex, Mesencephalon, Medulla und Hippocampus, intermediäre im Zerebellum und niedrige im Rückenmark vor (Greenwood et al., 1997). nNOS ist im Kortex, Mesencephalon, Medulla und Hippocampus gering exprimiert. In Zerebellum hingegen liegen höhere nNOS-Proteinspiegel vor. In Aktivitätsmessungen von NOS sind die Werte in Kortex, Mesencephalon und Medulla im Vergleich zum Zerebellum erniedrigt (Bredt et al., 1991). Durch *in situ* Hybridisierung (ISH) wurde mRNA von PIN in Hoden, Gehirn, Lunge, Milz, Niere, Herz, Leber und Skelettmuskel nachgewiesen (Gillardon et al., 1998). Im Gehirn ist PIN mRNA konstitutiv in Pyramiden- und Körnerzellen des Hippocampus, frontoparietalen Kortex, im Striatum, der Amygdala und der Körnerzellschicht des Zerebellums vorhanden. 6 h nach transienter, globaler Ischämie steigt die PIN-mRNA Konzentration in CA3-Pyramidenzellen des HC und des *Gyrus dentatus* signifikant an. In diesen Regionen sind 1 d nach Ischämie die PIN-mRNA-Expressionspiegel erhöht und gehen im Verlauf bis zum 7. Tag auf Normalniveau zurück. In Regionen mit relativ hoher konstitutiver PIN-Expression, wie hippocampalen CA2-Pyramidenzellen, der neokortikalen Schicht IV und der zerebellären Körnerschicht, bleibt die PIN-Expression unverändert, während in CA1-Pyramidenzellen 7 d nach Ischämie die PIN-mRNA-Spiegel deutlich erniedrigt sind. Außerdem zeigt die hippocampale CA1 Region bei Messungen der NOS Aktivität über NADPH-Diaphorase signifikant erhöhte Werte 1 d nach globaler Ischämie und vermehrtes Vorkommen von DNS-Strangbrüchen am 7. postischämischen Tag (Gillardon et al., 1998). In ischämiegeschädigten Neuronen im HC kommt es zu einer verminderten Aktivität von nNOS und reduziertem apoptotischen Zelltod. Das erniedrigte nNOS-Aktivität mit vermindertem Neuronenverlust einhergeht, konnte durch Untersuchungen am kainatinduzierten Epilepsiemodell unterstützt werden. Im *Gyrus dentatus* kommt es bei hohen PIN-mRNA-Spiegeln 7 d nach kainatinduziertem Status epilepticus zu keinem nachweisbaren neuronalen Zellverlust, während in der Region CA1 die PIN-Expression im Vergleich zum *Gyrus dentatus* reduziert,

neuronaler Zelluntergang und Caspase 3-Expression hingegen erhöht sind (Becker et al., 1999).

Weitere Hinweise auf die Beteiligung PINs an antiapoptotischen Vorgängen ergeben sich durch Untersuchungen an PIN-überexprimierenden PC-12-Zellen (PC-PIN) und Gen-*Knockouts* von *Drosophila melanogaster*. Nach Entzug des Nervenwachstumsfaktor (NGF) ist die Anzahl der apoptotischen Zellen in PC-PIN-Zellkulturen gegenüber den Kontrollen deutlich vermindert (Chang et al., 2000). PC-PIN-Zellen unterscheiden sich von ihren Kontrollen durch eine geringere nNOS-Expression und -Aktivität unter NGF-Gabe. Ein möglicher Induktionsweg für eine gesteigerte PIN-Expression scheint die vermehrte Aktivität oder Expression der Cyclooxygenase (COX) zu sein. In COX2-überexprimierenden PC-12-Zellen (PC-COX2) ist ein Spaltprodukt der apoptoseaktivierenden Caspase-3, p17, reduziert nachweisbar. In einem Vergleich der Genexpression zwischen den PC-COX2 und den Kontrollen (PC-12) ist PIN in PC-COX2-Zellen sechsfach stärker exprimiert (Chang et al., 2000).

In *Drosophila melanogaster* wurde ein Homologon PINs, die zyttoplasmatische Dyneinleichtkette, charakterisiert (Dick et al., 1996). Die Leichtketten von zytoplasmatischem und flagellärem Dynein gehören zu einer hoch konservierten Familie von Leichtketten mit in Menschen, *Drosophila melanogaster*, *Caenorhabditis elegans* und *Chlamydomonas reinhardtii* (King und Patel-King, 1995) identifizierten Homologen (King et al., 1996). Als eine seiner möglichen zytoskelettären Aufgaben PINs wurde eine Art Adapterfunktion zwischen dem zytoplasmatischen Dyneinmotorkomplex und Transportmolekülen vermutet (King, 2000). Partielle Mutationen des PIN-Genes in *Drosophila melanogaster* bewirkten pleiotrophe, morphogenetische Defekte (Dick et al., 1996). Es kommt zu gestörter Ausbildung der Flügel und Haare der adulten Fruchtfliegen, Ovarien und Eikammern weisen fehlerhafte Zellstrukturen auf, bis hin zur Fusion mehrerer Eikammern (Dick et al., 1996). Eine vollständige Deletion des Genes ist letal. Homozygote Mutanten entwickeln sich nicht über das embryonale Stadium 10 (Spradling et al., 1993) der Oogenese hinaus. Der Vergleich von Wildtypembryos (WT) mit den Mutanten erbringt zum einen eine starke Störung des geordneten Aufbaus des Aktinzytoskeletts bei den Mutanten, zum anderen wurden durch YPRO- und *terminal transferase dUDP-biotin nick-end-labeling*

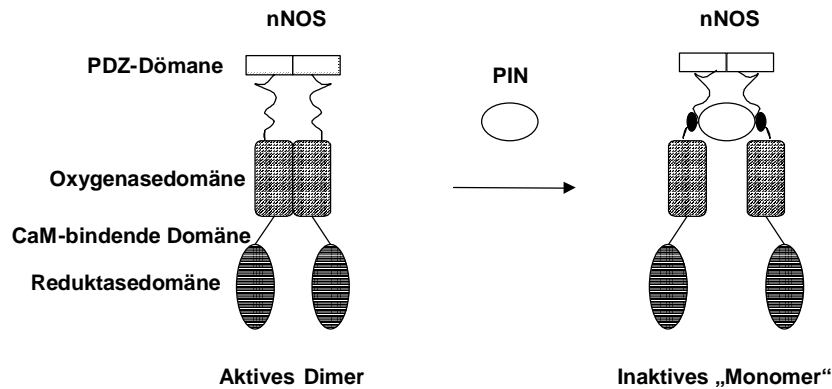
(TUNEL)-Färbungen eine im Vergleich zum Wildtyp vermehrte Anzahl apoptotischer Zellen dargestellt. Kolokalisationsfärbungen in Ovarien von *Drosophila melanogaster* mit Antikörpern (AK) gegen PIN und Tubulin zeigen die enge räumliche Beziehung PINs zum Zytoskelett. In *whole mount in situ hybridisations* und *Northern blots* ist eine ubiquitäre Expression eines 2,3 kB- mRNA-Transkriptes von PIN in allen Entwicklungsstadien vorhanden. Ein weiteres, 4,5 mRNA-kB-Transkript ist auf das Nervensystem beschränkt und tritt ab Stadium 14 auf (Dick et al., 1996). In Untersuchungen über die Verteilung der PIN-mRNA in einzelnen Hirnregionen von Ratten wurden ebenfalls verschieden große Transkripte identifiziert (Greenwood et al., 1997). Inwieweit den unterschiedlichen Transkripten verschiedenen Funktionen zuzuordnen sind, ist mit dem derzeitigen Wissensstand noch nicht zu beantworten.

PIN kolokalisiert in Glutathion-S-Transferase (*GST*) *pulldown assays* (Fuhrmann et al., 2002) mit dem tubulinbindenden Protein (Kirsch et al., 1991), Gephyrin ist an der Zusammensetzung der Rezeptoren von Glycin (Meyer et al., 1995; Feng et al., 1998) und  $\gamma$ -Aminobuttersäure (GABA<sub>A</sub>; Kneussel et al., 1999) an inhibitorischen Synapsen beteiligt. In hippocampalen Zellkulturen sowie in Neuronen des ventralen Rückenmarkes (RM) war PIN sowohl im Zytoplasma als auch in Verbindung mit und ohne Gephyrin an prä- und postsynaptischen Membranen nachzuweisen (Fuhrmann et al., 2002). Im Zusammenhang mit elektronenmikroskopischer Darstellung PINs an Synapsen des Typs I und II wurde daher die Beteiligung PINs an inhibitorischen und exzitatorischen Synapsen vermutet (Fuhrmann et al., 2002).

#### 1.6.4 Wirkmechanismen der nNOS-Inhibition

Wie genau die Interaktion PINs zur Inhibition nNOS führt, ist unvollständig aufgeklärt. Die Erstbeschreiber der nNOS-Inhibition (Jaffrey und Snyder, 1996) beobachteten in niedrigtemperierter SDS-PAGE bei Auftrag von nNOS und GST-PIN entgegen der zuvor beschriebenen dimeren Wanderung (Klatt et al., 1995) von nNOS in der SDS-PAGE Monomere und schlussfolgerten daraus die Beeinträchtigung der enzymatischen Funktion von nNOS durch die inhibierte Dimerbildung. In Titrationsversuchen mit radioaktiv markiertem PIN liegt PIN zu nNOS im Peptid-Komplex in einem Verhältnis von 1:2 vor (Fan et al., 1998). Die PIN-bindende Region (AS 161-245) liegt zwischen

der PDZ-Domäne und der Oxygenasedomäne. Ein Modell, wie nNOS durch PIN gehemmt werden könnte, ist in Abbildung 1 veranschaulicht.



Nach: Fan et al., 1998

### Abbildung 1: Modell der Inaktivierung von nNOS

Durch Bindung PINs an nNOS zwischen PDZ-Domäne und Oxygenasedomäne werden die katalytisch aktiven Oxygenasedomänen voneinander getrennt und dadurch gehemmt. Cam=Calmodulin; nNOS=neuronale Stickstoffmonoxidsynthase; PIN=*protein inhibitor of nNOS*

Die Phosphorylierung von nNOS durch die Proteinkinase (Bredt et al., 1992; Dinerman et al., 1994) und die Inhibition der katalytischen Funktion (Brune und Lapetina, 1991) von nNOS wurden kürzlich mit der Beteiligung PINs in Verbindung gebracht. Die Interaktion PINs mit PKA konnte gezeigt werden; der zugrunde liegende Mechanismus der Phosphorylierung ist jedoch noch unklar (Yu et al., 2002).

## **1.7 Aufgabenstellung und Zielsetzung**

In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. M. Bähr wurde als Modell zur Untersuchung von neurodegenerativen und traumatischen Läsionen die Axotomie des *Nervus opticus* etabliert. Die Gruppe konnte zeigen, dass die Zellüberlebensrate der retinalen Ganglienzellen nach Applikation von *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) bei gleichzeitiger Gabe eines Radikalfängers signifikant gesteigert werden konnte (Klöcker et al., 1998). Wie oben erwähnt lässt sich daraus schließen, dass die Inhibierung der nach BDNF-Gabe erhöhten NOS-Aktivität einen fördernden Einfluss auf das Zellüberleben in RGZn hat.

Durch Substraktionshybridisierungen zwischen cDNS von axotomierten und Kontrollretinae wurden ca. 100 cDNS-Klone isoliert (Labes, M. und Bähr, M., nicht publizierte Ergebnisse). Einer der cDNS-Klone, der nach mehreren Hybridisierungsschritten angereichert wurde, entspricht PIN. In Hirnarealen mit hoher PIN-Expression kommt es nach traumatischen Läsionen zu geringeren Zellverlusten als in Hirnregionen mit niedriger PIN-Expression (Gillardon et al., 1998). Die nNOS-Aktivität inhibierenden Eigenschaften PINs (Jaffrey und Snyder, 1996) ließen vermuten, dass PIN auch in regenerativen Prozessen der Retina von Bedeutung sein könnte. Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war deshalb, zu klären, inwieweit retinale Ganglienzellen auf die Axotomie mit einer vermehrten Transkription PINs reagieren und ob in überlebenden RGZn eine Anreicherung von PIN-Protein nachzuweisen ist. Eine Inhibierung von nNOS könnte einer der Mechanismen sein, der 10%-15% der RGZn ein Überleben nach Axotomie ermöglicht.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Allgemeine Materialien

#### 2.1.1 Geräte

**Tabelle 3: Häufig verwendete Geräte**

Gefriermikrotom	Cryotome	Zeiss
Mikroskop	Axiovert 35	Zeiss
Mikroskopkamera	DXP-930P 3CCD Video Camera	Sony
Online-PCR-Maschine	iCycler	BioRad
PCR-Maschine	Cyclone 25	PeqLab
Zentrifugen	Mikrofuge 11	Beckman
	Mikrozentrifuge 5402	Eppendorf
	Minifuge GL	Heraeus

#### 2.1.2 Standardpuffer und -lösungen

Die für bestimmte Methoden spezifischen Lösungen, Puffer und Chemikalien sind an den betreffenden Stellen aufgeführt.

Lösungen wurden mit Reinstwasser aus einer MILLIPORE-Anlage angesetzt.

**Tabelle 4: Häufig verwendete Lösungen**

20xSSC	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat	pH 7,0
MABS-Standardpuffer	0.1 M Maleinsäure, 0.15 M NaCl	pH 7,5
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 8,06 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	pH 7,4
TAE	40 mM Tris, 20 mM Na-Acetat, 1 mM EDTA	pH 7,5
TE	10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA	pH 8,0

Lösungen für RNS-Arbeiten wurden entweder mit Diethylpyrocarbonat (0,1%) versetzt, bei 37° 2 h inkubiert und autoklaviert oder, bei carboxymethylierungssensitiven Substanzen, mit schon behandeltem, RNase-freiem Wasser angesetzt.

### 2.1.3 Enzyme

**Tabelle 5: Enzyme**

T7- und T3- RNS-Polymerasen	Boehringer Mannheim
Taq-Polymerase	Perkin Elmer
Proteinase K	Boehringer Mannheim

### 2.1.4 Software zur Datenverarbeitung

Word für Windows '97, Version 1.0 (Microsoft)

Excel für Windows '97, Version 1.0 (Microsoft)

Powerpoint für Windows '97 Version 1.0 (Microsoft)

Adobe Photoshop, Version 4.0 (Adobe Systems Europe B.V.)

Bibliographix, Version 3.1, (Bibliographix)

### 2.1.5 Tiere

Adulte weibliche Ratten „Sprague Darley“ (200-250g; Charles River Wiga) wurden unter standardisierten Laborbedingungen gehalten (12 h : 12 h Tag/Nacht-Zyklus, 20° C +/- 1° C, Futter und Wasser ad libitum).



## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Axotomie des *Nervus opticus*

**Tabelle 6: Zur Axotomie verwendete Materialien, Lösungen und Chemikalien**

<b>Materialien</b>	
Binoculares Mikroskop	Zeiss
Cryotome	Leitz
Perfusionsanlage mit weitlumigen Nadeln	Eigenbau
<b>Lösungen und Chemikalien</b>	
Chloralhydrat	Fluka Chemie
Fast Blue	Dr. Illing Pastics
Tissue Tek	Sakura Finetek
Maschinenöl für das Injektionssystem	Sigma
Paraformaldehyd	Sigma
D-Saccharose	Sigma
PBS pH 7,4	Sigma

Adulte weibliche Ratten „Sprague Darley“ (200-250g; Charles River Wiga) wurden wie in Klöcker et al. (1998) beschrieben axotomiert. Nach Anästhesie mit Chloralhydrat (0,42mg/kg Körpergewicht) wurde die Orbita eröffnet. Unter Erhalt der *Vena supraorbitalis* wurde die Hader'sche Drüse teilresiziert, mit Hilfe von Retraktoren die oberen äußeren Augenmuskeln gespreizt, und der *Nervus opticus* nach einer longitudinalen Inzision des *M. retractor bulbi* und des Perineuriums dargestellt. Der rechte *Nervus opticus* wurde ca. 2 mm vom posterioren Pol des Auges durchtrennt, ohne die Blutzufuhr durch die *Ateria centralis retinae* zu verletzen. Diese wurden später fundusskopisch überprüft. Tiere mit anhaltender retinaler Ischämie nach Axotomie wurden nicht gewertet (Kermer et al., 2001).

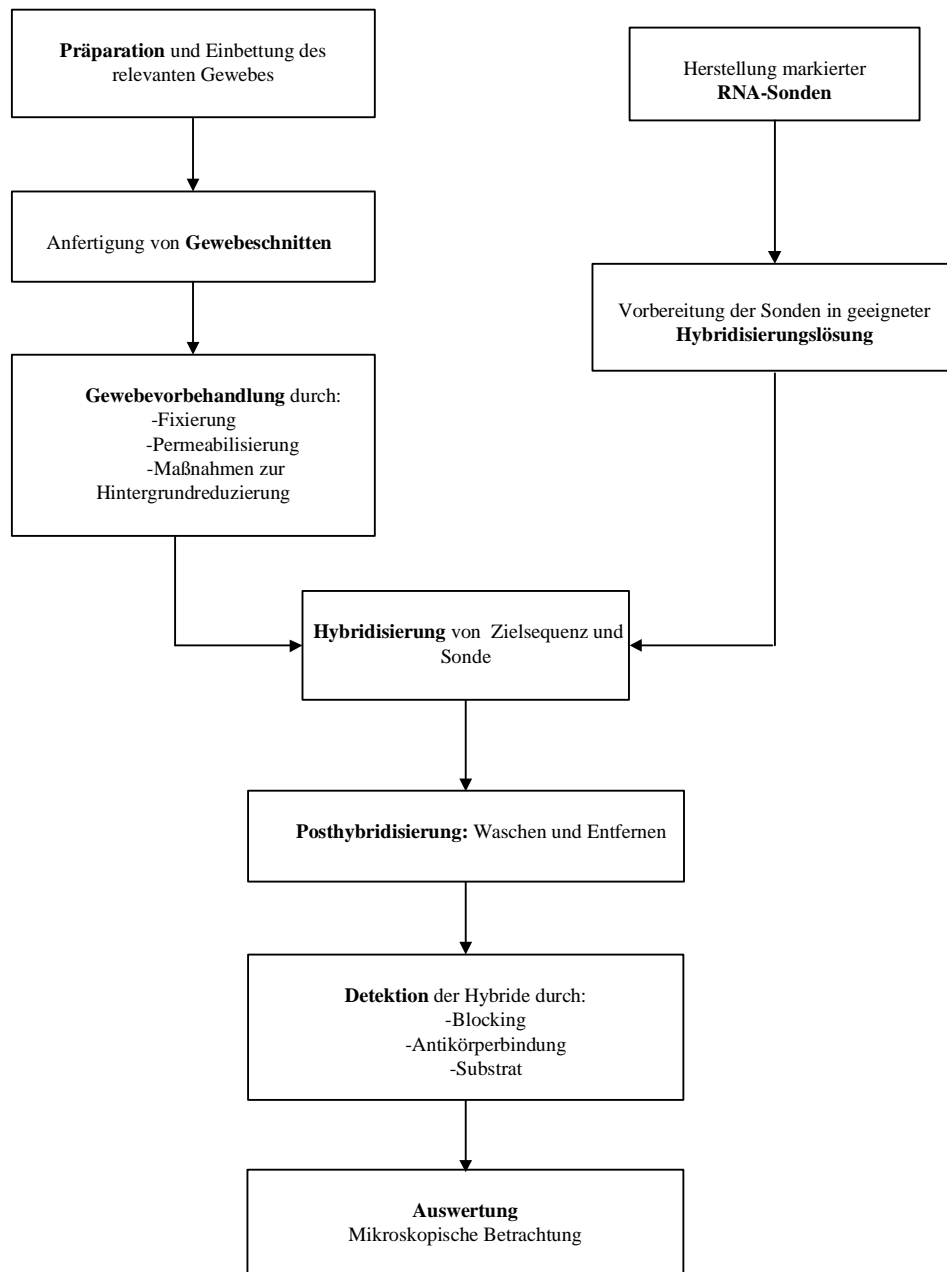
3-14 d nach der Operation wurden die Tiere durch eine Überdosis Chloralhydrat getötet und mit 4% Paraformaldehyd (PFA)/PBS 10 min. perfundiert. Danach wurden beide Augen entnommen und ohne Kornea und Linse für weitere 20 Minuten in 4% PFA/PBS bei 4° C fixiert und über Nacht bei 4° C in eine 30% Sucrose/PBS Lösung gelegt. Vor dem Einfrieren der Augenbecher in flüssigem Stickstoff wurden sie in Tissue Tek eingebettet, anschließend als 16 µm dicke Schnitte auf gelatinebeschichteten Objektträgern luftgetrocknet und bis zur weiteren Verarbeitung bei -20° gelagert. Zur Kolokolisation axotomierter RGC mit molekularen Markern wurden die retinalen Ganglienzellen mit dem fluoreszierenden Farbstoff Fluorogold (FG; Fluorochrome Inc.) retrograd angefärbt. Dazu wurde ein mit 5% Fluorogold in einer 0,9% NaCl-Lösung getränkter Gelschwamm am Stumpf des axotomierten Nervus opticus platziert.

## 2.2.2 Nachweis von Nukleinsäuren

### 2.2.2.1 *In situ* Hybridisierung (ISH; Gall und Pardue, 1969)

Die ISH ist eine aussagekräftige Methode, um sowohl DNS- als auch RNS-Sequenzen in Geweben, einzelnen Zellen und intrazellulären Strukturen bis sogar auf Chromosomenebene mit Hilfe komplementärer Sonden zu lokalisieren. Im Gegensatz zur Nukleinsäureanalyse durch *Southern-* oder *Northern blot* Hybridisierung wird bei dieser Technik das Hybridisierungssignal nicht auf einer festen Trägermembran, sondern direkt im biologischen Präparat (*in situ*) sichtbar gemacht. Sie ist Methode der Wahl zur Untersuchung von räumlichen und zeitlichen Expressionsmustern von einzelnen Genen im Gewebe. Zu diesem Zweck wurde sie auch bei der hier vorliegenden Arbeit eingesetzt.

Einen Überblick über den Ablauf einer *in situ*-Hybridisierung liefert Abbildung 2. Die einzelnen Arbeitsschritte werden im Folgenden detailliert dargestellt.



**Abbildung 2: Schema zum Arbeitsablauf einer ISH**

### 2.2.2.1.1 RNS-Sonden

Für die ISH wurden DIG-UTP-markierte RNS-Sonden verwendet. Bei der Herstellung wurde nach dem Protokoll von Schaeren-Wiemers und Gerfin-Moser (1993) verfahren.

#### 2.2.2.1.1.1 RNS-Isolierung durch CsCl-Reinigung aus Hirngewebe

**Tabelle 7: Materialien für die RNS-Isolierung**

Zentrifuge	Sorvall SS-34 und Beckman SW 28
Glas-Teflon-Homogenisator	B. Braun Melsungen AG
5 ml Polypropylenzentrifugentubus	autoklaviert

**Tabelle 8: Chemikalien und Lösungen für die RNS-Isolierung**

Substanz	Anmerkungen, Konzentrationen
Beta-Mercaptoethanol	
Chloroform/Isoamylalkohol	24:1
CsCl	5,7 M, DEPC-behandelt
Denaturierungslösung	4 M GTC, 25 mM Natriumcitrat pH 7,0; 0,5% Sarkosyl, 0,1 M Mercaptoethanol
Ethanol 70%	
Guanidin-Gewebelösung	590,8 g GTC in 400 ml DEPC-Wasser, 25 ml 2 M Tris-Cl pH 7,5; 20 ml 0,5 M Na <sub>2</sub> EDTA, 50 ml Mercaptoethanol
Guanidinlösung	4 M GTC, 20 mM Natriumcitrat pH 7,0; 0,5% Sarkosyl und 0,1 mM DTT
Isopropanol	100%
Natriumacetat	2 M
N-Laurylsarkosyl	
Phenol/Chloroform/Isoamyl-alkohol	25:24:1
Resuspensionslösung	5 mM EDTA, 0,5% Sarkosyl, 5% Mercaptoethanol

Zur Boten-RNS-Isolierung werden häufig zwei Verfahren verwendet. Bei der Einzelschrittmethode (Chomczynski und Sacchi, 1987) wird die gute Wasserlöslichkeit der RNS, bei der Fällung (Chirgwin et al., 1979) ihre höhere Dichte gegenüber der DNS ausgenutzt (Ausubel, 1987).

2 g tiefgefrorenes Hirngewebe einer adulten Ratte wurde in 20 ml Guanidin-Gewebelösung aufgetaut, rasch homogenisiert und bei 4°C und 10000 U/min. zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurden 0,1 Vol. 0,5% Sarkosyl hinzugegeben und auf 65°C für 2 min. erhitzt. Ein weiterer Zentrifugationschritt bei – 4°C und 25000 U/min. in 5,7 M CsCL-Lösung für 12 h wurde durchgeführt. Nach Entfernung des Überstandes und Abschneiden des Tubusbodens wurde der Bodensatz in ein 50 ml Reaktionsgefäß transferiert und in 3 ml Resuspensionslösung über Nacht gelöst, die RNS durch Abkühlung für 30 min. auf Trockeneis ausgefällt und bei 4°C für 10 min. zentrifugiert. Es erfolgte die sequenzielle Extraktion der Lösung mit 25:24:1 Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol und mit 24:1 Chloroform/Isoamylalkohol vor Zugabe von 0,1 Vol. von 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 2,5 Vol. 100% Ethanol. Abschließend wurde der Überstand verworfen und die RNS in Wasser gelöst. Die RNS-Konzentration wurde photometrisch bestimmt; Ihre Integrität durch Agarosegelelektrophorese geprüft.

#### 2.2.2.1.1.2 Reverse Transkription (cDNS – Synthese)

**Tabelle 9: verwendete Substanzen und Lösungen für die cDNS-Synthese**

DTT, 0.1 M	2 µl
dNTP, jeweils 10 mM	1 µl
5X First Strand Buffer (Gibco BRL)	4 µl
DEPC H <sub>2</sub> O	5 µl
Ethanol	70% u. 100%
NaCl	3 M

Gesamt-RNS und m-RNS-spezifische Oligo-dT-Primer, wurden zur Auflösung von Sekundärstrukturen auf 70°C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Nach Zugabe von 5 X First Strand Buffer (Gibco BRL), Nukleotiden (0.5 mM), reverser

Transkriptase (Superscript™ Gibco BRL) aus dem *Moloney murine leukemia Virus* (RT-MMLV) ohne intrinsische RNase-H Aktivität wurde der Ansatz für 2 h bei 42 °C inkubiert und auf Trockeneis gelagert.

#### 2.2.2.1.1.3 Reinigung der cDNS

Nach der reversen Transkription wurden die cDNS mittels Phenol-Extraktion gereinigt durch Zusatz von 1/10 Vol. 3 M NaCl und 2,5 X Vol. 100% Ethanol gefällt und bei 13000 g für 20 min. zentrifugiert, der Überstand verworfen das Präzipitat mit 70% Ethanol gewaschen und bei 13000 g. für 5 min. zentrifugiert. Der Überstand wurde abermals verworfen und der Ethanolrest bei 37°C verdunstet. Das Pellet mit der cDNS wurde in TE-Puffer (10 mM TRIS, pH 8,0, 0.1 mM EDTA) gelöst.

#### 2.2.2.1.1.4 PCR

Zur Amplifikation der gesuchten Zielsequenz zur Herstellung der ISH-Sonde wurden Primer verwendet, die neben der genspezifischen Sequenz auch Promotorsequenzen für die T7 und T3 Polymerasen enthielten. Die verwendeten Primer hatten eine Länge von 35 – 40 Basen und einen GC Anteil von 45-60 % und wurden wie in Leitch et al. (1994) und Rychlik (1995) beschrieben ausgewählt.

**Tabelle 10: Materialien und Lösungen für die PCR**

<b>Materialien</b>	
PCR-Maschine	Perkin Elmer
<b>PCR-Ansatz</b>	
Gesamtansatz	50 µl
Gesamt-cDNS, ca. 100 ng	1 µl
DNTPs, jeweils 10 mM	1 µl
H <sub>2</sub> O	41,8 µl
Primer 10 uM	1 µl
10 X Puffer; 100mM TRIS pH 9,2; 35 mM MgCl <sub>2</sub> , 250 mM KCl	5 µl
Taq-Polymerase, Perkin Elmer	0,2 µl

Durchführung:

Die PCR Bedingungen wurden wie folgt gewählt: Initiale Denaturierung bei 94°C für 3 min., 42 Amplifikationszyklen mit je einem Denaturierungsschritt bei 94°C für 1 min., einem Anlagerungsschritt („Annealing“) bei 50°C für 1 min. und einem Elongationsschritt 72°C für 1 min. Die finale Elongation wurde bei 72°C für 7 min. durchgeführt und die Reaktionsgefäße auf 4°C abgekühlt. Anschließend wurde die cDNS mit dem „QIAquick PCR Purification Kit“ nach Angaben des Herstellers gereinigt.

#### 2.2.2.1.1.5 DIG-Markierung.

Digoxigenin ist ein pflanzliches Steroid aus dem roten Fingerhut (*Digitalis purpurea*). Es wird enzymatisch in Form der modifizierten Nukleotide Dig-11-UTP (Boehringer Mannheim) in die RNS eingebaut. Digoxigenin-Nukleotide besitzen einen dazwischengeschalteten 2 nm langen Spacer, der das Dig-Hapten vom UTP trennt (Abbildung 3). Aufgrund dieses Zwischenstücks ragen die in die markierten Nukleinsäuresonde eingebauten Reportergruppen aus dem Rückgrat der Nukleinsäure heraus und können so einfach von Digoxigenin-spezifischen Antikörpern erkannt werden. Es entstehen Sonden, die etwa an jedem 20.-25. Nukleotid eine Dig-Markierung tragen (The DIG System User's Guide for Filter Hybridization, 1995). Nachgewiesen wurden die in den Retinaschnitten hybridisierten Sonden über an alkalische Phosphatase gekoppelte Antikörper (AK; Grünewald-Janho et al., 1996).

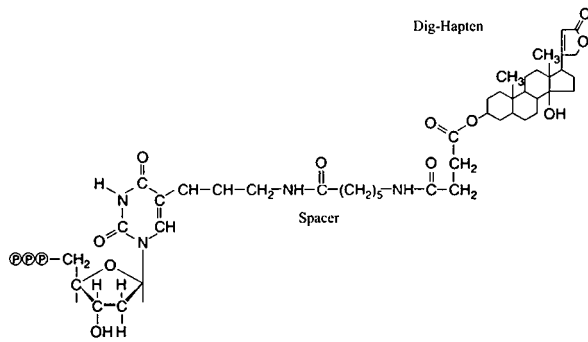


Abbildung 3: Strukturformel des Dig-11-UTP

Tabelle 11: Materialien und Lösungen der cDNS-Reinigung

Brutschrank	
Feuchte Kammer	
Waschküvetten	
cDNS	
10 X Transkriptionspuffer	400 mM Tris-HCl, pH 8,0; 60mM MgCl <sub>2</sub> , 100 mM DTE, 20 mM Spermidine, 100 mM NaCl, 1 Einheit /ml Rnase-Inhibitor
DIG-UTP markierte NTP	10 mM ATP, 10 mM CTP, 10 mM GTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM DIG-UTP in Tris-HCl, pH 7,5
T7-RNS-Polymerase	20 U/µl T7-RNS-Polymerase
T3-RNS-Polymerase	20 U/µl T3-RNS-Polymerase

#### 2.2.2.1.1.6 ISH nach (Grünwald-Janho et al., 1996)

Die gereinigte cDNS wurde zusammen mit je 2 µl 10 X Transkriptionspuffer, T3- und T7-RNS-Polymerase und den in Tabelle 12 angegebenen Substanzen vermischt, kurz zentrifugiert und bei 37°C für 2 h inkubiert. Die RNase-Reaktion wurde mit 2 µl EDTA pH 8,0 gestoppt.



### 2.2.2.1.1.7 Sondenapplikation

Alle verwendeten Lösungen für die ISH bis auf Tris wurden mit 0,1% DEPC-H<sub>2</sub>O behandelt, autoklaviert und in sterilisierten Flaschen gelagert.

**Tabelle 12: Materialien und Lösungen für die ISH**

<b>Materialien</b>	
Coverslips	
Feuchte Kammer	Beliebiger Hersteller
Glasbecken für die Waschschr itte der Kryostatschnitte	Beliebiger Hersteller
<b>Chemikalien und Lösungen</b>	
20 X SSC	3 M NaCl; 0,3 M Na-Citrat pH 7,0
5 mM Acetanhydrid	Sigma
Anti-DIG-Antikörper	Polyklonales Fab-Fragment vom Schaf, Boehringer, Mannheim, Kat. - Nr.: 1093274
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-phosphat; 50 mg/ml in DMF
Blocking Reagenz	Boehringer, Mannheim, Kat.-Nr.:1096176
Css	45 µl NBT; 35 µl BCIP; 2,4 mg Levamisol (Sigma) in 10 ml Rp
Hp	Hybridisierungspuffer: 300 mM NaCl; 20 mm Tris-HCl pH 7,5; 5 mM EDTA; 50% deionisiertes Formamid; 10% Dextransulfat; 10 mM DTT, 1 X Denhardslösung; 0,2% SDS; 0,25 mg /ml Hefe RNS
Mabs	0,1 M Maleinsäure; 0,15 M NaCl pH7,5
Moviol	Sigma

NBT	4-Nitrobluetetrazoliumchlorid; 75 mg/ml in 70% DMF
PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 1,47 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 8,06 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
PFA	2 % Paraformaldehyd in PBS pH 7.4
Rp	Reaktionspuffer: 0,1 M Tris; 0,1 M NaCl pH 9,5
TEA	0,1 M Malein Säure; 0,15M NaCl, pH 7,5
Triton-X 100	Sigma

### I. Prähybridisierung

Die Gewebeschnitte (GS) der Retina wurden 30 min. vor dem Beginn der ISH aus den -80° Gefrierschränken in Raumluft für die weitere Verarbeitung vorgewärmt und getrocknet. Die GS wurden 10 min. in 4% PFA fixiert und 2 mal 5 min. in PBS gewaschen, 2 min. in 0,5% Triton-X 100/ PBS permeabilisiert, 3 mal 5 min. in PBS gewaschen, in 0,1 M Acetanhydrid/ 0,1 M TEA für 10 min. azetyliert, und für je 10 min. 2 mal in SSC gewaschen.

### II. Hybridisierung:

Die in Hp gelöste DIG-RNS (0,1 ng/µl Sonde) wurde durch 10 min. Erhitzen auf 100° C denaturiert und 5 min. auf Eis gekühlt. 250 µl Sondenlösung wurden pro Gewebsschnitt (GS) appliziert. Die GS wurden mit Coverslipfolien bedeckt und über Nacht zur Hybridisierung bei 45°C in eine Kammer mit hoher Luftfeuchte eingebracht.

### III. Posthybridisierung, Fixierung, Mikroskopie

Nach Entfernung der Coverslipfolien wurden die GS für 5 min. bei 72°C in 5 X SSC, 60 min. bei 72°C in 0,2 X SSC, 5 min. bei Raumtemperatur in 0,2 X SSC gewaschen, 30 min. in 1% Blocking/Mabs geblockt und 60 min. mit Anti-DIG-Antikörpern (1/500) in Mabs in einer Kammer mit hoher Luftfeuchte inkubiert, 2 mal 15 min. in Mabs gewaschen und 5 min. in Rp äquilibriert. Die Farbreaktion wurde durch Applikation von 10 ml frisch angesetzttem C<sub>ss</sub> (1 ml/Objektträger) in der abgedunkelten Kammer mit hoher Luftfeuchte initiiert, bei der gewünschten Farbtintensität mit H<sub>2</sub>O gestoppt,

mit Moviol eingedeckelt und unter einem Mikroskop (Axiovert 200M oder Axioplan 2 35, Carl Zeiss Jena) analysiert.

#### 2.2.2.2 PCR von cDNA (RT-PCR)

Für die RT-PCR wurden die Retinae entnommen, in flüssigem Stickstoff eingefroren und die RNS wie unter 1.2.2.1.1.1 beschrieben extrahiert. Je Retina wurden 0,5 ml Guanidin-Gewebelösung eingesetzt. 1 µg gesamt RNS wurde per reverser Transkriptase aus dem *Moloney murine leukemia virus* (RT-MMLV) in 20µl Reaktionsvolumen in DNS transkribiert. 2 µl des Reaktionsvolumens wurden als Matrize für die PCR verwendet. Die PCR wurde mit 0,6 U Amplitaq Polymerase (Perkin Elmer) in einem Reaktionsvolumen mit 50 mM Tris-HCl, pH 8,3 bei RT, 50 mM KCl, 0,01 % (w/v) Gelatine, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 8 mM dNTP und je 1 µM Vorwärts- und Rückwärtsprimer angesetzt. Die Primersequenz für den Vorwärtsprimer für PIN lautet: 5'- TAG CAT GGA CTG TGC CAA-3', die für den Rückwärtsprimer: 5'-CGA GGT GTT CCC TTA GCA-3'.

Die PCR Bedingungen für PIN wurden wie folgt gewählt: Initiale Denaturierung bei 94°C für 2 min., 32 Amplifikationszyklen mit je einem Denaturierungsschritt bei 94°C für 1 min., einem Anlagerungsschritt („Annealing“) bei 50°C für 1 min. und einem Elongationsschritt 72°C für 1 min. Die finale Elongation wurde bei 72°C für 4 min. durchgeführt und die Reaktionsgefäße auf 4°C abgekühlt.

Die Sequenz des Vorwärtsprimers für GAPDH lautet: 5'-ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC-3', die des Rückwärtsprimers für GAPDH:5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA-3'. Die PCR Bedingungen für GAPDH wurden wie folgt gewählt : Initiale Denaturierung bei 94°C für 2 min., 24 Amplifikationszyklen mit je einem Denaturierungsschritt bei 94°C für 25 Sekunden., einem Anlagerungsschritt („Annealing“) bei 50°C für 45 Sekunden und einem Elongationsschritt 72°C für 1 min. Die finale Elongation wurde bei 72°C für 4 min. durchgeführt und die Reaktionsgefäße auf 4°C abgekühlt. Je 10 µl wurden auf 1,8% Agarosegele mit 0,05% Ethidiumbromid aufgetragen, mit 5 µl Farbstoff angefärbt, auf einem UV-Transluminator dargestellt und für die Auswertung fotografiert.

### 2.2.2.3 Quantitative Echtzeit-PCR (QE-PCR)

Die QE-PCR wurde nach der „TaqMan“-Methode (Livak et al., 1995) durchgeführt. Die Berechnung der Zahl der Amplifikationsschritte bzw. des aktuell vorhandenen Amplikons erfolgt indirekt durch Erfassung der Veränderung des Emissionsspektrums des *Fluoreszenz Resonanz Energie Transfers (FRET)*; Cardullo et al., 1988). Während der Amplifikation schneidet die Taq-DNS-Polymerase über ihre 5′-3′ Exonukleaseaktivität mit zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen versehene, zwischen die Primer interponierte, Oligonukleotide. Dabei werden die Fluoreszenzfarbstoffe frei und verändern ihre Emissionseigenschaften. Die Messung der Fluoreszenzintensität kann entweder am Ende der Reaktion erfolgen oder, wenn entsprechende Geräte zur Verfügung stehen, bereits während des Ablaufs der PCR. Im letzteren Fall ist eine Quantifizierung des Ergebnisses durch Auswertung der Kinetik der Fluoreszenzentwicklung möglich. Die Veränderung des Emissionsspektrums wurde in Beziehung mit einem internen Standard gesetzt. Weitere Vorteile sind die Erhöhung der Spezifität durch die Notwendigkeit der Bindung eines dritten Oligonukleotids (Sonde) und ein Schutz vor Kontamination, da zur Detektion nicht mehr mit dem PCR-Produkt hantiert werden muss. Die Veränderung des Emissionsspektrums, die sich eben noch vom Hintergrundsignal unterscheiden lässt, wurde als CT-Wert definiert. Die CT-Werte von PIN wurden zu den CT-Werten Cyclophilins, einem konstitutiv exprimierten Haushaltsgen, in Beziehung gesetzt. Die auf Cyclophilin normalisierten CT-Werte PINs wurden aus cDNS von 3 Tieren für die Zeitpunkte 6 h, 24 h, 6 d und für die Zeitpunkte 12 h und 3 d von je 2 Tiere gewonnen. Der Vergleich der axotomierten Retinae gegen die Kontrolle wurde mittels t-Test durchgeführt. Die Ergebnisse des Zweistichproben t-Test bei abhängigen Stichproben (Paarvergleichstest) ist in Abbildung 8, die statistische Auswertung in Tabelle 13 dargestellt. Für die QE-PCR wurden folgende Materialien verwendet: 0,5 ml sterile Reaktionsgefäße, 10 X Reaktionspuffer (200 mM Tris-HCl [pH 8,55]), 160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 25 mM MgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O bidest., 5′-Oligonukleotid (25 pmol/μl), 3′-Oligonukleotid (25 pmol/μl), TaqMan Probe (25 pmol/μl) mit 5′-FAM markiert, 40 mM dNTP-Mix, Taq-DNS-Polymerase (5U/μl), sowie die cDNS, deren Konzentration bestimmt werden sollte. Die Sequenz des Vorwärtsprimers für Cyclophilin lautet: 5′-CCA CTT CGA TCT TGC CAC AGT-3′, die des Rückwärtsprimers: 5′-ACG TGG TTT TCG GCA AAG TTC-3′, die des

Interponats: 5' VIC-TCT CCA CCT TCC GTA CCA CAT CCA TGC -TAMRA 3'. Die Sequenz des Vorwärtsprimers für PIN lautet: 5'-GCG GTG ATC AAA AAT GCA GA-3', die des Rückwärtsprimers: 5'- CTC CAA CGC CTG AGT AGC G -3', die des Interponats: 5'-FAM-CGA GTC CTG TTG CAT CTC TTC CGA CA -TAMRA-3'. Für ein Reaktionsvolumen von 50 µl wurden 5 µl 10 X Reaktionspuffer, 25 µl H<sub>2</sub>O bidest., 10 µl MgCl<sub>2</sub> (Endkonz. 5 mM), 1 µl 3'-Oligonukleotid, 1 µl 5'-Oligonukleotid, 2 µl TaqMan Sonde, 2,5 µl cDNS, 2 µl dNTP-Mix (Endkonzentration 400 µmol/dNTP), 0,5 µl Taq-DNS-Polymerase verwendet und unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Initiale Denaturierung bei 95°C für 5 min., 40 Amplifikationszyklen mit je einem Denaturierungsschritt bei 95°C für 15 sec., einem Anlagerungsschritt („Annealing“) bei 60°C für 1 min. Abschließend wurden die Proben auf Raumtemperatur abgekühlt.

**Tabelle 13: Zweistichproben t-Test bei abhängigen Stichproben (Paarvergleichstest)**

	<i>Variable 1</i>	<i>Variable 2</i>
Mittelwert	0,90039679	0,90046081
Varianz	0,00052863	0,00039033
Beobachtungen	13	13
Pearson Korrelation	-0,1476869	
Hypothetische Differenz der Mittelwerte	0	
Freiheitsgrade (df)	12	
t-Statistik	-0,0071126	
P(T<=t) einseitig	0,49722094	
Kritischer t-Wert bei einseitigem t-Test	1,78228674	
P(T<=t) zweiseitig	0,99444188	
Kritischer t-Wert bei zweiseitigem t-Test	2,17881279	

### 2.2.3 Nachweis von Proteinen: *Western blot* und Immunhistochemie

#### 2.2.3.1 *Western blot*

Die Retinae wurden in einem Lyse-Puffer mit 50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1% Triton-X-100, 0,1 mM PMSF, 2µg/ml Pepstatin, Leupeptin und Aprotinin (pH 8,3) homogenisiert, auf Eis für 20 min. lysiert, bei 14 000 g für 15 min. zentrifugiert und der Proteingehalt im Überstand mittels BCA-Test (Pierce) bestimmt. Pro Gelbahn wurden 20µg des Lysates wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (Ausubel, 1987-, 10.2.6). Soweit im Text nicht anders vermerkt, wurden Trenngele mit einer Konzentration von 13% Acrylamid und Sammelgele mit 5% Acrylamid verwendet. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran transferiert. Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation in 5% entrahmter Trockenmilch in 0,1% Tween 20/PBS (PBS-T) abgesättigt. Die Membranen wurden mit Primärantikörpern gegen PIN (Dianova, 1:250, in 1% entrahmter Trockenmilch in PBS-T) inkubiert, und dreimal für 5 min. mit TBS-T gewaschen, mit HRP-konjugiertem Sekundärantikörper (Anti-Maus-IgG, 1:2000 in 1% entrahmter Trockenmilch in PBS-T). inkubiert und erneut dreimal für 5 min. mit TBS-T gewaschen. Die markierten Proteine wurden mit dem ECL-Plus-Reagenz (Amersham) nach dem Herstellerprotokoll detektiert.

### 2.2.3.2 Immunhistochemie

Für die den Nachweis von PIN auf zellulärer Ebene wurden als Primärantikörper (PAK) monoklonale Maus-IgG1-AK mit einem Molekulargewicht von 10 kDa (anti-PIN: Transduction Laboratories, Kat.-Nr.: P60220); für den Nachweis von nNOS *affinity purified rabbit polyclonal antibody* (anti-nNOS: R-20; Santa Cruz Biotechnology, Inc.) verwendet. Für den Nachweis des PAK wurde ein mit Alexa-488 konjugierter Ziegen-anti-Maus-Sekundärantikörper (SAK) bzw. Ziegen-anti-Kaninchen SAK eingesetzt. Für die mikroskopische Auswertung ein dieser Wellenlänge entsprechender Fluoreszenzfilter verwendet.

#### I. Antikörperapplikation

Nach dem Auftauen wurden die GS für 10 min. in PBS gelegt, mit 10 % Ziegenserum in PBS und 0,2 % Triton X 100 (TX) wurden unspezifische Bindungsstellen abgedeckt, der PAK in einer aufsteigenden Verdünnungsreihe (1:50, 1:100, 1:250) in PBS mit 2% Ziegenserum aufgebracht und bei 4°C über Nacht in einer Kammer mit hoher Luftfeuchte gelagert. Die GS wurden 3 mal 5 min. in PBS gewaschen, die SAK in einer Konzentration von 1: 250 in PBS mit 10% Ziegenserum appliziert, bei Raumtemperatur für ca. 4 h auf den GS belassen und anschließend die GS wieder für 3 mal 5 min. in PBS gewaschen und luftgetrocknet. Zur Fixierung wurden die GS mit Moviol beschichtet und abschließend mikroskopiert.

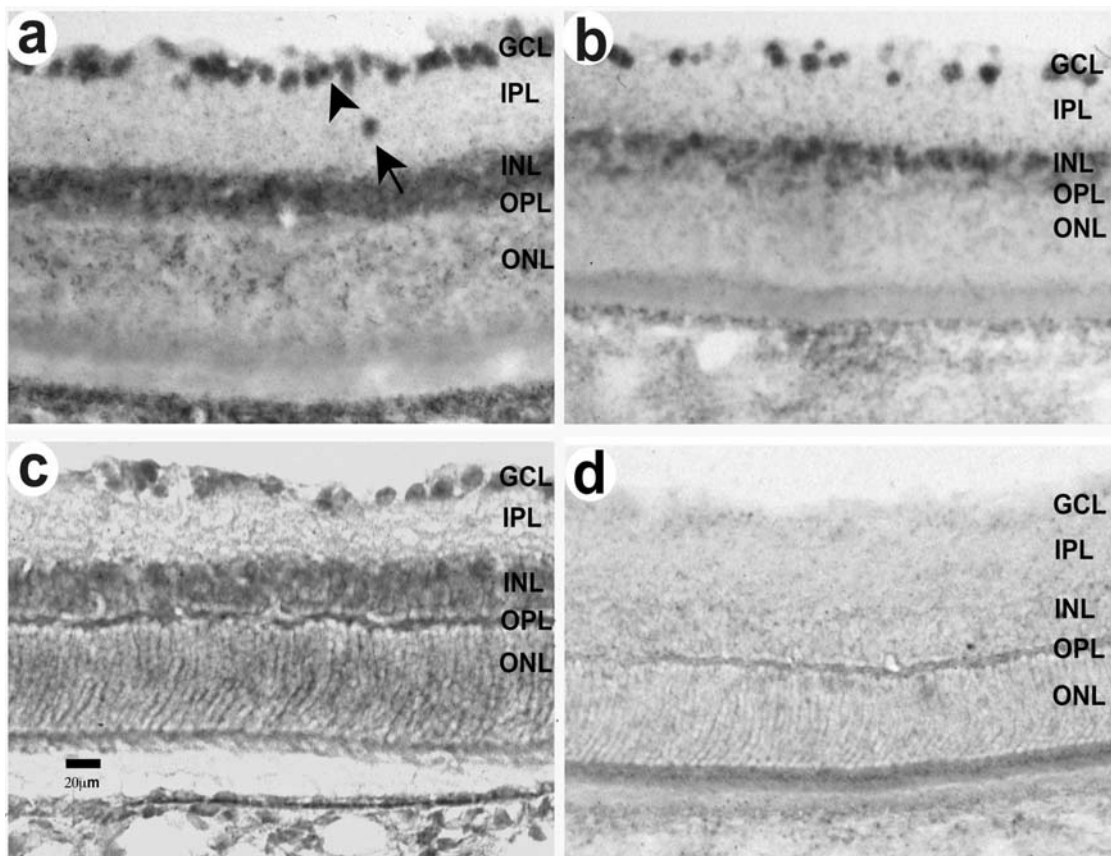
### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Nachweis von PIN-mRNS in der Retina durch *in situ* Hybridisierung (ISH)

Sprague Darley Ratten wurden, wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben, einseitig axotomiert und die Augen 6 d nach der Operation entnommen. Mittels ISH wurden die PIN-RNS-enhaltenden Zellschichten dargestellt. Im Folgenden werden diese mit der ISH-Sonde detektierbaren Gewebe als PIN-positiv bezeichnet. In den Gewebeschnitten (GS) der axotomierten Retinae (ARe), der transplantierten Retinae (TRe) und der Retinae der Kontrollaugen (KRe) zeigte sich eine schichtenspezifische Anfärbung, die besonders gut in Abbildung 4a zu sehen war. Stärker angefärbt waren die Ganglienzellschicht (GCL) und die innere Körnerschicht (INL), während in der inneren plexiformen Schicht (IPL), der äußeren plexiformen Schicht (OPL) und der äußeren Körnerschicht (ONL) das Signal deutlich schwächer war. In der Ganglienzellschicht der AR (Abb. 4a) zeigt sich eine fast geschlossene Kette PIN-positiver Zellen. Einige Zellen in der AR waren homogen gefärbt, in anderen Zellen scheint das Signal im Kern lokalisiert (Pfeilspitze in Abb. 4a). Die Größe der PIN-positiven Zellen variiert von ca. 5 – 12  $\mu\text{m}$ . In der inneren Körnerzellschicht erscheint die PIN-RNS-Signalgebung als ein überwiegend homogenes Band von ca. 20  $\mu\text{m}$  Dicke. Die Zellsomata waren nur vereinzelt angefärbt und schwer von ihrer Umgebung zu differenzieren. Vereinzelt waren auch in der inneren plexiformen Zellschicht Zellkörper signalgebend (Pfeil in Abb. 4a). In der GCL der TRe wurden durch die PIN-ISH-Sonde deutlich weniger Zellsomata als in den ARe detektiert. Das intrazelluläre Verteilungsmuster unterschied sich nicht wesentlich von dem der ARe. Die Größe der signalgebenden Fläche schien kleiner als die in der ARe dargestellte. Die Anfärbung von vertikal oder horizontal verlaufenden Zellausläufern war nicht zu beobachten. In der inneren Körnerzellschicht waren keine spezifischen Signale erkennbar. Die Intensität der inneren Körnerzellschicht der TRe war geringer als die der ARe. Aufgrund des schwächeren Umgebungssignal waren die Zellkörper klarer zu erkennen. Das in den ARe kräftig angefärbte Band der INL war in den TRe in Richtung der äußeren plexiformen Schicht ausgedünnt. In den Kontrollaugen war PIN ebenfalls exprimiert. Die Somata der Ganglienzellen der GCL waren deutlich zu erkennen. Im



kräftig dargestellten Band der INL traten die Zellkörper nur andeutungsweise aus ihrer Umgebung hervor. Die innere plexiforme Schicht war ohne spezifisches PIN-ISH-Sondensignal. In der äußeren plexiformen Schicht waren die *Nuclei* von der PIN-Signalgebung im Vergleich zu ihrer Umgebung fast nicht dargestellt. Die Anfärbung mit T7-Senssonden im Kontrollschnitt (**d**) wurde zur Unterscheidung von spezifischem PIN-RNS-darstellendem Signal und unspezifischem Hintergrundsignal und dem Nachweis der Spezifität der Antisensesonde durchgeführt. Sie zeigte keine spezifische Färbung.

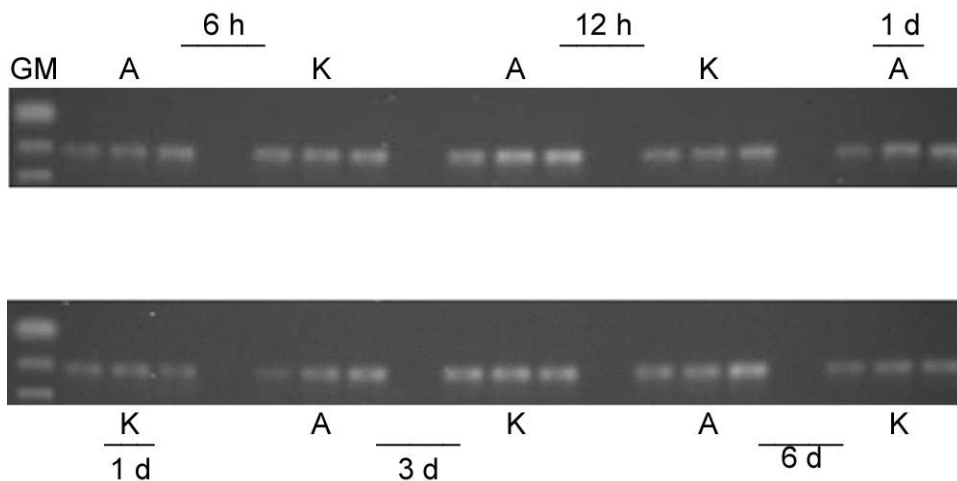


**Abbildung 4: Vergleichende Darstellung der Retinae nach ISH im Semidünnschnitt (16 µm)**

**a** Axotomie (6 d), **b** Tranplantation (21 d), **c** Kontrollretina (KR, 6 d), **d** KR (6 d) unter Verwendung von T7-Senssonden. GCL=Ganglienzellschicht, IPL=innere plexiforme Schicht, INL=innere Körnerzellschicht, OPL=äußere plexiforme Schicht, ONL=äußere Körnerzellschicht, Balken=20 µm.

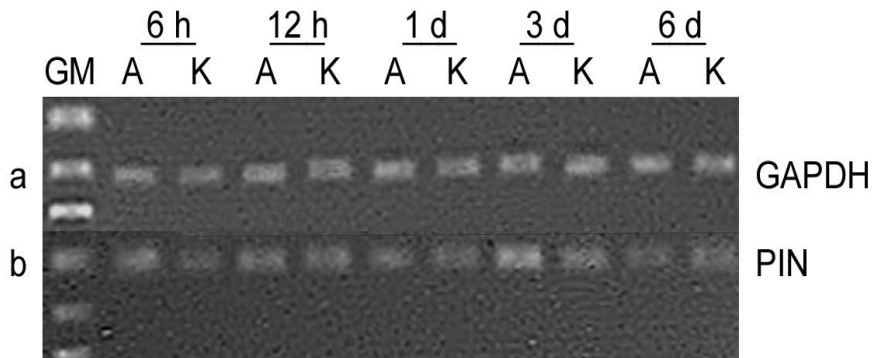
### 3.2 Bestimmung der PIN-Expression mittels semiquantitativer polymerase chain reaction (PCR)

Nachdem in der ISH PIN in den RGZn der GCL nachgewiesen werden konnte, habe ich die Regulation der PIN-m-RNS in axotomierten Retina(e) (AR) und Kontrollretina(e) (KR) mittels PCR untersucht. Die aus den Retinae gewonnene RNS wurde durch reverse Transkriptase in cDNS umgeschrieben. Ein konstitutiv exprimiertes Haushaltsgen, GAPDH, wurde als interner Standard verwendet. Ziel war es, bei unterschiedlichen cDNS-Konzentrationen das jeweilige Verhältnis der PIN-Expression zur GAPDH-Expression in verschiedenen Retinae (6 h, 12 h, 1 d, 3 d, 6 d nach Axotomie sowie Kontrolle) darzustellen. Durch Normalisierung auf die GAPDH-Expression wurde versucht, Unterschiede der PIN-Expression nachzuweisen. Durch Auswählen der entsprechenden Proben aus Verdünnungsreihen (Abb. 5) konnten so annähernd äquivalente Ausgangskonzentrationen der cDNS ermittelt und das Niveau der PIN-Expression für ARE und KRe demonstriert werden.



**Abbildung 5: Bestimmung der relativen Ausgangskonzentrationen verschiedener cDNS-Proben aus Retina mittels PCR für das GAPDH Gen**

GM=Größenmarker, A=Amplikon einer axotomierten Retina K=Amplikon einer Kontrollretina. Es wurden jeweils 3, 6 und 9  $\mu$ l Anfangsmenge pro Zeitpunkt und Gewebeart eingesetzt. Das PCR-Produkt von GAPDH hat eine Größe von 225 Bp.



**Abbildung 6: RT-PCR zum Nachweis der PIN und GAPDH Expression**

**GM**=Größenmarker, **A**=Amplikon einer axotomierten Retina, **K**=Amplikon einer Kontrollretina, **a**=225 Basenpaare, **b**=100 Basenpaare.

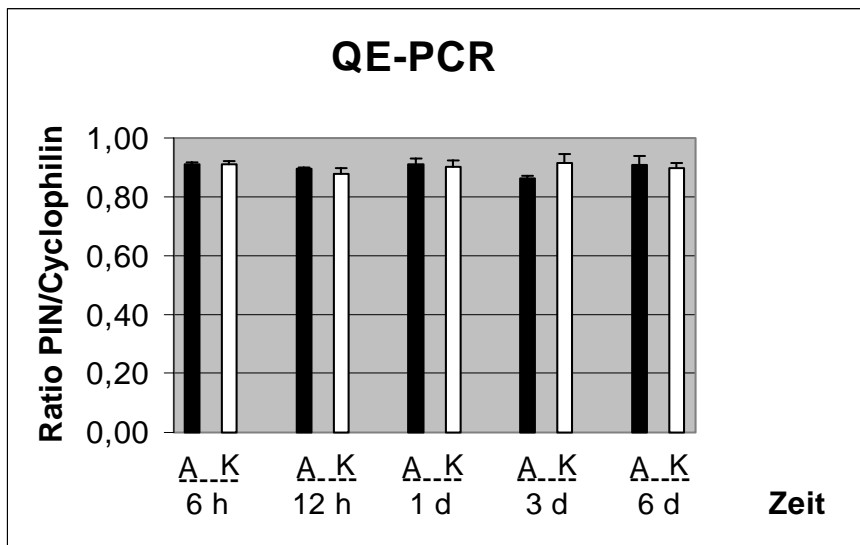
In Abbildung 6 waren im oberen Abschnitt auf der Höhe a (225 Basenpaare) die Amplika des Haushaltsgenes GAPDH zu sehen. Im unteren Abschnitt auf der Höhe b (100 Basenpaare) waren die PCR-Produkte von PIN aufgetragen. Von verschiedenen Zeitpunkten (6 h, 12 h, 1 d, 3 d, 6 d) post Axotomie wurden jeweils die Amplika der axotomierten Retina und die der KR aufgetragen, um Unterschiede der PIN-mRNS-Expression zwischen axotomierten und KR im Zeitverlauf beurteilen zu können. Das GAPDH Produkt hat wie beabsichtigt in allen Proben die fast gleiche Konzentration. Die PCR-Produkte von PIN in Abbildung 6 zeigen zum Zeitpunkt 6 h eine leicht stärkere Signalgebung der AR, nach 12 h war sie fast gleich, ebenso nach 1 d, nach 3 d überwiegt die Signalgebung der AR, bei 6 d überwiegt die Expression der KR die der axotomierten. Die in Abbildung 6 nach 3 d festgestellte erhöhte Expression von PIN in der AR gegenüber der KR lies sich in wiederholten PCRs nicht konsistent nachweisen. Insgesamt gaben die RT-PCR Experimente zu keinem untersuchten Zeitpunkt Hinweise auf ein verändertes Expressionsverhalten von PIN nach einer Axotomie.

### **3.3 Quantifizierung der PIN-Expression mittels quantitativer Echtzeit polymerase chain reaction (QE-PCR)**

Durch die quantitative Echtzeit-PCR wurde versucht, feinere Unterschiede, als die mit der semiquantitativen PCR nachweisbaren, zu detektieren. Dazu wurde m-RNS von ARe und KRe in cDNS transkribiert. Die cDNS wurde durch Taq-DNS-Polymerase amplifiziert. Durch die Vervielfältigung wurde ein zwischen den Primern gelegenes Interponat durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq-DNS-Polymerase abgebaut. Die Veränderung des Emissionsspektrums durch den Abbau des Interponates der gesuchten Sequenz wurde mit der Veränderung des Emissionsspektrums eines internen Standards (Cyclophylin) in Beziehung gesetzt und so die CT-Werte definiert.

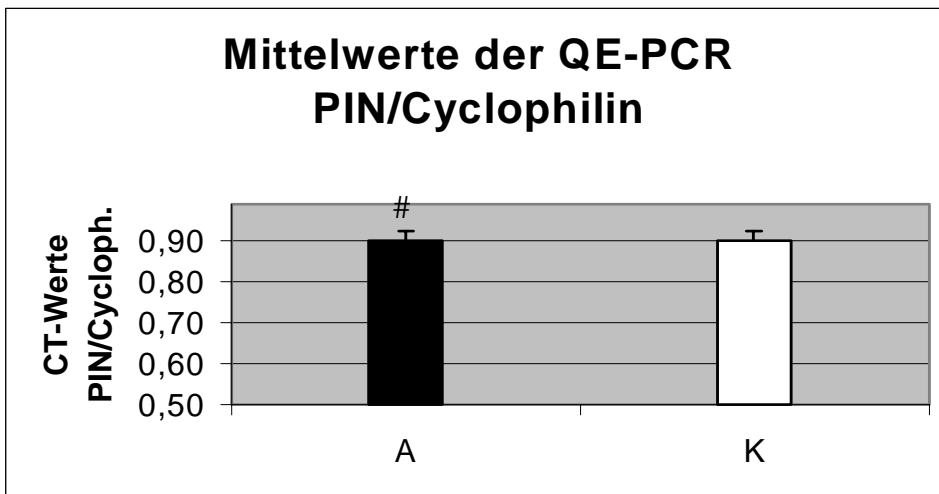
Abbildung 7 zeigt die in geringem Ausmaß differierenden Mittelwerte von AR und KR. Zu den Zeitpunkten 6 h, 12 h, 1 d, 3 d und 6 d wurden jeweils mindestens 9 bzw. 6 Proben aus 3 bzw. 2 Tieren eingesetzt (s. Material und Methoden). Aus den CT-Werten der einzelnen Proben wurden die Mittelwerte errechnet und die ARe als dunkle Balken gegen die KRe als helle Balken dargestellt. Insgesamt wurde die mRNS-Expression von 13 Tieren untersucht. Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte konnte eine signifikant erhöhte PIN-Expression in ARe gegenüber KRe gezeigt werden. Da die Zahl n für jede einzelne Gruppe klein war, wurde für Abbildung 8 alle CT-Werte von AR und KR gemittelt. Auch hier ließ sich kein Unterschied zwischen axotomierten Retinae und Kontrollretinae feststellen.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass auch die QE-PCR keinen signifikanten Unterschied der PIN-Expression zwischen AR und KR nachweisen konnte.



**Abbildung 7: PIN-Expression in axotomierten und in Kontrollretinae im Zeitverlauf durch QE-PCR**

Die auf Cyclophilin normalisierten Mittelwerte der PIN-Expression von axotomierten (A; dunkler Balken) bzw. Kontrollretinae (K; heller Balken) zu den Zeitpunkten 6 h, 24 h, 6 d (je drei Tiere) sowie 12 h und 3 d (je 2 Tiere). QE-PCR=quantitative Echtzeit PCR.

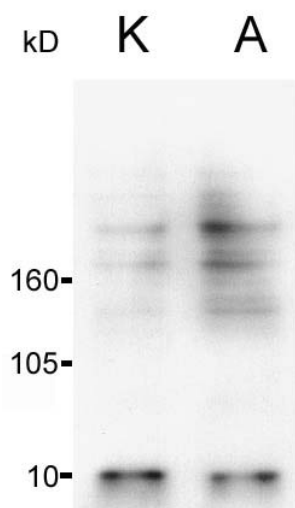


**Abbildung 8: Mittelwert der PIN-Expression von 13 axotomierten und Kontrollretinae**

Auf Cyclophilin normalisierte PIN-Mittelwerte von axotomierten (A; dunkler Balken) und Kontrollretinae (K; heller Balken). QE-PCR=quantitative Echtzeit PCR. Der Unterschied zwischen A und K ist nicht signifikant (Zweistichproben t-Test bei abhängigen Stichproben - Paarvergleichstest). n=13 Tiere,  $\alpha < 0,5$  Varianz von A: 0,00052863 und K: 0,00039033.

### 3.4 Nachweis des PIN-Proteins im Western blot

Die *Western-blot*-Experimente dienen zum quantitativen Nachweis des PIN-Protein. Die Tiere wurden axotomiert, die Retinae entnommen, das Gewebe wie oben beschrieben lysiert und 20 µg des Gewebelysates der ARe und KRe 6 d post Axotomie auf ein 5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach dem Transfer auf eine Nitrozellulosemembran und Inkubation mit einem Antiserum gegen das PIN-Protein konnten Banden bei 10 kD nachgewiesen werden. In Abbildung 9 zeigt sich auf Proteinebene eine höhere Expression von PIN in der KR als in der AR. In den von uns durchgeführten zusätzlichen *Western-blot*-Experimenten konnten übereinstimmend mit den Nachweisen auf mRNA-Ebene keine erhöhte PIN-Protein-Produktion in ARe nachgewiesen werden. Die Hybridisierungssignale mit höhermolekularen Proteinen entsprechen unspezifischen Bindungen mit dem verwendeten polyklonalen Antiserum. Zur Kontrolle der Spezifität der PIN Antikörper wurde parallel ein *Western blot* mit dem Präimmunserum durchgeführt. Erwartungsgemäß konnte keine 10 kD Bande mit dem Präimmunserum detektiert werden (Daten hier nicht gezeigt).



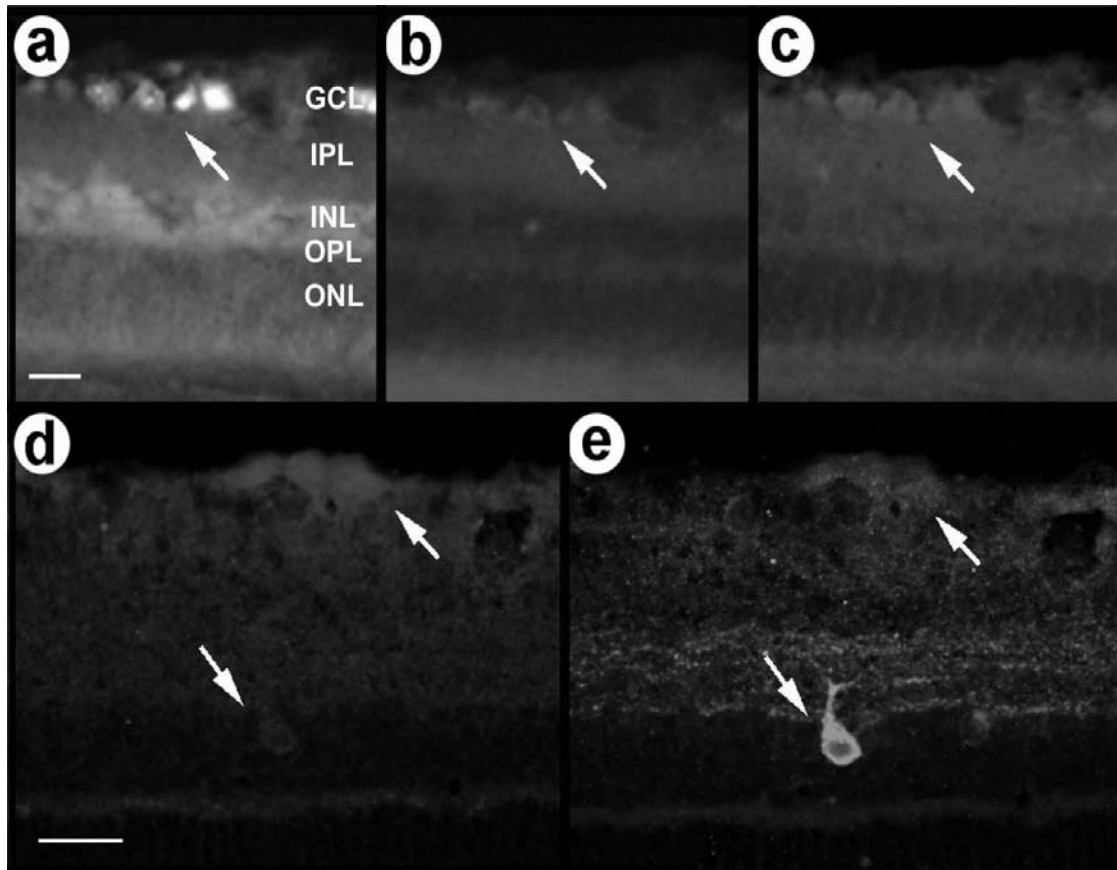
**Abbildung 9:** *Western blot* zum Nachweis von PIN in der Retina 6 d nach Axotomie

K=20 µg Gewebelysat einer KR, A=20 µg Gewebelysat einer AR, kD=Kilo Dalton.

### **3.5 Immunfluoreszenzfärbungen zum Proteinnachweis von PIN und nNOS in der Retina**

Zur Kolokalisation der PIN- und nNOS Proteintranslation in axotomierten Retinae (6 d) wurden Doppelfärbungen durchgeführt. Retinae der Ratten wurden axotomiert, am Axonstumpf mit einem fluorogoldmarkierten Schwamm bedeckt und so überlebende RGZn markiert. In Abb. 10a sind sie als helle, durch den Pfeil markierte Zellen zu sehen. Die RGZn zeigten eine inhomogene Signalgebung. Dabei war in den schwach markierten Zellen eher der zentrale Teil als die Peripherie von der Fluorogoldfärbung betroffen. In Abb. 10b wurden in der retinalen Ganglienzellschicht diejenigen Zellen durch einen Pfeil markiert, die gegenüber dem restlichen retinalen Gewebe eine erhöhte PIN-Expression aufweisen. Nur bei den fluorogoldaufnehmenden Zellen (Abb. 10a) war eine verstärkte PIN-Proteintranslation nachweisbar. Die Somata der Zellen waren schwach angefärbt, Zellausläufer waren nicht zu erkennen. In den anderen Zellschichten kommt es zu einer diffusen Anreicherung des PIN-Antikörpers. Die einzelnen Schichten lassen sich gegeneinander abgrenzen. In Abb. 10c wurde der GS mit primären Antikörpern gegen nNOS dargestellt. Der nNOS-AK zeigte ein stärkeres Signal in eben den Zellen der retinalen Ganglienzellschicht, die fluorogold- sowie PIN-positiv waren. Die übrigen Schichten wiesen eine diffuse Signalgebung auf. In der äußeren Körnerzellschicht war eine schwächere Detektion der Anti-nNOS-AK zu erkennen. In den Abb. 10 d und e wird ein vergrößerter Ausschnitt einer mit Anti-PIN-AK und Anti-nNOS-AK immunhistochemisch untersuchten Retina gezeigt. Die in Abb. 10b und c vorgestellte Doppelfärbung RGZn wird in Abb. 10d und e nochmals durch nach oben gerichtete Pfeile dargestellt. In Abb. 10d markiert in der inneren Körnerzellschicht ein nach unten gerichteter Pfeil vermutlich eine amakrine, eventuell auch bipolare Zelle der inneren Körnerzellschicht. Dabei erkennt man eine kräftige Anfärbung der Neuriten und des Zytoplasmas, bei schwächer dargestelltem Kern. Der Zellausläufer endet in der inneren plexiformen Schicht, wo er sich verzweigt. RGZn, mit denen die amakrine Zelle Synapsen bildeten, sind nicht sichtbar.

PIN und nNOS waren in RGZn und amakrinen Zellen der inneren Körnerzellschicht kolokalisiert. Die Spezifität der Sekundärantikörper wurde durch Omission der Primärantikörper (PAK) überprüft (nicht dargestellt).



**Abbildung 10: Doppelfärbung von PIN und nNOS-Protein in der Retina**

**a** mit Fluorogold vormarkierte RGZn, **b** und **d** Darstellung des PIN-Primärantikörpers (PAK) mittels Alexa-488-ligiertem Sekundärantikörper (SAK), **c** und **e** Darstellung des PAK gegen nNOS mittels Cy-3-legiertem-SAK. GCL=Ganglienzellschicht, IPL=innere plexiforme Schicht, INL=innere Körnerzellschicht, OPL=äußere plexiforme Schicht, ONL=äußere Körnerzellschicht, Balken=20 µm.



## 4 Diskussion

In *in situ* Hybridisierungen konnten sowohl das intrazelluläre Vorkommen der PIN-mRNS in retinalen Ganglienzellen (RGZn) als auch in der inneren Körnerschicht (INL) nachgewiesen werden. Während im Vergleich zwischen axotomierten Retinae (ARe) und Kontrollretinae (KRe) keine gravierenden Unterschiede festgestellt wurden (Abb. 4a und c), waren in den Retinae transplanteder Tiere (TRe) eine deutliche Verminderung der PIN-positiven RGZn und eine schwächere Anfärbung der INL zu erkennen (Abb. 4b). In früheren Untersuchungen an Ratten wurde zum einen mittels *Northern blot* die unterschiedliche Verteilung der PIN-Expression in einzelnen Hirnarealen (Greenwood et al., 1997) und zum anderen am zerebralen Ischämiemodell an Ratten unterschiedliche PIN-mRNS-Spiegel vor und nach Ischämie detektiert (Gillardon et al., 1998). Die höchste PIN-Expression lag in den ischämie-resistentesten Regionen, den pyramidalen Zellen der hippocampalen CA3 Region und den Körnerzellen des *Gyrus dentatus* (GD) vor. In der vulnerablen CA1 Region dagegen waren die PIN-mRNS-Expressionspiegel 7 d nach Ischämie signifikant erniedrigt und gingen mit einem Anstieg der postischämischen NADPH-Diaphorase-Aktivität, einem Indikator der nNOS Aktivität (Bredt et al., 1991), einher.

Am Axotomiemodell des optischen Nerven (ON) wurde der potenzierende Effekt der Neuroprotektion durch Inhibition von nNOS nach Gabe von *brain derived neurotrophic factor* (BDNF) belegt. 6 d nach Axotomie war die Anzahl der überlebenden Zellen bei Gabe von BDNF + N-Tert-Butyl-(2-Sulfonphenyl)-Nitron (S-PBN), einem Radikalfänger, gegenüber alleiniger BDNF-Gabe signifikant erhöht (Klöcker et al., 1998). Die Transsektion des ON führt innerhalb von 2 Wochen zum retrograden Untergang von über 80% der RGZn (Villegas Perez et al., 1988; Villegas-Perez et al., 1993; Mansour-Robaey et al., 1994). Dass in RGZn ebenso wie im Hippocampus (HC) einem Anstieg der Radikalbildung durch erhöhte Aktivität der nNOS mit einer gesteigerter PIN-mRNS-Produktion begegnet wird, konnte durch unsere Experimente nicht gezeigt werden. Weder ISH-, PCR- noch quantitative Echtzeit-PCR (QE-PCR) zeigte eine erhöhte PIN-Expression in axotomierten Retinae gegenüber den Kontrollen. Das unerwartete Ausbleiben der Hochregulation von PIN ließe sich durch folgende Annahmen erklären:

- i) Die Regulation PINs liegt außerhalb des untersuchten Zeitintervalls.
- ii) Die Nachweisgrenze der verwendeten Methoden ist zu niedrig.
- iii) In der Retina spielen andere Isoformen von NOS oder dessen regulierenden Faktoren eine Rolle als in Hirnregionen, in denen eine Regulation von PIN bereits gezeigt wurde.
- iv) Die Regulation der nNOS-Aktivität wird durch posttranslational verändertes PIN oder kompartimentäre Konzentrationsveränderungen von PIN hervorgerufen.

i) Hinweise für eine gewebeabhängige Variation des Expressionsmusters im Zeitverlauf ergeben sich aus vorausgegangenen Arbeiten. Nach Axotomie am *Nervus facialis* (NF) kam es nach 3-5 d zu einer erhöhten PIN-mRNS-Spiegeln in den Motorneuronen (Che et al., 2000). Im kainatinduzierten Epilepsiemodell (KEM) wurden im HC 8 h nach Kainat-Gabe erhöhte PIN-mRNS-Spiegel im GD dargestellt (Becker et al., 1999). Im Ischämiemodell zeigte sich eine veränderte PIN-Expression im HC im Zeitintervall von 6-7 h (Gillardon et al., 1998). In Zyklusoxxygenase 2 (COX-2) überexprimierenden PC-12 Zellen wurde eine gesteigerte PIN-mRNS-Produktion nachgewiesen (Chang et al., 2000). In vorausgegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wurde in RGZn die höchste mRNS-Transkription von nNOS 6 d post Axotomie gefunden (Klöcker et al., 1998; Klöcker et al., 1999). In den QE-PCR-Experimenten wurden die aus den vorherigen Arbeiten unserer Arbeitsgruppen bzw. der Literatur hervorgegangenen Erkenntnisse berücksichtigt. Die Zeitreihe von 6 h bis zu 6 d post Axotomie in der QE-PCR erbrachte keine Hinweise auf eine veränderte Genexpression (Abb. 7). Trotz der Untersuchung einer veränderten PIN-Expression in zuvor beschriebenen Zeitintervallen bleibt eine Expressionsregulation außerhalb des untersuchten Zeitraums (auch in Anbetracht der gewebeabhängigen Variationen des Expressionsmusters) nicht auszuschließen.

ii) Für die RT-PCR- bzw. QE-PCR- und *Western-blot*-Experimente wurde mRNS der gesamten Retina verwendet. Da RGZn weniger als 1 % der retinalen Zellen ausmachen (Jeon et al., 1998) würden nur dramatische Änderungen der Genexpression sichtbar werden. Durch zu diesem Zeitpunkt in unserem Labor noch nicht etablierte Einzelzell-PCR-Analysen (Lindqvist et al., 2002; Grigorenko und Yeh, 1994) könnte eine etwaige

mäßige Regulation der Expression in RGCs offensichtlich werden. Ebenso beschränkte sich die Aussagekraft der ISH auf die grobe Zuordnung zu zellulären Strukturen, so dass etwa ein Aufzeigen von PIN-mRNS-Spiegeln an einzelnen Zellorganellen mittels Elektronenmikroskopie, wie bei Fuhrmann et al. (2002) beschrieben, nicht möglich war. Für die reduzierte Anzahl an PIN-positiven Zellen in Gewebeschnitten transplantierter Tiere (TGS) kommen als Erklärung die insgesamt durch Apoptose reduzierte Zahl der RGZn auf ca. 40% Prozent (Dietz et al., 2001) und eine verminderte Genexpression in einzelnen Zellen in Frage.

iii) Aus den in i) und ii) vorgestellten Arbeiten geht hervor, dass PIN sowohl in natürlichem als auch in traumatisiertem neuronalem Gewebe unterschiedliche Expressionsmuster aufweist.

Im Ischämiemodell (Gillardon et al., 1998) und im durch kainatinduzierten Epilepsie Modell (KEM); (Becker et al., 1999) fanden sich höhere PIN-mRNS-Konzentrationen im *Gyrus dentatus* als in der Hippocampus-Region CA1. Für die CA3 Region des Hippocampus konnte die gesteigerte Expression von *c-Jun amino terminal kinase* (JNK) *interacting protein-1* (JIP-1), einem mit der glutamatinduzierten Apoptose in Zusammenhang stehenden Protein (Dickens et al., 1997), gezeigt werden (Becker et al., 1999). Ebenso wie in den hippocampalen CA1/CA3 Regionen könnten in RGZn andere Reaktionsschemata als die Hochregulation von PIN als Antwort auf eine traumatische Läsion aktiviert werden. Die Erhöhung der Expression verschiedener Gene wurde im Ischämiemodell beobachtet. Diese lässt sich in vier Gruppen aufteilen (Iadecola, 1997):

1. *Immediate-early genes* (c-fos, c-jun, zif 268; Hüll und Bähr, 1994; Herdegen et al., 1993; Kiessling und Gass, 1994)
2. Hitzeschockproteine (HSP 27, HSP 70, HSP 72; Nowak und Jacewicz, 1994; Sharp und Sagar, 1994)
3. Adhäsionsmoleküle ( ICAM-1, ELAM-1, P-Selektin; Wang und Feuerstein, 1995)
4. Zytokine (TNF  $\alpha$ , IL 1 $\beta$ , IL 6; Barone und Feuerstein, 1999; Feuerstein et al., 1997; Iadecola und Ross, 1997)

Neben einer veränderten Genregulation konnten neuroprotektive Effekte mit pharmakologischer Inhibition von NOS gezeigt werden. Dabei hing die neuroprotektive Wirkung sowohl von der inhibierten Isoform von NOS als auch vom Zeitpunkt der

Anwendung des Inhibitors ab. Unter Verwendung von 7 Nitroindazol (7-NI) und S-Methylisothioureido-L-Norvalin (ARL 17477), selektiven nNOS-Inhibitoren, konnte der Schaden nach zerebraler Ischämie reduziert werden (Nagafuji et al., 1995; Zhang et al., 1996a). Ähnlich positive Auswirkungen ergab die Inhibition von iNOS durch Aminoguanidin. Es reduzierte die postischämische iNOS-Aktivität und die Infarktgröße nach Okklusion der *Arteria cerebri media* (OMCA). nNOS-Enzymaktivität, Blutdruck oder der zerebralen Blutfluss blieben jedoch unverändert (Iadecola et al., 1996; Zhang et al., 1996b). Die durch die pharmakologische Inhibition von NOS gewonnenen Erkenntnisse konnten durch Arbeiten an *knock-out-Mäusen* bestätigt und erweitert werden. *nNOS-knock-out-Mäuse* zeigten zu den Kontrolltieren eine um 40% reduzierte Infarktgröße (Huang et al., 1994). In *iNOS-knock-out-Mäusen* war die Infarktgröße verglichen mit dem Wildtyp wie bei der Inhibition mit Aminoguanidin verkleinert (Iadecola, 1997). *eNOS-knock-outs* dagegen wiesen einen geringeren Blutfluss in der Penumbra und damit einhergehend ein vergrößertes Infarktareal nach OMCA auf (Huang et al., 1996). In der frühen postischämischen Phase (<2 h) überwogen die positiven vasodilatativen Effekte der eNOS induzierten NO-Produktion, aber bereits ein paar Stunden post OMCA war die Freisetzung von NO nicht mehr neuroprotektiv (Zhang und Iadecola, 1994). Die Abgabe großer Mengen von NO durch eine gesteigerte iNOS-Expression beginnt nach ca. 6 h Ischämie und führt zur verzögerten Regeneration des geschädigten neuronalen Gewebes.

Die Aktivierung von nNOS erwies sich auch in Untersuchungen über die Auswirkungen auf das Überleben von Zellen nach Exzitotoxizität an Zellkulturen retinaler Neuronen als negativ. Diese Erkenntnisse über den Nutzen oder Schaden einer Inhibition von NOS in Abhängigkeit von den einzelnen Isoformen sowie dem untersuchten Zeitpunkt wurde durch vorausgegangene Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe auch am Axotomiemodell des optischen Nerven bestätigt (Klöcker et al., 1999).

Auf Proteinebene konnte keine veränderte Translation zwischen ARE und KRe nachgewiesen werden, weder in *Western-blot*- noch in den immunhistochemischen Experimenten. Bei Doppelfärbungen der ARE mit Anti-nNOS-Antikörpern (AK) und Anti-PIN-AK zeigte sich in einigen RGZn und amakrinen Zellen der INL eine Kolokalisation der beiden AK (Abb. 10). Frühere Untersuchungen an axotomierten Retinae ergaben eine vermehrte mRNS-Synthese von nNOS nach 6 d. Dabei war das über NADPH-Diaphorasmessung ermittelte Aktivitätsniveau von nNOS der RGZn nur

in ihren Axone wesentlich erhöht (Klöcker et al., 1999). Aufgrund der gemachten Beobachtungen wurde vermutet, dass eine gesteigerte Enzymaktivität nNOS nach seiner Hochregulation in ARE durch einen Inhibitor in RGZn begrenzt wird. Für eine vermehrte Expression PINs in RGZn nach Hochregulation von nNOS in ARE gaben die AK-Färbungen (Abb. 10) sowie die *Western-blot*-Experimente keinen Anhalt. In Anbetracht der Kolo-kalisation von PIN und nNOS in einigen retinalen Ganglienzellen und der fast unveränderten Aktivität in RGZn nach Axotomie bei vermehrter nNOS-Genexpression stellt sich die Frage, ob und in welcher Form PIN bei unveränderter Proteintranslation die Enzymaktivität von nNOS regulieren könnte, bzw. wie diese durch veränderte nNOS-Aktivität hervorgerufen werden könnte.

iv) Denkbar wäre a) eine posttranslationale Modifikation oder b) die intrazelluläre Umverteilung und kompartmentäre Konzentration PINs in Regionen mit erhöhter nNOS-Aktivität.

Für nNOS sind zahlreiche indirekte Wechselwirkungen durch Beeinflussung von Signaltransduktionsprozessen, der Aktivitätsänderung der löslichen Guanylylzyklase (Crave und eRubertis, 1978; Ignarro et al., 1984; Wolin et al., 1982), Stimulation der Zyklooxygenase 1 und 2 (Salvemini et al., 1993; De Caterina et al., 1995), Regulation der 12-Lipoxygenase in Thrombozyten (Nakatsuka und Osawa, 1994), Zytochrome P 450 (Khatsenko et al., 1993; Stadler et al., 1994) sowie direkte Modifikation der Proteinstruktur durch Nitrosilierung schwefelhaltiger Aminosäuren (AS) beschrieben. Für eine Übersicht siehe Gross und Wolin (1995).

Dass die Proteinaktivität nachhaltig durch Nitrosilierung verändert werden kann, wurde bereits für G-Proteine (Lander et al., 1993a), Signaltransduktionsprozesse und Rezeptoren (Bolotina et al., 1994; Lei et al., 1992); Proteinkinasen (Gopalakrishna et al., 1993; Pendino et al., 1993), Proteinphosphatasen (Lander et al., 1993b), transkriptionsaktivierende Faktoren (Haby et al., 1994; Lander et al., 1993b; Pendino et al., 1993; Peunova und Enikolopov, 1993) und Proteasen (Devi et al., 1994) gezeigt. Die Untersuchungen der Peptidstruktur ergaben weitere Hinweise auf mögliche Veränderungen des Reaktionsverhaltens von PIN. Zwei N-terminale antiparallele  $\alpha$ -Helices liegen über einer Lage von vier antiparallelen Peptidketten mit  $\beta$ -Faltblattstruktur am C-terminalen Ende. Die  $\beta$ -Peptidketten formen eine hydrophobe Bindungsstelle, die von positiv geladenen Rändern umgeben ist (Tochio et al., 1998).

Die PIN-bindende Region (PBR) von nNOS, M<sup>228</sup>KDTGIQVDRDLGKSH<sup>244</sup>, enthält dazu passende, hydrophobe AS. Neben nNOS als Reaktionspartner PINs kommen aufgrund der vorhandenen AS-Sequenz, humanes Myosin V, die intermediäre Dyneinkette von Nagern und humanes Dynamin, ein mikrotubulusassoziiertes Protein, in Frage (Liang et al., 1999). Die konzentrationsabhängige (Tochio et al., 1998) und die pH-abhängige (Liang et al., 1999) posttranslationale Aggregation PINs sind Erklärungsmodelle für die Regulation von nNOS. Durch die Aggregation PINs könnte das für eine Inhibition von nNOS günstige stöchiometrische Verhältnis von nNOS 2 : 1 zu PIN (Fan et al., 1998) vermehrt gebildet und so die nNOS-Aktivität reduziert werden. Ein potentieller Rückkopplungsmechanismus in axotomierten retinalen Ganglienzellen könnte wie folgt aussehen: NMDA-Rezeptoren-vermittelter Kalziumeinstrom führt zu einer gesteigerten Bindung von Calmodulin an nNOS (Bredt und Snyder, 1990), worauf sich dessen Aktivität erhöht (Iadecola, 1997). Eine gesteigerte Aktivität von nNOS resultiert in einer von der Menge der vorhandenen Substrate abhängigen NO-, Peroxynitrit- oder Superoxidbildung. Ein dadurch veränderter pH-Wert wirkt sich auf das Aggregationsverhalten PINs aus und beeinflusst so die nNOS Aktivität. Doppelfärbungen mit NADPH-Diaphorase und Antikörpern gegen PIN könnten klären, inwieweit das Vorkommen von PIN-Protein in RGZn die Aktivität von nNOS beeinflusst.

#### **4.1 PIN als ubiquitär exprimiertes Gen und hochkonserviertes Protein**

Jaffrey konnte zeigen, dass PIN-mRNS in absteigender Quantität in testikulärem, zerebralem und peripherem Gewebe vorlag. Die Aminosäuresequenz war zu 92% mit der von Nematoden und Ratten identisch (Jaffrey und Snyder, 1996). In Untersuchungen an *Drosophila melanogaster* konnte ein Homologon von PIN identifiziert werden. Das Polypeptid des identifizierten Genes bestand ebenfalls aus 89 Aminosäuren und wurde als zytoplasmatische Dyneinleichtkette (DLC-1<sup>2</sup>) charakterisiert (Dick et al., 1996). Die Aminosäuresequenz wies eine starke Ähnlichkeit mit dem axonemalen 8 kD äußeren Arm der Dyneinleichtkette von *Chlamydomonas flagella* auf.

---

<sup>2</sup> Für PIN wird in einigen Artikeln auch *Dynein light chain* (DLC, DLC-1) als Bezeichnung verwendet, in dieser Arbeit wurde der Einfachheit halber weitestgehend auf eine unterschiedliche Nomenklatur verzichtet.

Die *Northern-Blot*-Experimente an verschiedenen Entwicklungsstadien der Fruchtfliege weisen auf eine ubiquitäre Expression des Genes hin. Dabei zeigte sich neben dem 2,4 kB Transkript ein besonders in adultem cranialem Gewebe exprimiertes 4,5 kB Transkript. In ISH-Untersuchungen an embryonalen Schnitten mit für das 4,5 kB Transkript spezifischen RNS-Sonden waren Strukturen des ZNS angefärbt.

Auch in Säugetieren wurden in *Northern-blot*-Experimenten mit zerebellärer mRNA von Ratten ebenfalls zwei verschiedene Transkripte dargestellt (Greenwood et al., 1997). Partielle Mutationen des PIN-Genes in *Drosophila melanogaster* führten zu multiplen, auf eine Beteiligung des Zytoskelettes hinweisenden (Deformation der Eikammern und der physiologischen Zellstruktur) Malformationen, die vollständige Deletion des Genes verursachte embryonale Degeneration und apoptotischen Zelltod. In Antikörperfärbungen mit Antikörpern gegen das vom 2,4 kB PIN Transkript kodierte Protein und Tubulin konnte die Kolokalisation beider Proteine im Zytoplasma demonstriert werden. Dyneinleichtketten sind in die Initiation der Spermienmotilität (Stephens und Prior, 1992) involviert und der äußere Arm der Dyneinleichtkette interagiert mit den *intermediate chains* des Dyneinkomplexes, IC 78 und IC 69 (King et al., 1991). Die Assoziation und Interaktion PINs mit unterschiedlichen zellulären Bestandteilen wie Flagellatendynein (King und Patel-King, 1995), Myosin V (Espindola et al., 1996), I $\kappa$ B $\alpha$  (Crepieux et al., 1997) und zytosolischem Dynein (King et al., 1996) wurde gezeigt. Diesen Ergebnissen folgte der Nachweis der PIN-Expression an diaphragmalen Muskelzellen von Ratten, Mäusen und Menschen, in denen PIN ebenfalls mit einer *intermediate chain* des Dyneinkomplexes, IC 74, im *Western blot* kolokalisiert war (Guo et al., 1999). Die Rolle PINs als Komponente des Dyneinkomplexes, der für den retrograden axonalen Transport von Vesikeln, die Kernmigration und Bewegungen der Zellorganellen, wie Golgiapparat, Lysosomen, und mitotischen Spindelfunktionen wichtig ist (Hirokawa et al., 1998), ist im Gegensatz zu den Untereinheiten des Dyneinkomplexes, der schweren, intermediären und leichten intermediären Kette, in Bezug auf Lokalisation und funktionellen Bedeutung bis zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht umfassend geklärt.

Erst kürzlich wurde die Beteiligung PINs an der Pathogenese der Muskeldystrophie Typ Duchenne (DMD) mit vermehrtem Nachweis von PIN-mRNA in Muskelzellen von DMX-Mäusen, einem DMD-Tiermodell (Guo et al., 2001), sowie die Kolokalisation PINs mit dem tubulinbindenden Protein Gephyrin nachgewiesen (Fuhrmann et al., 2002).

In hippocampalen Neuronenkulturen wurde neben zytoplasmatischen Vorkommens immunoreaktiver Strukturen mittels Synaptophysin eine vermehrte präsynaptische, durch Elektronenmikroskopie (EM) an spinalen Vorderhornzellen eine erhöhte postsynaptische Anreicherung PINs dargestellt (Fuhrmann et al., 2002). Dabei waren inhibitorische, durch Gephyrin angefärbte Synapsen ebenfalls PIN-positiv und ergaben Hinweise auf ein Zusammenspiel beider Proteine bei der Zusammensetzung von Neurotransmitterrezeptoren an inhibitorischen Synapsen. Die Beteiligung PINs an exzitatorischen Synapsen war auf Grund morphologischer Kriterien in den EM-Aufnahmen vermutet worden und wird durch die Kolo-kalisation von GKAP, PSD-95 und PIN in dendritischen Dornfortsätzen von hippocampalen Neuronen unterstützt (Naisbitt et al., 2000). In Anbetracht dieser Ergebnisse, der hohen Konservierung PINs in den verschiedenen Spezies, der Beteiligung an einer dystrophen Muskelerkrankung und bei der Zusammensetzung von Neurotransmitterrezeptoren scheint auch bei der Einordnung der in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse die Berücksichtigung eines über die Inhibition von nNOS hinausgehendes Funktionsspektrum PINs als wesentlich. PIN bildet Dimere, von denen beide Monomere Liganden binden können (Liang et al., 1999). PIN kann somit einen Interaktionspartner oder zwei voneinander unabhängige Proteine binden. Diese strukturelle Eigenschaft lässt (Fuhrmann et al., 2002), zusammen mit der stöchiometrischen Assoziation von Dynein und Myosin-Va-Komplexen mit PIN-Proteinen (King et al., 1996; Espindola et al., 2000) und der Anzahl der PIN-bindenden Proteine eine Rekrutierung von vielfältigen Frachtproteinen durch PIN zu den Motoproteinkomplexen vermuten. Diese Adaptorfunktion konnte an der 14 kD Leichtkette Tctex-1 im Transportsystem der Rhodopsinvesikel vorgestellt werden (Tai et al., 1999). Interaktionen von PIN sequestrierten die proapoptischen Proteine, Bim und Bmf aus der Bcl-2 Proteinfamilie vom Aktin-Zytoskelett bzw. den Mikrotubuli (Puthalakath et al., 2001; O'Connor et al., 1998).

In *Drosophila melanogaster* bindet PIN an Swallow, einem an der mikrotubulusabhängigen, asymmetrischen Lokalisation der *bicoid* mRNA während der Midoogenese involviertem Protein. Eine Mutante ohne PIN-bindende Region von Swallow ist weder am anterioren Pol der Oozyte lokalisiert, noch in der Lage, *bicoid* mRNA von dort fernzuhalten (Schnorrer et al., 2000).

In mit afrikanischem Schweinefiebertvirus (ASFV) infizierten Zellen kolo-kalisieren p54 und PIN am Mikrotubulusorganisationszentrum, welches eine Schlüsselfunktion beim



zu den Minusenden der Mikrotubuli gerichteten Transport innehat. Die Inhibition der Dyneinfunktion verlangsamte die ASFV-Infektion (Alonso et al., 2001). Die Einordnung der in dieser Arbeit vorgelegten Ergebnisse hebt die Bedeutung einer zum jetzigen Zeitpunkt noch unvollständigen Unterscheidung zwischen den oben zitierten elementaren zytoskelettalen und den daraus hervorgehenden vielfältigen Interaktionsmöglichkeiten und den enzyminhibitorischen Funktionen im zentralen Nervensystem PINs hervor. Mögliche Veränderungen eines die NOS-Aktivität beeinflussenden Teiles der PIN-Transkripte in den ARe könnten gegenüber der mRNA eines ubiquitär translatiertem Proteines einen so kleinen Bruchteil ausmachen, dass der Nachweis einer veränderten Transkription misslingt.

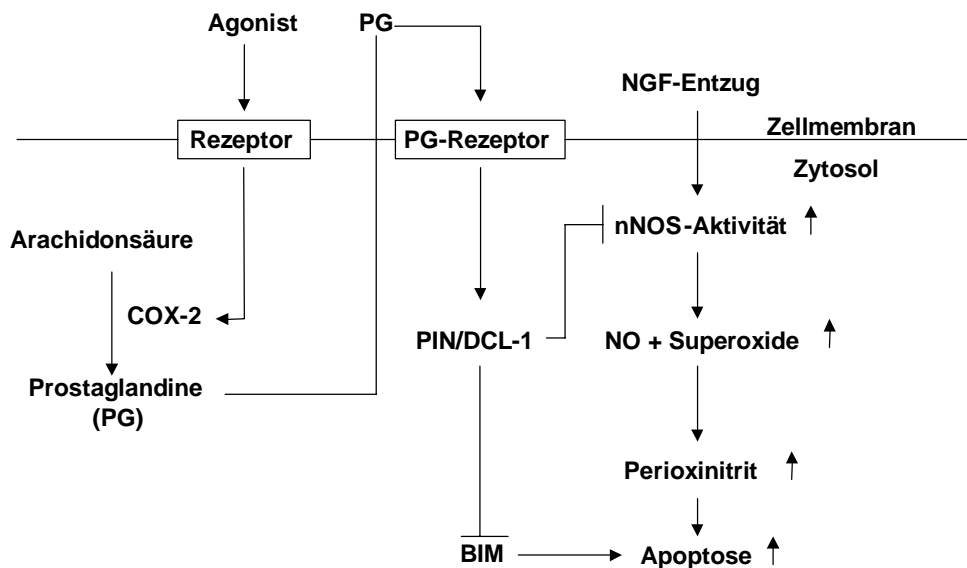
#### **4.2 PIN ist an der Apoptoseregulation durch COX-2 beteiligt.**

Die antiapoptischen Eigenschaft PINs konnten auch in einer Arbeit gezeigt werden, in der die PIN-Expression durch die Überexpression der induzierbaren Form der Zyklooxygenase (COX-2) an PC-Zellkulturen stimuliert wurde (Chang et al., 2000). In adenoviral transfizierten, COX-2-überexpremierenden Zellen (PC-XII) wurde im Vergleich zu pseudotransfizierten PC Zellen (PC-MT<sup>3</sup>) eine 6-fach höhere PIN mRNA Menge im *Northern blot* gemessen. Außerdem war in PC-MT Zellen 3-6 h nach Entzug des Nervenwachstumsfaktors (NGF) Caspase 3, einer Schlüsselprotease in der Vollzugsphase der Apoptose (Thornberry und Lazebnik, 1998), sowie ein 17 kd schweres Spaltprodukt im *Western blot* im Vergleich mit PC-XII Zellen vermehrt detektierbar. PIN-überexprimierende Zellen (PC-PIN) waren gegenüber durch NGF-Entzug induzierter Apoptose resistenter als die Kontrollen. Während in PC-12 Zellkulturen bis zu 30% der Zellen des Wildtyps (WT) 17 h nach NGF-Entzug als apoptotisch identifiziert wurden, waren nur einzelne PC-PIN Zellen betroffen (Chang et al., 2000; keine Prozentangabe angegeben). Die nNOS-Proteintranslation war in allen Zelllinien erhöht. In PC-PIN und in PC-12 Zellkulturen ergaben sich, als Hinweis auf eine Inhibition von nNOS durch PIN oder COX-2 aber deutlich niedrigere Werte in der nNOS-Aktivitätsmessung. Die Vermutung protektiver Eigenschaften der nNOS-Inhibition durch PIN-Überexpression wurde durch die Beobachtung erhärtet, dass die Gabe des selektiven nNOS-Inhibitors N<sup>5</sup>-(1-Imino-3-butenyl)-L-Ornithin (L-VNIO;

---

<sup>3</sup> MT = *mock transfected*

Babu und Griffith, 1998) in PC-MT Zellen Apoptose verhindern konnte, in PC-XII Zellen aber keinen positiven Effekt auf das Zellüberleben zeigte. Die Verabreichung des NO-Donators, Diethylenetriamine-NO-Säure (DETA-NONate), führte in PC-MT Zellen zur vermehrten Aktivierung der Caspase-3, in PC-XII Zellen blieb eine gesteigerte Aktivierung aus. Die von Chang et al. (2000) gemachten Untersuchungen demonstrieren, dass die Induktion der Apoptose in differenzierten PC-12 Zellen nach NGF-Entzug durch die Überexpression von COX-2 verhindert werden kann. Die antiapoptotische Funktion der COX-2 Überexpression wird zumindest partiell auf die Regulation von nNOS durch eine Hochregulation der PIN-Expression zurückgeführt. Die PIN-Hochregulation war dabei von der Aktivität des COX-2 Enzyms abhängig; Indometacin, ein nichtsteroidales Antiphlogistikum (NSA), hemmte die Induktion der PIN-Expression, während sie durch Prostaglandin E<sub>2</sub> gesteigert wurde. Ein Erklärungsmodell für die durch COX-2 Überexpression möglicherweise eingeleitete Schutzmechanismen wird in Abbildung 11 dargestellt.



Modifiziert nach: Chang et al., 2000

### Abbildung 11: Modell einer PIN vermittelten Apoptoseregulation durch COX-2

NGF-Entzug führt zu erhöhter nNOS Expression und Aktivität in PC-12 Zellen. Überschüssiges NO und Superoxid trägt durch die Produktion von Peroxynitrit zum Zelltod bei. Durch Agonisten hervorgerufene Stimulation der COX-2 Expression geht mit der gesteigerten Produktion von PGE<sub>2</sub> einher. PGE<sub>2</sub> wird von den Zellen freigesetzt und ist in der Lage, PG-Rezeptoren zu stimulieren. Die dadurch induzierte PIN/DLC-1 Expressionssteigerung resultiert zum einen in einer vermehrten Assoziation von PIN/DLC-1 mit nNOS und reduziert so die NO- und Superoxidproduktion. Zum andern wird die Aktivierung der Apoptose durch BIM inhibiert. COX-2=induzierbare Zyklooxygenase, PIN/DLC-1=Protein Inhibitor of NOS/ Dynein light chain-1, NGF=Nervenwachstumsfaktor, nNOS=neurale Stickstoffmonoxidsynthase, NO=Stickstoffmonoxid, PGE<sub>2</sub>=Prostaglandin E<sub>2</sub>.

### **4.3 Ausblick**

Die in dieser Arbeit vorgelegten Beobachtungen zeigen eine weitgehend unveränderte Genexpression und Proteintranslation von PIN nach Axotomie (und Transplantation) in retinalen Ganglienzellen von Ratten. Die bisher in der Literatur veröffentlichten Untersuchungen am Axotomiemodell des optischen Nerven und am zerebralen Ischämiemodell ließen eine Beteiligung des *protein inhibitor of nitric oxide synthase* an der Regulation der neuronalen Stickstoffmonoxidsynthase via Genregulation oder Veränderung des Aktivitätsniveaus vermuten. Die hier gezeigte Kollokalisierung PINs und nNOS in axotomierten retinalen Ganglienzellen und die bekannten Funktionen PINs bildet einen Ausgangspunkt für weitere Untersuchung der nNOS-Regulationsmechanismen.

Das Axotomiemodell des optischen Nerven wird weithin angewendet, um die molekularen Mechanismen der neuronalen Apoptose zu verstehen, die an der Pathogenese humaner neurodegenerativer Krankheiten, zerebrovaskulären Störungen und zerebralen Traumata beteiligt ist. Ziel ist die Identifikation neuer Zielstrukturen für neuroprotektive und regenerative Therapien. Wenn sich die an retinalen Ganglienzellen gewonnenen Erkenntnisse auch auf andere neuronale Zellpopulationen und Läsionsmodelle übertragen lassen, können die hier vorgestellten Ergebnisse zu einem erweiterten Verständnis der Regulationsmechanismen von nNOS im ZNS beitragen.

## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der Expression des *protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase* (PIN) in axotomierten Retinae adulter Ratten untersucht. Durch Einsatz von mRNS-Sonden und monoklonalen Antikörpern konnte die schichtenspezifische Verteilung der PIN-mRNS bzw. des PIN-Proteins in der Retina dargestellt werden. Unter Verwendung von semiquantitativer- und Echtzeit-PCR sowie *Western blots* wurden zeitliche und quantitative Bestimmungen der Expression durchgeführt. In Kolokalisationsexperimenten mit PIN- und nNOS-Antikörpern wurde deren räumliche Verteilung in der Retina untersucht. Die Rolle PINs als Inhibitor der neuronalen Stickstoffsynthase (nNOS) und als möglicher Bestandteil des zytoskelettalen Dyneinmotorkomplexes wurde diskutiert.

*In situ* Hybridisierungen (ISH) haben die stärkste PIN-Expression in der retinalen Ganglienzellschicht (GCL) und in der inneren Körnerzellschicht (INL) gezeigt. Eine regulierte Expression in axotomierten retinalen Ganglienzellen und ihren Kontrollen war nicht nachweisbar. In Retinae transplanteder Tiere war zwar die Anzahl der PIN-immunopositiven Zellen im Vergleich zu den axotomierten Retinae (ARE) erniedrigt. Die Stärke der Expression in einzelnen Zellen unterschied sich allerdings nicht erkennbar von der in ARE. Die Befunde aus RT-PCR- und QE-PCR-Experimenten haben in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der ISH keine Hinweise auf eine differentielle PIN-Expression ergeben: Zu den Zeitpunkten 6 h, 12 h, 1 d, 3 d und 6 d nach Axotomie fanden sich keine signifikanten Unterschiede der PIN-Expression zwischen ARE und Kontrollretinae.

In ARE ist der Nachweis der Kolokalisation von PIN- und nNOS-Protein in Zellen der retinalen Ganglienzellschicht erfolgt. Ausschließlich überlebende, durch fluorogoldmarkierte Neurone wiesen eine Doppelfärbung auf. Neben den retinalen Ganglienzellen ließen sich vereinzelt in der inneren Körnerzellschicht Zellen mit PIN- und nNOS-Antikörpern detektieren, während die übrigen Zellschichten der Retina eine diffuse Färbung aufwiesen. Quantitative Analysen mittels *Western blots* haben bestätigt, dass PIN nach Axotomie nicht differentiell reguliert ist.

PIN wirkt in verschiedenen Paradigmen neuroprotektiv, unter anderem, in dem es als Inhibitor von NOS zur verringerten posttraumatischen NO-Produktion im zentralen Nervensystem beiträgt. PIN ist in der Retina sowohl in ihrem physiologischen Zustand als auch in der axotomierten Retina vorhanden. Die vorliegende Arbeit gibt keine Hinweise auf die zunächst vermutete Hochregulation von PIN nach Axotomie in überlebenden retinalen Ganglienzellen.

## 6 Verzeichnisse

### 6.1 Literaturverzeichnis

- Abu-Soud, H. M., Stuehr, D. J. (1993)  
Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90, 10769-72.
- Ahmad, I., Leinders-Zufall, T., Kocsis, J. D., Shepherd, G. M., Zufall, F., Barnstable, C. J. (1994)  
Retinal ganglion cells express a cGMP-gated cation conductance activatable by nitric oxide donors  
Neuron, 12, 155-65.
- Alonso, C., Miskin, J., Hernaez, B., Fernandez-Zapatero, P., Soto, L., Canto, C., Rodriguez-Crespo, I., Dixon, L., Escribano, J. M. (2001)  
African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein  
J. Virol., 75, 9819-27.
- Ausubel, F. M., (1987-)  
Current protocols in molecular biology, 2 v. (loose-leaf)  
Greene Publishing Associates, Brooklyn, N. Y.
- Babu, B. R., Griffith, O. W. (1998)  
N5-(1-Imino-3-butenyl)-L-ornithine. A neuronal isoform selective mechanism-based inactivator of nitric oxide synthase  
J. Biol. Chem., 273, 8882-9.
- Babu, Y. S., Bugg, C. E., Cook, W. J. (1988)  
Structure of calmodulin refined at 2.2 Å resolution  
J. Mol. Biol., 204, 191-204.
- Barone, F. C., Feuerstein, G. Z. (1999)  
Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics  
J. Cereb. Blood Flow Metab., 19, 819-34.
- Becker, A. J., Gillardon, F., Blumcke, I., Langendorfer, D., Beck, H., Wiestler, O. D. (1999)  
Differential regulation of apoptosis-related genes in resistant and vulnerable subfields of the rat epileptic hippocampus  
Brain Res. Mol. Brain Res., 67, 172-6.

- Beckman, J. S., Beckman, T. W., Chen, J., Marshall, P. A., Freeman, B. A. (1990)  
Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87, 1620-4.
- Berkelaar, M., Clarke, D. B., Wang, Y. C., Bray, G. M., Aguayo, A. J. (1994)  
Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats  
J. Neurosci., 14, 4368-74.
- Blake, M. C., Jambou, R. C., Swick, A. G., Kahn, J. W., Azizkhan, J. C. (1990)  
Transcriptional initiation is controlled by upstream GC-box interactions in a TATAA-less promoter  
Mol. Cell. Biol., 10, 6632-41.
- Bolotina, V. M., Najibi, S., Palacino, J. J., Pagano, P. J., Cohen, R. A. (1994)  
Nitric oxide directly activates calcium-dependent potassium channels in vascular smooth muscle  
Nature, 368, 850-3.
- Bonfoco, E., Krainc, D., Ankarcrona, M., Nicotera, P., Lipton, S. A. (1995)  
Apoptosis and necrosis: two distinct events induced, respectively, by mild and intense insults with N-methyl-D-aspartate or nitric oxide/superoxide in cortical cell cultures  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92, 7162-6.
- Bredt, D. S., Ferris, C. D., Snyder, S. H. (1992)  
Nitric oxide synthase regulatory sites. Phosphorylation by cyclic AMP-dependent protein kinase, protein kinase C, and calcium/calmodulin protein kinase; identification of flavin and calmodulin binding sites  
J. Biol. Chem., 267, 10976-81.
- Bredt, D. S., Glatt, C. E., Hwang, P. M., Fotuhi, M., Dawson, T. M., Snyder, S. H. (1991)  
Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase.  
Neuron, 7, 615-24.
- Bredt, D. S., Snyder, S. H. (1990)  
Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 87, 682-5.
- Brenman, J. E., Bredt, D. S. (1996)  
Nitric oxide signaling in the nervous system  
Methods Enzymol., 269, 119-29.
- Brune, B., Dimmeler, S., Molina y. Vedia, L., Lapetina, E. G. (1994)  
Nitric oxide: a signal for ADP-ribosylation of proteins  
Life Sci., 54, 61-70.



- Brune, B., Lapetina, E. G. (1991)  
Phosphorylation of nitric oxide synthase by protein kinase A  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 181, 921-6.
- Cardullo, R. A., Agrawal, S., Flores, C., Zamecnik, P. C., Wolf, D. E. (1988)  
Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 85, 8790-4.
- Chang, Y. W., Jakobi, R., McGinty, A., Foschi, M., Dunn, M. J., Sorokin, A. (2000)  
Cyclooxygenase 2 promotes cell survival by stimulation of dynein light chain expression and inhibition of neuronal nitric oxide synthase activity  
*Mol. Cell. Biol.*, 20, 8571-9.
- Che, Y. H., Tamatani, M., Yamashita, T., Gomi, F., Ogawa, S., Tohyama, M. (2000)  
Changes in mRNA of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase following facial nerve transection  
*J. Chem. Neuroanat.*, 17, 199-206.
- Chirgwin, J. M., Przybyla, A. E., MacDonald, R. J., Rutter, W. J. (1979)  
Isolation of biologically active ribonucleic acid from  
*Biochemistry (Mosc.)*, 18, 5294-9.
- Choi, D. W. (1994)  
Glutamate receptors and the induction of excitotoxic neuronal death  
*Prog. Brain Res.*, 100, 47-51.
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987)  
Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium  
*Anal. Biochem.*, 162, 156-9.
- Craven, P. A., DeRubertis, F. R. (1978)  
Restoration of the responsiveness of purified guanylate cyclase to nitrosoguanidine, nitric oxide, and related activators by heme and hemeproteins. Evidence for involvement of the paramagnetic nitrosyl-heme complex in enzyme activation  
*J. Biol. Chem.*, 253, 8433-43.
- Crepieux, P., Kwon, H., Leclerc, N., Spencer, W., Richard, S., Lin, R., Hiscott, J. (1997)  
I kappaB alpha physically interacts with a cytoskeleton-associated protein through its signal response domain  
*Mol. Cell. Biol.*, 17, 7375-85.

- Dawson, T. M., Steiner, J. P., Dawson, V. L., Dinerman, J. L., Uhl, G. R., Snyder, S. H. (1993)  
Immunosuppressant FK506 enhances phosphorylation of nitric oxide synthase and protects against glutamate neurotoxicity  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90, 9808-12.
- Dawson, V. L., Dawson, T. M., London, E. D., Brecht, D. S., Snyder, S. H. (1991)  
Nitric oxide mediates glutamate neurotoxicity in primary cortical cultures  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 88, 6368-71.
- De Caterina, R., Libby, P., Peng, H. B., Thannickal, V. J., Rajavashisth, T. B., Gimbrone, M. A. J., Shin, W. S., Liao, J. K. (1995)  
Nitric oxide decreases cytokine-induced endothelial activation. Nitric oxide selectively reduces endothelial expression of adhesion molecules and proinflammatory cytokines  
J. Clin. Invest., 96, 60-8.
- Devi, L., Petanceska, S., Liu, R., Arbabha, B., Bansinath, M., Garg, U. (1994)  
Regulation of neuropeptide-processing enzymes by nitric oxide in cultured astrocytes  
J. Neurochem., 62, 2387-93.
- Dick, T., Ray, K., Salz, H. K., Chia, W. (1996)  
Cytoplasmic dynein (ddlc1) mutations cause morphogenetic defects and apoptotic cell death in *Drosophila melanogaster*  
Mol. Cell. Biol., 16, 1966-77.
- Dickens, M., Rogers, J. S., Cavanagh, J., Raitano, A., Xia, Z., Halpern, J. R., Greenberg, M. E., Sawyers, C. L., Davis, R. J. (1997)  
A cytoplasmic inhibitor of the JNK signal transduction pathway  
Science, 277, 693-6.
- Dietz, G. P., Kilic, E., Bahr, M., Isenmann, S. (2001)  
Bcl-2 is not required in retinal ganglion cells surviving optic nerve axotomy  
Neuroreport, 12, 3353-6.
- Dinerman, J. L., Steiner, J. P., Dawson, T. M., Dawson, V., Snyder, S. H. (1994)  
Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase inhibits catalytic activity  
Neuropharmacology, 33, 1245-51.
- Espindola, F. S., Cheney, R. M., King, S. M., Suter, D. M., Mooseker, M. S. (1996)  
Myosin V and dynein share a similar light chain.  
Mol. Biol. Cell, 7, 327A.

Espindola, F. S., Suter, D. M., Partata, L. B., Cao, T., Wolenski, J. S., Cheney, R. E., King, S. M., Mooseker, M. S. (2000)

The light chain composition of chicken brain myosin-Va: calmodulin, myosin-II essential light chains, and 8-kDa dynein light chain/PIN

Cell Motil. Cytoskeleton, 47, 269-81.

Fagni, L., Olivier, M., Lafon-Cazal, M., Bockaert, J. (1995)

Involvement of divalent ions in the nitric oxide-induced blockade of N-methyl-D-aspartate receptors in cerebellar granule cells

Mol. Pharmacol., 47, 1239-47.

Fan, J. S., Zhang, Q., Li, M., Tochio, H., Yamazaki, T., Shimizu, M., Zhang, M. (1998)

Protein inhibitor of neuronal nitric-oxide synthase, PIN, binds to a 17-amino acid residue fragment of the enzyme

J. Biol. Chem., 273, 33472-81.

Feng, G., Tintrop, H., Kirsch, J., Nichol, M. C., Kuhse, J., Betz, H., Sanes, J. R. (1998)

Dual requirement for gephyrin in glycine receptor clustering and molybdoenzyme activity

Science, 282, 1321-4.

Feuerstein, G. Z., Wang, X., Barone, F. C. (1997)

Inflammatory gene expression in cerebral ischemia and trauma. Potential new therapeutic targets

Ann. N. Y. Acad. Sci., 825, 179-93.

Francis, S. H., Corbin, J. D. (1994)

Structure and function of cyclic nucleotide-dependent protein kinases

Annu. Rev. Physiol., 56, 237-72.

Frey, A., Reif, A., Zabel, U., Schmidt, H. H. H. W. (1998)

NO: 10 Years After

Biospektrum, 2, 27-32.

Fuhrmann, J. C., Kins, S., Rostaing, P., El Far, O., Kirsch, J., Sheng, M., Triller, A., Betz, H., Kneussel, M. (2002)

Gephyrin interacts with Dynein light chains 1 and 2, components of motor protein complexes

J. Neurosci., 22, 5393-402.

Gall, J. G., Pardue, M. L. (1969)

Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations

Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 63, 378-83.

Garthwaite, J., Boulton, C. L. (1995)

Nitric oxide signaling in the central nervous system

Annu. Rev. Physiol., 57, 683-706.

Gillardon, F., Krep, H., Brinker, G., Lenz, C., Bottiger, B., Hossmann, K. A. (1998)  
Induction of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase/cytoplasmic dynein light chain following cerebral ischemia  
*Neuroscience*, 84, 81-8.

Gopalakrishna, R., Chen, Z. H., Gundimeda, U. (1993)  
Nitric oxide and nitric oxide-generating agents induce a reversible inactivation of protein kinase C activity and phorbol ester binding  
*J. Biol. Chem.*, 268, 27180-5.

Greenwood, M. T., Guo, Y., Kumar, U., Beausejourns, S., Hussain, S. N. (1997)  
Distribution of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in rat brain  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 238, 617-21.

Griffith, O. W., Stuehr, D. J. (1995)  
Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism  
*Annu. Rev. Physiol.*, 57, 707-36.

Grigorenko, E. V., Yeh, H. H. (1994)  
Expression profiling of GABAA receptor beta-subunits in the rat retina  
*Vis. Neurosci.*, 11, 379-87.

Gross, S. S., Wolin, M. S. (1995)  
Nitric oxide: pathophysiological mechanisms  
*Annu. Rev. Physiol.*, 57, 737-69.

Gross, W. L., Bak, M. I., Ingwall, J. S., Arstall, M. A., Smith, T. W., Balligand, J. L., Kelly, R. A. (1996)  
Nitric oxide inhibits creatine kinase and regulates rat heart contractile reserve  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 93, 5604-9.

Grünewald-Janho, S., Keeseey, J., Leous, M., van Miltenburg, R., Schroeder, C., (1996)  
Nonradioactive In Situ Hybridization Application Manual.  
Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim.

Guo, Y., Greenwood, M. T., Petrof, B. J., Hussain, S. N. (1999)  
Expression and regulation of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in ventilatory muscles  
*Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 20, 319-26.

Guo, Y., Petrof, B. J., Hussain, S. N. (2001)  
Expression and localization of protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase in Duchenne muscular dystrophy  
*Muscle Nerve*, 24, 1468-75.

- Haby, C., Lisovoski, F., Aunis, D., Zwiller, J. (1994)  
Stimulation of the cyclic GMP pathway by NO induces expression of the immediate early genes c-fos and junB in PC12 cells  
*J. Neurochem.*, 62, 496-501.
- Heinzel, B., John, M., Klatt, P., Bohme, E., Mayer, B. (1992)  
Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent formation of hydrogen peroxide by brain nitric oxide synthase  
*Biochem. J.*, 281 ( Pt 3), 627-30.
- Herdegen, T., Bastmeyer, M., Bahr, M., Stuermer, C., Bravo, R., Zimmermann, M. (1993)  
Expression of JUN, KROX, and CREB transcription factors in goldfish and rat retinal ganglion cells following optic nerve lesion is related to axonal sprouting  
*J. Neurobiol.*, 24, 528-43.
- Hevel, J. M., White, K. A., Marletta, M. A. (1991)  
Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein  
*J. Biol. Chem.*, 266, 22789-91.
- Hirokawa, N., Noda, Y., Okada, Y. (1998)  
Kinesin and dynein superfamily proteins in organelle transport and cell division  
*Curr. Opin. Cell Biol.*, 10, 60-73.
- Huang, Z., Huang, P. L., Ma, J., Meng, W., Ayata, C., Fishman, M. C., Moskowitz, M. A. (1996)  
Enlarged infarcts in endothelial nitric oxide synthase knockout mice are attenuated by nitro-L-arginine  
*J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 16, 981-7.
- Huang, Z., Huang, P. L., Panahian, N., Dalkara, T., Fishman, M. C., Moskowitz, M. A. (1994)  
Effects of cerebral ischemia in mice deficient in neuronal nitric oxide synthase  
*Science*, 265, 1883-5.
- Hüll, M., Bähr, M. (1994)  
Regulation of immediate-early gene expression in rat retinal ganglion cells after axotomy and during regeneration through a peripheral nerve graft  
*J. Neurobiol.*, 25, 92-105.
- Iadecola, C. (1997)  
Bright and dark sides of nitric oxide in ischemic brain injury.  
*Trends Neurosci.*, 20, 132-9.

- Iadecola, C., Ross, M. E. (1997)  
Molecular pathology of cerebral ischemia: delayed gene expression and strategies for neuroprotection.  
Ann. N. Y. Acad. Sci., 835, 203-17.
- Iadecola, C., Zhang, F., Casey, R., Clark, H. B., Ross, M. E. (1996)  
Inducible nitric oxide synthase gene expression in vascular cells after transient focal cerebral ischemia  
Stroke, 27, 1373-80.
- Ignarro, L. J., Wood, K. S., Wolin, M. S. (1984)  
Regulation of purified soluble guanylate cyclase by porphyrins and metalloporphyrins: a unifying concept  
Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res., 17, 267-74.
- Ignarro, L., (1995)  
Nitric oxide: biochemistry, molecular biology, and therapeutic implications.  
Acad. Press, San Diego, Calif.
- Inoue, A., Yanagisawa, M., Kimura, S., Kasuya, Y., Miyauchi, T., Goto, K., Masaki, T. (1989)  
The human endothelin family: three structurally and pharmacologically distinct isopeptides predicted by three separate genes  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 86, 2863-7.
- Jaffrey, S. R., Snowman, A. M., Eliasson, M. J., Cohen, N. A., Snyder, S. H. (1998)  
CAPON: a protein associated with neuronal nitric oxide synthase that regulates its interactions with PSD95  
Neuron, 20, 115-24.
- Jaffrey, S. R., Snyder, S. H. (1996)  
PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase  
Science, 274, 774-7.
- Jeon, C. J., Strettoi, E., Masland, R. H. (1998)  
The major cell populations of the mouse retina  
J. Neurosci., 18, 8936-46.
- Jeong, Y., Won, J., Yim, J. (1998)  
Cloning and structure of a rabbit protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase (PIN) gene and its pseudogene.
- Kadonaga, J. T., Tjian, R. (1986)  
Affinity purification of sequence-specific DNA binding proteins  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 83, 5889-93.

- Kermer, P., Klocker, N., Weishaupt, J. H., Bahr, M. (2001)  
 Transection of the optic nerve in rats: studying neuronal death and survival in vivo.  
*Brain Res. Brain Res. Protoc.*, 7, 255-60.
- Khatsenko, O. G., Gross, S. S., Rifkind, A. B., Vane, J. R. (1993)  
 Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P450-dependent metabolism  
 caused by immunostimulants  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 90, 11147-51.
- Kiessling, M., Gass, P. (1994)  
 Stimulus-transcription coupling in focal cerebral ischemia  
*Brain Pathol.*, 4, 77-83.
- King, S. M. (2000)  
 The dynein microtubule motor  
*Biochim. Biophys. Acta*, 1496, 60-75.
- King, S. M., Barbarese, E., Dillman, J. F. I., Patel-King, R. S., Carson, J. H., Pfister, K.  
 K. (1996)  
 Brain cytoplasmic and flagellar outer arm dyneins share a highly conserved Mr 8,000  
 light chain  
*J. Biol. Chem.*, 271, 19358-66.
- King, S. M., Patel-King, R. S. (1995)  
 The M(r) = 8,000 and 11,000 outer arm dynein light chains from *Chlamydomonas*  
*flagella* have cytoplasmic homologues  
*J. Biol. Chem.*, 270, 11445-52.
- King, S. M., Wilkerson, C. G., Witman, G. B. (1991)  
 The Mr 78,000 intermediate chain of *Chlamydomonas* outer arm dynein interacts with  
 alpha-tubulin in situ  
*J. Biol. Chem.*, 266, 8401-7.
- Kirsch, J., Langosch, D., Prior, P., Littauer, U. Z., Schmitt, B., Betz, H. (1991)  
 The 93-kDa glycine receptor-associated protein binds to tubulin  
*J. Biol. Chem.*, 266, 22242-5.
- Klatt, P., Schmidt, K., Lehner, D., Glatter, O., Bachinger, H. P., Mayer, B. (1995)  
 Structural analysis of porcine brain nitric oxide synthase reveals a role for  
 tetrahydrobiopterin and L-arginine in the formation of an SDS-resistant dimer  
*EMBO J.*, 14, 3687-95.
- Klöcker, N., Cellierino, A., Bahr, M. (1998)  
 Free radical scavenging and inhibition of nitric oxide synthase potentiates the  
 neurotrophic effects of brain-derived neurotrophic factor on axotomized retinal ganglion  
 cells In vivo.  
*J. Neurosci.*, 18, 1038-46.

- Klöcker, N., Kermer, P., Gleichmann, M., Weller, M., Bahr, M. (1999)  
Both the neuronal and inducible isoforms contribute to upregulation of retinal nitric oxide synthase activity by brain-derived neurotrophic factor.  
*J. Neurosci.*, 19, 8517-27.
- Kneussel, M., Brandstatter, J. H., Laube, B., Stahl, S., Müller, U., Betz, H. (1999)  
Loss of postsynaptic GABA(A) receptor clustering in gephyrin-deficient mice  
*J. Neurosci.*, 19, 9289-97.
- Labes, M., Bähr, M. (unveröffentlichte Befunde)
- Lander, H. M., Sehajpal, P. K., Novogrodsky, A. (1993)  
Nitric oxide signaling: a possible role for G proteins  
*J. Immunol.*, 151, 7182-7. (a)
- Lander, H. M., Sehajpal, P., Levine, D. M., Novogrodsky, A. (1993)  
Activation of human peripheral blood mononuclear cells by nitric oxide-generating compounds  
*J. Immunol.*, 150, 1509-16. (b)
- Lee, Y. H., Williams, S. C., Baer, M., Sterneck, E., Gonzalez, F. J., Johnson, P. F. (1997)  
The ability of C/EBP beta but not C/EBP alpha to synergize with an Sp1 protein is specified by the leucine zipper and activation domain  
*Mol. Cell. Biol.*, 17, 2038-47.
- Lei, S. Z., Pan, Z. H., Aggarwal, S. K., Chen, H. S., Hartman, J., Sucher, N. J., Lipton, S. A. (1992)  
Effect of nitric oxide production on the redox modulatory site of the NMDA receptor-channel complex  
*Neuron*, 8, 1087-99.
- Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Jackson, D., Leitch, I. J., (1994)  
In situ-Hybridisierung  
Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.
- Liang, J., Jaffrey, S. R., Guo, W., Snyder, S. H., Clardy, J. (1999)  
Structure of the PIN/LC8 dimer with a bound peptide  
*Nat. Struct. Biol.*, 6, 735-40.
- Lindqvist, N., Vidal-Sanz, M., Hallbook, F. (2002)  
Single cell RT-PCR analysis of tyrosine kinase receptor expression in adult rat retinal ganglion cells isolated by retinal sandwiching  
*Brain Res. Brain Res. Protoc.*, 10, 75-83.



- Livak, K. J., Flood, S. J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K. (1995)  
Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization  
PCR Methods Appl., 4, 357-62.
- Mansour-Robaey, S., Clarke, D. B., Wang, Y. C., Bray, G. M., Aguayo, A. J. (1994)  
Effects of ocular injury and administration of brain-derived neurotrophic factor on survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 91, 1632-6.
- Merika, M., Orkin, S. H. (1995)  
Functional synergy and physical interactions of the erythroid transcription factor GATA-1 with the Kruppel family proteins Sp1 and EKLf  
Mol. Cell. Biol., 15, 2437-47.
- Meyer, G., Kirsch, J., Betz, H., Langosch, D. (1995)  
Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit  
Neuron, 15, 563-72.
- Mitchell, P. J., Wang, C., Tjian, R. (1987)  
Positive and negative regulation of transcription in vitro: enhancer-binding protein AP-2 is inhibited by SV40 T antigen  
Cell, 50, 847-61.
- Nagafuji, T., Sugiyama, M., Muto, A., Makino, T., Miyauchi, T., Nabata, H. (1995)  
The neuroprotective effect of a potent and selective inhibitor of type I NOS (L-MIN) in a rat model of focal cerebral ischaemia  
Neuroreport, 6, 1541-5.
- Naisbitt, S., Valtschanoff, J., Allison, D. W., Sala, C., Kim, E., Craig, A. M., Weinberg, R. J., Sheng, M. (2000)  
Interaction of the postsynaptic density-95/guanylate kinase domain-associated protein complex with a light chain of myosin-V and dynein  
J. Neurosci., 20, 4524-34.
- Nakatsuka, M., Osawa, Y. (1994)  
Selective inhibition of the 12-lipoxygenase pathway of arachidonic acid metabolism by L-arginine or sodium nitroprusside in intact human platelets  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 200, 1630-4.
- Nathan, C. (1992)  
Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells  
FASEB J., 6, 3051-64.
- Nathan, C., Xie, Q. W. (1994)  
Regulation of biosynthesis of nitric oxide  
J. Biol. Chem., 269, 13725-8.

- Nawy, S., Jahr, C. E. (1990)  
Suppression by glutamate of cGMP-activated conductance in retinal bipolar cells  
*Nature*, 346, 269-71.
- Nguyen, T., Brunson, D., Crespi, C. L., Penman, B. W., Wishnok, J. S., Tannenbaum, S. R. (1992)  
DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89, 3030-4.
- Nowak, T. S. J., Jacewicz, M. (1994)  
The heat shock/stress response in focal cerebral ischemia  
*Brain Pathol.*, 4, 67-76.
- Nowicki, J. P., Duval, D., Poinet, H., Scatton, B. (1991)  
Nitric oxide mediates neuronal death after focal cerebral ischemia in the mouse  
*Eur. J. Pharmacol.*, 204, 339-40.
- O'Connor, L., Strasser, A., O'Reilly, L. A., Hausmann, G., Adams, J. M., Cory, S., Huang, D. C. (1998)  
Bim: a novel member of the Bcl-2 family that promotes apoptosis  
*EMBO J.*, 17, 384-95.
- Olken, N. M., Marletta, M. A. (1993)  
NG-methyl-L-arginine functions as an alternate substrate and mechanism-based inhibitor of nitric oxide synthase  
*Biochemistry (Mosc.)*, 32, 9677-85.
- Pendino, K. J., Laskin, J. D., Shuler, R. L., Punjabi, C. J., Laskin, D. L. (1993)  
Enhanced production of nitric oxide by rat alveolar macrophages after inhalation of a pulmonary irritant is associated with increased expression of nitric oxide synthase  
*J. Immunol.*, 151, 7196-205.
- Peunova, N., Enikolopov, G. (1993)  
Amplification of calcium-induced gene transcription by nitric oxide in neuronal cells  
*Nature*, 364, 450-3.
- Puthalakath, H., Villunger, A., O'Reilly, L. A., Beaumont, J. G., Coultas, L., Cheney, R. E., Huang, D. C., Strasser, A. (2001)  
Bmf: a proapoptotic BH3-only protein regulated by interaction with the myosin V actin motor complex, activated by anoikis  
*Science*, 293, 1829-32.
- Rabacchi, S. A., Bonfanti, L., Liu, X. H., Maffei, L. (1994)  
Apoptotic cell death induced by optic nerve lesion in the neonatal rat  
*J. Neurosci.*, 14, 5292-301.

Rettori, V., Belova, N., Dees, W. L., Nyberg, C. L., Gimeno, M., McCann, S. M. (1993)  
Role of nitric oxide in the control of luteinizing hormone-releasing hormone release in vivo and in vitro  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90, 10130-4.

Rodriguez-Crespo, I., Yelamos, B., Roncal, F., Albar, J. P., Ortiz de Montellano, P. R., Gavilanes, F. (2001)  
Identification of novel cellular proteins that bind to the LC8 dynein light chain using a pepscan technique  
FEBS Lett., 503, 135-41.

Rogers, N. E., Ignarro, L. J. (1992)  
Constitutive nitric oxide synthase from cerebellum is reversibly inhibited by nitric oxide formed from L-arginine  
Biochem. Biophys. Res. Commun., 189, 242-9.

Rychlik, W. (1995)  
Selection of primers for polymerase chain reaction.  
Mol. Biotechnol., 3, 129-34.

Salvemini, D., Misko, T. P., Masferrer, J. L., Seibert, K., Currie, M. G., Needleman, P. (1993)  
Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90, 7240-4.

Schaeren-Wiemers, N., Gerfin-Moser, A. (1993)  
A single protocol to detect transcripts of various types and expression levels in neural tissue and cultured cells: in situ hybridization using digoxigenin-labelled cRNA probes  
Histochemistry, 100, 431-40.

Schmidt, H. H., Walter, U. (1994)  
NO at work  
Cell, 78, 919-25.

Schnorrer, F., Bohmann, K., Nusslein-Volhard, C. (2000)  
The molecular motor dynein is involved in targeting swallow and bicoid RNA to the anterior pole of *Drosophila* oocytes  
Nat. Cell Biol., 2, 185-90.

Sharp, F. R., Sagar, S. M. (1994)  
Alterations in gene expression as an index of neuronal injury: heat shock and the immediate early gene response  
Neurotoxicology, 15, 51-9.

- Shaw, G., Kamen, R. (1986)  
A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation  
*Cell*, 46, 659-67.
- Shiells, R. A., Falk, G. (1990)  
Glutamate receptors of rod bipolar cells are linked to a cyclic GMP cascade via a G-protein  
*Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, 242, 91-4.
- Smith, W. L., Marnett, L. J., DeWitt, D. L. (1991)  
Prostaglandin and thromboxane biosynthesis  
*Pharmacol. Ther.*, 49, 153-79.
- Spradling, A. C., Bate, M., Arias, A. M. (1993)  
The development of *Drosophila melanogaster*, 1-70  
in: Spradling, A. C.: *Developmental genetics of oogenesis*;  
Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Stadler, J., Trockfeld, J., Schmalix, W. A., Brill, T., Siewert, J. R., Greim, H., Doehmer, J. (1994)  
Inhibition of cytochromes P4501A by nitric oxide  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91, 3559-63.
- Stephens, R. E., Prior, G. (1992)  
Dynein from serotonin-activated cilia and flagella: extraction characteristics and distinct sites for cAMP-dependent protein phosphorylation  
*J. Cell Sci.*, 103 ( Pt 4), 999-1012.
- Stuehr, D. J., Griffith, O. W. (1992)  
Mammalian nitric oxide synthases  
*Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, 65, 287-346.
- Tai, A. W., Chuang, J. Z., Bode, C., Wolfrum, U., Sung, C. H. (1999)  
Rhodopsin's carboxy-terminal cytoplasmic tail acts as a membrane receptor for cytoplasmic dynein by binding to the dynein light chain Tctex-1  
*Cell*, 97, 877-87.
- Thornberry, N. A., Lazebnik, Y. (1998)  
Caspases: enemies within  
*Science*, 281, 1312-6.
- Tochio, H., Ohki, S., Zhang, Q., Li, M., Zhang, M. (1998)  
Solution structure of a protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase  
*Nat. Struct. Biol.*, 5, 965-9.

- Tsou, K., Snyder, G. L., Greengard, P. (1993)  
Nitric oxide/cGMP pathway stimulates phosphorylation of DARPP-32, a dopamine- and cAMP-regulated phosphoprotein, in the substantia nigra  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90, 3462-5.
- Uhler, M. D. (1993)  
Cloning and expression of a novel cyclic GMP-dependent protein kinase from mouse brain  
J. Biol. Chem., 268, 13586-91.
- Villegas Perez, M. P., Vidal Sanz, M., Bray, G. M., Aguayo, A. J. (1988)  
Influences of peripheral nerve grafts on the survival and regrowth of axotomized retinal ganglion cells in adult rats.  
J. Neurosci., 8, 265-80.
- Villegas-Perez, M. P., Vidal-Sanz, M., Rasminsky, M., Bray, G. M., Aguayo, A. J. (1993)  
Rapid and protracted phases of retinal ganglion cell loss follow axotomy in the optic nerve of adult rats  
J. Neurobiol., 24, 23-36.
- Wang, T., Xie, Z., Lu, B. (1995)  
Nitric oxide mediates activity-dependent synaptic suppression at developing neuromuscular synapses  
Nature, 374, 262-6.
- Wang, X., Feuerstein, G. Z. (1995)  
Induced expression of adhesion molecules following focal brain ischemia  
J. Neurotrauma, 12, 825-32.
- Weishaupt, J. H., Bahr, M. (2001)  
Degeneration of axotomized retinal ganglion cells as a model for neuronal apoptosis in the central nervous system - molecular death and survival pathways  
Restor Neurol Neurosci, 19, 19-27.
- Wink, D. A., Hanbauer, I., Krishna, M. C., DeGraff, W., Gamson, J., Mitchell, J. B. (1993)  
Nitric oxide protects against cellular damage and cytotoxicity from reactive oxygen species  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 90, 9813-7.
- Wolin, M. S., Wood, K. S., Ignarro, L. J. (1982)  
Guanylate cyclase from bovine lung. A kinetic analysis of the regulation of the purified soluble enzyme by protoporphyrin IX, heme, and nitrosyl-heme  
J. Biol. Chem., 257, 13312-20.

- Xia, Y., Zweier, J. L. (1997)  
Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 94, 6954-8.
- Yieh, L., Sanchez, H. B., Osborne, T. F. (1995)  
Domains of transcription factor Sp1 required for synergistic activation with sterol regulatory element binding protein 1 of low density lipoprotein receptor promoter  
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 92, 6102-6.
- Yip, H. K., So, K. F. (2000)  
Axonal regeneration of retinal ganglion cells: effect of trophic factors  
Prog. Retin. Eye Res., 19, 559-75.
- Yu, J., Yu, L., Chen, Z., Zheng, L., Chen, X., Wang, X., Ren, D., Zhao, S. (2002)  
Protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase interacts with protein kinase A inhibitors  
Brain Res. Mol. Brain Res., 99, 145-9.
- Zhang, F., Casey, R. M., Ross, M. E., Iadecola, C. (1996)  
Aminoguanidine ameliorates and L-arginine worsens brain damage from intraluminal middle cerebral artery occlusion  
Stroke, 27, 317-23. (b)
- Zhang, F., Iadecola, C. (1994)  
Reduction of focal cerebral ischemic damage by delayed treatment with nitric oxide donors  
J. Cereb. Blood Flow Metab., 14, 574-80.
- Zhang, Z. G., Reif, D., Macdonald, J., Tang, W. X., Kamp, D. K., Gentile, R. J., Shakespeare, W. C., Murray, R. J., Chopp, M. (1996)  
ARL 17477, a potent and selective neuronal NOS inhibitor decreases infarct volume after transient middle cerebral artery occlusion in rats  
J. Cereb. Blood Flow Metab., 16, 599-604. (a)

## 6.2 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 14: verwendete Abkürzungen

(w/v)	Masse/Volumen (weight/volume)
ADP	Adenosindiphosphat
AGS	Gewebeschnitte axotomierter Tiere
AK	Antikörper
AP-2	<i>activation protein-2</i>
AR	Axotomierte Retina
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Bicinchonininsäure
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-phosphat
BDNF	<i>brain derived neurotrophic factor</i>
Bp	Basenpaare
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BSA	Rinderserumalbumin
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
C/EBP	CCAAT/enhancer binding protein
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CAPON	<i>carboxy-terminal PDZ ligand of nNOS</i>
cDNS	Copy-Desoxyribonukleinsäure
cGB-PDE	cGMP-bindende PDE
cGI-PDE	cGMP-inhibierte PDE
cGMP	Zyklisches Guanosinmonophosphat
cG-PK	cGMP-abhängiger PK
cGS-PDE	cGMP-stimulierte PDE
CH	Schweiz
COX	Zyklooxygenase
CpiMB	<i>current protocols in molecular biology</i>
Css	<i>color substrate solution</i>
CTG	Cytidintriphosphat
CT-Wert	Zeigt die Zykluszahl in der QE-PCR an, die gerade noch deutlich vom Hintergrundsignal abzugrenzen ist.
d	Tage
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DIG	Digoxigenin
DIG-UTP	Digoxigeninmarkiertes Uridintriphosphat
DMD	Muskeldystrophie Typ Duchenne
DMF	Dimethylformamid

DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiotreiol
ECL	Elektrochemolumineszenz
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	Endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
FAM	Fluorescein
GABAA	Gammaaminobuttersäure
GCL	Ganglienzellschicht (ganglion cell layer)
GD	Gyrus dentatus
GKAP	<i>guanylate kinase domain-associated protein</i>
GS	Gewebsschnitt
GST	Glutathion-S-Transferase
GTC	Guanidinisoithiocyanat
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HC	Hippocampus
HEK	<i>human embryonal kidney</i>
HNF-3 beta	Hepatischer nukleärer Faktor 3 beta
Hp	Hybridisierungspuffer
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
HSF-2S	<i>heat shock factor-2 site</i>
IC	<i>intermediate chain</i>
INL	Innere Körnerzellschichtschicht ( <i>inner nuclear layer</i> )
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
IPL	Innere plexiforme Schicht ( <i>inner plexiform layer</i> )
IRF-1	Interferonregulierender Faktor 1
ISH	In situ Hybridisierung
kD	Kilodalton
KISE	Kainatinduzierter Status epilepticus
KR	Kontrollretina
KS	Kryostatschnitte
LGZ	Lösliche Guanylylzyklase
LPS	Lipopolysacceride
Mabs	<i>maleine buffered saline</i>
min.	Minuten
MMLV-RT	Reverse Transkriptase aus dem Moloney murine leukemia virus



MT	pseudotransfiziert= <i>mock transfected</i>
MZFKS	Myeloische Zinkfingerkonsensussequenz
NBT	Nitrobluetetrazoliumchlorid
NGF	<i>neuronal growth factor</i>
nNOS	Neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthetase
NT	Nukleotid(e)
OD	Optische Dichte
ON	<i>Nervus opticus</i>
ONL	Äußere Körnerzellschichtschicht ( <i>outer nuclear layer</i> )
OPL	Äußere plexiforme Schicht ( <i>outer plexiform layer</i> )
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAK	Primärantikörper
PBR	PIN-bindende Region
PBS	<i>phosphat buffered saline</i>
PBS-T	<i>phosphate buffered saline tween</i>
PC	Zellen aus einer Phäochromozytomzelllinie
PC-PIN	PIN überexprimierende Zellen aus der Phäochromozytomzelllinie
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PC-XII	COX-2 überexprimierende Zellen aus der Phäochromozytomzelllinie
PDE	Phosphodiesterase(n)
PFA	Paraformaldehyd
PG	Prostaglandin
PIN	<i>protein inhibitor of nNOS</i>
PINB(R)	PIN-bindenden Region
PK	Proteinkinase(n)
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Polymethylsulfonylfluorid
PSD	<i>postsynaptic density protein</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
QE-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RGZn	Retinale Ganglienzellen
RM	Rückenmark
Rnase	Ribonuklease
RNS	Ribonukleinsäure
Rp	Reaktionspuffer
RT	Reverse Transkriptase
RTD-PCR	Echtzeitnachweis-PCR (real-time detection)
RT-PCR	Polychainreaktion mittels reverser Transkriptase

s	Sekunden
SAK	Sekundärantikörper
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfatpolyacrylamidgelelektrophorese
SREBP1	<i>sterol regulatory element-binding protein 1</i>
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitratpuffer
Taq-Polymerase	DNS-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TE	10 mM Tris-Cl, 1mM EDTA (pH 8,0)
TEA	Triethanolamin
TGS	Gewebsschnitt transplantierte Tiere
TR	Transplantierte Retina
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
tRNS	Transfer-RNS
U	Einheiten
USF	<i>upstream stimulating factor</i>
UTP	Uridintriphosphat
Vol.	Volumen
YPRO	Pseudoprolin
ZNS	Zentrales Nervensystem

### 6.3 Bezugsquellenverzeichnis

Tabelle 15: Hersteller und Lieferanten

Hersteller/Lieferant	PLZ	Ort	Land
Adobe Systems GmbH	85716	Unterschleissheim	BRD
Amersham Bioscience Europe GmbH	79111	Freiburg	BRD
Applied Biosystems Applera Deutschland GmbH	64331	Weiterstadt	BRD
Beckmann Coulter GmbH	85716	Unterschleißheim-Lohhof	BRD
Bibliographix GmbH	31141	Hildesheim	BRD
BioRad GmbH	80939	München	BRD
Boehringer Mannheim GmbH	68298	Mannheim	BRD
Charles River Wiga	97633	Sulzfeld	BRD
Dianova-Immunotech	20095	Hamburg	BRD
Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH	22331	Hamburg	BRD
Fine Science Tools	69117	Heidelberg	BRD
Fluka Chemie AG	CH-9470	Buchs	CH
Gibco BRL life technologies	76344	Eggenstein	BRD
Heraeus	63405	Hanau	BRD
Illing Depolymerisations	52525	Heinsberg	BRD
Microsoft GmbH	85716	Unterschleißheim	BRD
Millipore	65760	Eschborn	BRD
PeqLab	91052	Erlangen	BRD
PerkinElmer Instruments GmbH	63110	Rodgau-Jügesheim	BRD
Pierce Inc.	61105	Rockfort, Illinois	USA
Promega	69115	Heidelberg	BRD
Quiagen	40724	Hilden	BRD
Sakura Finetek Europe B.V.	2382	Zoeterwoude	NL
Santa Cruz Biotechnology Inc.	69115	Heidelberg	BRD
Sigma Chemie	82039	Deisenhofen	BRD
Sony Deutschland Medical & Scientific GmbH	50829	Köln	BRD
Sorvall Kendro Laboratory Products GmbH	20537	Hamburg	BRD
Stratagene GmbH	69044	Heidelberg	BRD
Transduction Laboratories	9320	Erembodegem	Belg.

## **7 Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Leitung von Prof. Dr. med. M. Bähr und wurde von Frau Dr. M. Labes betreut. Für ihr Interesse, ihre Diskussionsbereitschaft und konstruktive Kritik danke ich ihnen.

Besonders möchte ich mich bei Dr. G. Dietz für sein großes Engagement und seine moralische Unterstützung während der gesamten Arbeit bedanken.

Bei Frau R. Ort, die mich in die Laborarbeit einführte und mir während der Experimente mit praktischen Hinweisen sehr geholfen hat, möchte mich ebenso wie bei Dr. med. Klöcker für seine Hilfe und Mitarbeit bedanken.

Allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Bähr danke ich für ihre freundliche Aufnahme und Hilfsbereitschaft.

Fröhlich danke ich meinen Eltern für ihre Geduld und liebevolle Unterstützung.

## **8 Lebenslauf**

Name:	Michael Schott
Geburtsdatum:	14.07.1973
Geburtsort:	Bad Hersfeld
1980 - 1984	Hermann-Löns-Grundschule in Uelzen
1984 - 1986	Orientierungsstufe der Herman-Löns-Schule in Uelzen
1986 - 1993	Herzog-Ernst-Gymnasiums in Uelzen
1993 - 1994	Bundeswehrdienst in Wildeshausen
1994 - 1995	Mitarbeiterschule des Missionswerkes Hermannsburg der ev.-luth. Landeskirche in Niedersachsen
SS 1995- SS 2002	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Hamburg, Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen und an der Université Claude Bernard, Lyon
06.11.2002	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung