

**Aufklärung des Pathomechanismus bei der pmn-Mausmutante
einem Mausmodell für Motoneurerkrankungen**

Dissertation

zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Florian Lothar Paul Bender

geboren in Schweinfurt

Würzburg, März 2007

Eingereicht am: 27. März 2007

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. M. Müller

Erster Gutachter: Prof. Dr. Michael Sendtner

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Erich Buchner

Tag des Promotionskolloquiums: 25.07.2007

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	- 5 -
2	Summary	- 6 -
3	Einleitung	- 7 -
3.1	Humane Motoneuronerkrankungen	- 7 -
3.1.1	Definition und Klassifikation der Motoneuronerkrankungen	- 7 -
3.1.2	Ätiologie und Pathogenese	- 8 -
3.2	Die <i>p^{mn}</i>-Maus als Modell für eine degenerative Motoneuronerkrankung	- 12 -
3.3	Mikrotubuli und axonaler Transport	- 14 -
3.3.1	Aufbau und Assemblierung der Mikrotubuli	- 14 -
3.3.2	Stathmin als Regulator der Mikrotubulidynamik	- 15 -
3.3.3	Mikrotubuliabhängiger axonaler Transport	- 15 -
3.4	Ziele der Arbeit	- 17 -
4	Material und Methoden	- 18 -
4.1	Material	- 18 -
4.1.1	Versuchstiere	- 18 -
4.1.1.1	<i>P^{mn}</i> -Mauslinie	- 18 -
4.1.1.2	NFL-Cre Mauslinie	- 18 -
4.1.1.3	STAT3 Mauslinien (STAT3 ^{fl^{ox}/fl^{ox}} und STAT3 ^{wt/ko})	- 18 -
4.1.2	Zelllinien	- 18 -
4.1.2.1	293T Zelllinie	- 18 -
4.1.2.2	PC12 Zelllinie	- 18 -
4.1.3	Bakterienstämme	- 19 -
4.1.4	Chemikalien und Enzyme	- 19 -
4.1.5	Puffer und Lösungen	- 19 -
4.1.6	Medien und Medienzusätze	- 20 -
4.1.6.1	Medien und Medienzusätze für die Zellkultur	- 20 -
4.1.6.2	Medien und Medienzusätze für Bakterienkultur	- 21 -
4.1.7	Nukleinsäuren und Vektoren	- 21 -
4.1.8	Oligonukleotide	- 22 -
4.1.9	Kits	- 22 -
4.1.10	Antikörper und Detektionssysteme	- 23 -
4.1.11	Software	- 23 -
4.2	Methoden	- 24 -
4.2.1	Gewebeentnahme und –aufbereitung	- 24 -
4.2.1.1	Nukleinsäureextraktion	- 24 -
4.2.1.2	Proteinextraktion	- 24 -
4.2.1.3	Primärkultur	- 24 -
4.2.2	Anlegen von Primärkulturen embryonaler Motoneurone	- 24 -
4.2.3	Eukaryonten-Zellkultur	- 25 -
4.2.4	Herstellung von Lentiviren	- 25 -
4.2.5	Mikrobiologie	- 25 -
4.2.6	Molekularbiologische Methoden	- 25 -
4.2.6.1	Nukleinsäuren	- 26 -
4.2.6.2	Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	- 26 -
4.2.6.3	Polymerasekettenreaktion (PCR)	- 26 -
4.2.6.4	Sequenzierung	- 26 -
4.2.6.5	Genotypisierung der Mauslinien	- 26 -
4.2.6.5.1	<i>P^{mn}</i> -Mauslinie	- 26 -
4.2.6.5.2	STAT3 Mauslinien (STAT3 ^{fl^{ox}/fl^{ox}} und STAT3 ^{wt/ko})	- 29 -
4.2.6.5.3	NFL-Cre Mauslinie	- 30 -
4.2.7	Proteinbiochemische Methoden	- 30 -
4.2.7.1	Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	- 30 -
4.2.7.2	Western Blot	- 30 -
4.2.7.3	Immunfluoreszenzmikroskopie	- 31 -
4.2.7.3.1	Immunzytochemische Antigendetektion	- 31 -
4.2.7.3.2	Mikroskopische Auswertung	- 31 -
4.2.8	Lebendzellbeobachtungen	- 31 -
4.2.9	Elektronenmikroskopie	- 33 -
4.2.10	Statistik	- 33 -
4.2.10.1	Student´s t-Test	- 33 -
4.2.10.2	ANOVA - 33 -	
5	Ergebnisse	- 34 -
5.1	Einfluss der Mutation in <i>p^{mn}</i> / TBCE auf die Funktion von TBCE	- 34 -
5.1.1	Zielsetzung und Zusammenfassung	- 34 -
5.1.2	Charakterisierung eines Antiserums gegen TBCE	- 34 -

5.1.3	Stabilität des TBCE Proteins im Rückenmark von <i>pmn</i> -Mäusen	- 35 -
5.1.4	Überexpression von wildtypischem und mutiertem TBCE rettet die axonalen Pathologien	- 36 -
5.2	Subzelluläre Verteilung von TBCE in kultivierten Motoneuronen	- 38 -
5.2.1	Zielsetzung und Zusammenfassung	- 38 -
5.2.2	TBCE-Immunzytochemie	- 38 -
5.2.3	TBCE Immunreaktivität im Golgi-Apparat	- 40 -
5.2.4	TBCE Immunreaktivität in Centrosomen	- 41 -
5.3	Elektronenmikroskopische Analyse kultivierter Motoneurone	- 42 -
5.3.1	Zielsetzung und Zusammenfassung	- 42 -
5.3.2	Veränderungen am Zytoskelett in Motoneuronen von <i>pmn</i> -Mäusen	- 42 -
5.4	Einfluss von neurotrophen Faktoren auf die axonale Pathologie von Motoneuronen	- 47 -
5.4.1	Zielsetzung und Zusammenfassung	- 47 -
5.4.2	CNTF moduliert die pathologischen Veränderungen an <i>pmn</i> -mutierten Motoneuronen	- 47 -
5.5	Analyse des axonalen Transports	- 49 -
5.5.1	Zielsetzung und Zusammenfassung	- 49 -
5.5.2	Axonaler Transport von Mitochondrien	- 49 -
5.5.3	Mitochondriales Potential	- 54 -
5.5.3.1	Vorversuche zur Wahl eines geeigneten Farbstoffs zur Analyse des mitochondrialen Potentials	- 54 -
5.5.3.2	Analyse des mitochondrialen Potentials	- 57 -
5.6	Untersuchung des bei der Rettung der axonalen Pathologien in Motoneuronen von <i>pmn</i>-Mäusen beteiligten CNTF-Signalweges	- 60 -
5.6.1	Zielsetzung und Zusammenfassung	- 60 -
5.6.2	Herstellung STAT3-defizienter <i>pmn</i> -mutierter Motoneurone	- 60 -
5.6.3	Einfluss der motoneuronspezifischen STAT3-Defizienz auf den Krankheitsverlauf und die Überlebenszeit von <i>pmn</i> -mutierten Mäusen	- 61 -
5.6.4	Einfluss der motoneuronspezifischen STAT3-Defizienz auf das Axon- und Dendritenwachstum bei <i>pmn</i> -mutierten Motoneuronen	- 61 -
5.7	Reduktion der axonalen Pathologien durch Modulation der STAT3-Stathmin Interaktion	- 63 -
5.7.1	Zielsetzung und Zusammenfassung	- 63 -
5.7.2	Subzelluläre Lokalisation von Stathmin in Motoneuronen	- 64 -
5.7.3	Herstellung von lentiviraler shRNA zur gezielten Reduktion der Stathmin Proteinexpression	- 65 -
5.7.4	Einfluss der Stathmin Suppression auf das Axonwachstum TBCE-mutierter Motoneurone	- 66 -
6	Diskussion	- 68 -
6.1	Rolle von mutiertem TBCE bei der Pathogenese der <i>pmn</i>-Maus	- 68 -
6.1.1	Einfluss der <i>pmn</i> -Mutation auf die Stabilität des TBCE-Proteins	- 68 -
6.1.2	Einfluss der <i>pmn</i> -Mutation auf die Lokalisation des TBCE-Proteins	- 69 -
6.1.3	Einfluss der <i>pmn</i> -Mutation auf das neuronale Zytoskelett	- 70 -
6.1.4	Einfluss der <i>pmn</i> -Mutation auf TBCE-Proteininteraktionen	- 72 -
6.2	Einfluss von mutiertem TBCE auf den axonalen Transport	- 72 -
6.3	Rolle von STAT3 bei der Modulation der axonalen Pathologien von <i>pmn</i>-mutierten Motoneuronen	- 74 -
6.3.1	Differentielle Wirkungen von CNTF im Vergleich zu BDNF und GDNF auf die pathologischen Veränderungen an <i>pmn</i> -mutierten Motoneuronen	- 74 -
6.3.2	STAT3 vermittelt die CNTF Effekte	- 75 -
6.3.3	Lokale Wirkung von STAT3 durch Interaktion mit Stathmin	- 77 -
7	Anhang	- 80 -
7.1	Tbce cDNA	- 80 -
7.2	TBCE Aminosäuresequenz	- 80 -
7.3	Verwendete Peptide zur Immunisierung	- 81 -
7.4	Plasmidkarten	- 82 -
7.4.1	Plasmide für die Herstellung von Lentiviren zur Überexpression	- 82 -
7.4.2	Lentivirales System für RNAi	- 83 -
8	Abkürzungsverzeichnis	- 86 -
9	Literaturverzeichnis	- 88 -
10	Erklärung	- 99 -
11	Danksagung	- 100 -
12	Lebenslauf	- 101 -
13	Publikationen	- 103 -

1 Zusammenfassung

Die *pnm*-Maus dient als Modell für degenerative Motoneuronenerkrankungen: Während heterozygote Mäuse klinisch unauffällig sind, entwickeln homozygote einige Anzeichen, wie man sie auch bei humanen Motoneuronenerkrankungen findet. Ab der 2. postnatalen Woche weisen sie eine progrediente Schwäche der Hinterläufe auf. Innerhalb kurzer Zeit sind auch andere Muskelgruppen betroffen, was zwischen der 4. und 6. postnatalen Woche zum Tod durch Atemversagen führt.

Verantwortlich für die Erkrankung der *pnm*-Mäuse ist eine Punktmutation im *Tubulin-spezifischen Chaperon E (tbce)* Gen, die zu einem Aminosäureaustausch an einer evolutionär konservierten Aminosäure im TBCE-Protein führt. TBCE wird ubiquitär exprimiert und spielt eine Rolle bei der Assemblierung der Mikrotubuli. Phänotypisch sind von der Mutation spezifisch Motoneurone betroffen. Nach der Herstellung und Charakterisierung eines Antiserums gegen TBCE war es möglich, nach Unterschieden zwischen *pnm*-mutierten und wildtypischen Motoneuronen hinsichtlich der Stabilität und der subzellulären Lokalisation des TBCE Proteins zu suchen. Western Blot Analysen mit Rückenmarksllysaten von vier Wochen alten *pnm*-Mäusen zeigen eine deutliche Reduktion der TBCE-Expression. Mittels Immunfluoreszenz waren in isolierten embryonalen Motoneuronen indes keine Unterschiede hinsichtlich der Expressionsstärke und der subzellulären Lokalisation festzustellen. Das TBCE-Protein wird überwiegend im Zellsoma exprimiert und befindet sich dort im Golgi-Apparat und an den Centrosomen, die als Generatoren der axonalen Mikrotubuli angesehen werden. Obwohl mittels Immunfluoreszenz zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede detektierbar sind, weisen die *pnm*-mutierten Motoneurone nach sieben Tagen in Kultur einige axonale Pathologien auf, wenn sie in Gegenwart des neurotrophen Faktors BDNF kultiviert werden: Das Längenwachstum der Axone ist deutlich reduziert und entlang der Axone finden sich zahlreiche axonale Schwellungen mit Proteinaggregaten. Elektronenmikroskopisch findet sich eine Reduktion der Mikrotubulianzahl im proximalen Axonabschnitt, während die medialen und distalen Teile eine unveränderte Anzahl an Mikrotubuli aufweisen. Parallel findet sich in allen Axonabschnitten der *pnm*-mutierten Motoneurone eine deutliche Zunahme an Neurofilamenten.

Neben den morphologischen Veränderungen weisen die Motoneurone aus *pnm*-Mäusen zu diesem Zeitpunkt auch eine Störung im axonalen Transport der Mitochondrien auf, die in den Axonen saltatorisch und bidirektional entlang von Mikrotubuli transportiert werden, auf. So ist die Anzahl stationärer Mitochondrien in *pnm*-mutierten Motoneuronen signifikant erhöht, während die Anzahl an transportierten Mitochondrien und deren maximale Transportgeschwindigkeit reduziert ist.

Die morphologischen Veränderungen und die Störungen im axonalen Transport können kompensiert werden, wenn die *pnm*-mutierten Motoneurone statt mit BDNF mit dem neurotrophen Faktor CNTF kultiviert werden. Die Effekte von CNTF auf das Längenwachstum der Axone ist STAT3 vermittelt, da *pnm*-mutierte Motoneurone mit einer STAT3-Defizienz keine Reaktion mehr auf die Gabe von CNTF zeigen. Da STAT3 direkt mit Stathmin interagieren kann und dessen destabilisierende Wirkung auf Mikrotubuli dadurch verhindert, wurde angenommen, dass die STAT3 vermittelten CNTF Effekte auf eine lokale Wirkung von STAT3 in Axonen zurückzuführen ist. Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass die Herunterregulation der Stathmin Expression in *pnm*-mutierten Motoneuronen den gleichen Effekt auf das Längenwachstum zeigt, wie eine CNTF Gabe während der Kultivierung.

2 Summary

Pmn-mice are used as a model for neurodegenerative motoneuron disease: Whereas heterozygous mice are clinically normal, homozygous mutant mice exhibit many features, which are also observed in human motoneuron disease. The *pmn*-mice develop normally until the second postnatal week. Then they show weakness of the hind limbs, which rapidly progresses. Within a short time, also other muscle groups are involved, ultimately leading to death of the animals in the 4th to 6th week after birth. The underlying gene defect was found as a point mutation in the tubulin-specific chaperon E (TBCE) gene, which leads to a single amino acid exchange at an evolutionary highly conserved amino acid in TBCE protein. TBCE is ubiquitously expressed and plays a role in microtubule assembly. However, motoneurons are specifically affected and seem to be more vulnerable.

After generating an antiserum against TBCE, differences between motoneurons from *pmn*-mutant mice and control animals with regard to stability and subcellular localization of TBCE protein were analysed. Western blot analysis with lysates of spinal cord from 4 week old *pmn*-mice showed a reduction of TBCE protein expression. There were no differences in TBCE expression observed in immunocytochemistry with isolated embryonic motoneurons of *pmn* mice compared to wildtype mice: Neither the protein levels nor the subcellular distribution is altered. There is a strong TBCE immunoreactivity in cell soma of motoneurons, where TBCE is located in Golgi apparatus and at the centrosomes, where axonal microtubules are generated. Even there are no differences of TBCE expression at this time point, there are different axonal pathologies detectable: axon length of 7 days cultured motoneurons is significantly reduced and axonal swellings are visible when motoneurons are cultured with the neurotrophic factor BDNF. The number of microtubules is reduced in proximal parts of the axon and in parallel there is an increase of neurofilaments in all axonal parts, which was detectable by electron microscopy.

Apart from the morphological changes in *pmn*-mutant motoneurons there is a disturbance of axonal transport of mitochondria, which are transported in axons in a saltatory and bidirectional manner along microtubules. In motoneurons from *pmn*-mice the number of stationary mitochondria is significantly increased and in parallel the number of transported mitochondria as well as their maximum velocity is reduced.

Both, the morphological changes as well as the disturbance of axonal transport in *pmn*-mutant motoneurons can be rescued by treatment with the growth factor CNTF. The effects of CNTF on axonal outgrowth is mediated by STAT3, because rescue of CNTF to axon length is absent in *pmn*-mutant motoneurons lacking STAT3 expression. It is known that STAT3 can directly interact with stathmin, a regulator of microtubule dynamics. This interaction prevents the microtubule destabilizing activity of stathmin. So we assumed, that the STAT3 mediated effects of CNTF treatment are caused by local mechanisms in the axons. In deed, a shRNA downregulation of stathmin in *pmn*-mutated motoneurons cultured with BDNF has the same effects like treatment with CNTF.

3 Einleitung

3.1 Humane Motoneuronerkrankungen

3.1.1 Definition und Klassifikation der Motoneuronerkrankungen

Als Motoneuronerkrankungen werden alle Erkrankungen bezeichnet, denen eine spezifische Degeneration des ersten (zentralen) und/oder zweiten (peripheren) Motoneurons zugrunde liegt. Dabei werden die in der Regel familiären Erkrankungen der motorischen Vorderhornzellen (Spinale Muskelatrophien) und der gekreuzten Pyramidenbahnen (Spastische Spinalparese) von den vorwiegend sporadisch auftretenden Erkrankungen mit Degeneration meist beider Motoneurone (Amyotrophe Lateralsklerose und ihre Sonderformen) sowohl ätiopathogenetisch als auch prognostisch voneinander getrennt (Wallesch, 2005).

Bei der spastischen Spinalparese, die meist familiär, selten aber auch sporadisch auftritt, handelt es sich um eine seltene, klinisch und genetisch heterogene Gruppe neurodegenerativer Erkrankungen der gekreuzten Pyramidenbahn. Betroffene entwickeln meist ab dem Jugendalter, in manchen Fällen auch erst ab dem 30. - 40. Lebensjahr eine beinbetonte Steifigkeit mit zunehmender Spastik der Muskulatur und einer progredienten Gangstörung (Wallesch, 2005).

Erkrankungen, bei denen es zu einer Degeneration der peripheren motorischen Neurone kommt, führen zu ausgeprägtem Muskelschwund mit Lähmungen an den Armen, Beinen und am Körperstamm. In fortgeschrittenen Stadien ist auch die Atem- und Schluckmuskulatur und die Zunge betroffen. Tab. 3-1 gibt einen Überblick über die Klassifikation dieser Erkrankungen, wobei die Spinalen Muskelatrophien (SMA) mit den Hauptanteil dieser Gruppe bilden. Die SMA gehören mit einer Inzidenz von etwa 1:6.000 bis 1:10.000 zu den häufigsten der hereditären Erkrankungen mit schlechter Prognose.

Bezeichnung	Beginn der Erkrankung	Erstsymptome
Infantile, spinale Muskelatrophie (Werdnig Hoffmann)	erstes Lebensjahr	Muskelschwund und Schwäche beginnen im Beckengürtel
Proximale, erbliche, neurogene Amyotrophie (Kugelberg-Welander)	~ 9. Lebensjahr	Muskelschwund und Schwäche beginnen im Beckengürtel
Progressive, spinale Muskelatrophie vom Typ Duchenne-Aran	~ 30. Lebensjahr	Muskelschwund im Bereich der kleinen Handmuskeln symmetrisch auf beiden Seiten
Progressive, spinale Muskelatrophie vom Typ Vulpian-Bernhard	~ 30. Lebensjahr	Muskelschwund im Bereich des Schultergürtels
Peronealyp mit Manifestation an der Unterschenkelmuskulatur	Kindheit oder Erwachsenenalter	sehr langsames Fortschreiten des Muskelschwundes im Unterschenkel
Progressive Bulbärparalyse	3.-5. Lebensjahrzehnt	Sprechstörung, Kau- und Schluckstörung

Tab. 3-1: Klassifikation von Motoneuronerkrankungen mit Degeneration im 2. Motoneuron
(nach Wallesch 2005)

Die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS) ist durch eine rasch fortschreitende Degeneration der ersten und zweiten Motoneurone gekennzeichnet. Sie ist mit einer jährlichen Inzidenz von 1-2 pro 100.000 eine der häufigsten und schwersten degenerativen Motoneuronerkrankungen beim Erwachsenen (Shaw, 2005). Das Erkrankungsalter streut vom jungen Erwachsenenalter bis zum Senium mit einem deutlichen Altersgipfel in der 6. Dekade. Meist tritt die Krankheit sporadisch (sALS) auf, nur in 10% der ALS-Fälle findet sich eine erbliche Form (fALS).

Erste Beschwerden der Patienten sind Muskelschwäche und Atrophie der distalen Extremitätenmuskulatur, vor allem der Hände, sowie schmerzhafte Muskelkrämpfe. Das voll ausgebildete Krankheitsbild ist durch eine Kombination von Muskelschwund, schlaffen Lähmungen und Spastik der Muskulatur geprägt. Hinzu kommen Sprech-, Schluck-, Kau- und Atemstörungen sowie Faszikulationen der Muskulatur (Gubbay et al., 1985; Shaw, 2005). Die klinischen Symptome leiten sich direkt aus dem Befallsmuster ab. Der Ausfall der zentralen Motoneurone im Gyrus präzentralis führt zu spastischen Paresen durch Enthemmung spinaler Strukturen, der Ausfall der peripheren Motoneurone zu schlaffen atrophischen Paresen mit Faszikulationen der denervierten Muskulatur. Ausgeprägte sensible Ausfallerscheinungen gehören nicht zum Bild der ALS.

Prinzipiell ist zwischen kausal orientierter pharmakologischer Therapie und palliativer Behandlung zu unterscheiden, die auch symptomatische Therapieansätze mit einschließt. Dabei geht es um die Verbesserung einzelner neurologischer Funktionen und dem Erhalten bzw. Verbessern der Selbständigkeit und eine optimiertere Teilhabe am sozialen Leben. Eine kausale Therapie existiert derzeit bei keiner der dargestellten Erkrankungen.

3.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Für den primär pathogenen Prozess, der einer Motoneuronerkrankung zu Grunde liegt, wird ein multifaktorielles Zusammenwirken angenommen, wobei die genauen Mechanismen, die zu einem selektiven Zelltod der Motoneurone führt, bislang ungeklärt sind. Motoneurone gehören zu den größten Neuronen. Der Unterhalt von Axonen bis zu einem Meter Länge stellt spezielle Anforderungen, und zwar an den Metabolismus im Zellkörper auf der einen Seite und an hochorganisierte Prozesse des axonalen Transports auf der anderen Seite. Dies mag erklären, warum völlig unterschiedliche Pathomechanismen eine vergleichbare Schädigung von Motoneuronen bedingen können.

Einen Überblick über die molekularen Mechanismen als mögliche Ursachen für eine Motoneuronerkrankung gibt Abb. 3-1.

Bedeutsame Erkenntnisse wurden aus der Aufklärung einer familiären Form der ALS gewonnen: Etwa 20% der Patienten mit fALS weisen Punktmutationen im Gen der mitochondrial gebundenen Kupfer/Zink-Superoxiddismutase (SOD1) auf (Rosen et al., 1993). Inzwischen sind mehr als 100 verschiedene Mutationen im SOD1 Gen bekannt, wobei es sich mehrheitlich um Missense-Mutationen

handelt (Andersen et al., 2003). Das SOD1 Protein handelt ist ein Metalloenzym, das als Homodimer intrazelluläre freie Superoxid-Radikale, einem Abfallprodukt der mitochondrialen oxidativen Phosphorylierung, in Hydrogenperoxide umwandelt, die ihrerseits durch andere Enzyme abgebaut werden können. Ist die Funktion von SOD1 beeinträchtigt, resultiert daraus u. a. eine Störung der fein abgestimmten Balance zwischen Produktion und Entgiftung reaktiver Sauerstoffverbindungen, also sog. oxidativer Stress für die Zelle.

Für die wesentlich häufigere, sporadische Form der ALS wurde daraus abgeleitet, dass oxidativer Stress und damit eng verknüpft eine mitochondriale Dysfunktion und die Auslösung von Exzitotoxizität eine Rolle beim Neuronenuntergang spielen (Beal, 1995). Exzitotoxizität ist eine Form des neuronalen Zelltodes, der durch spezifische Rezeptoren vermittelt und durch den exzitatorischen Neurotransmitter Glutamat oder seine chemischen Analoga verursacht wird (Ludolph & Schwarz, 2001).

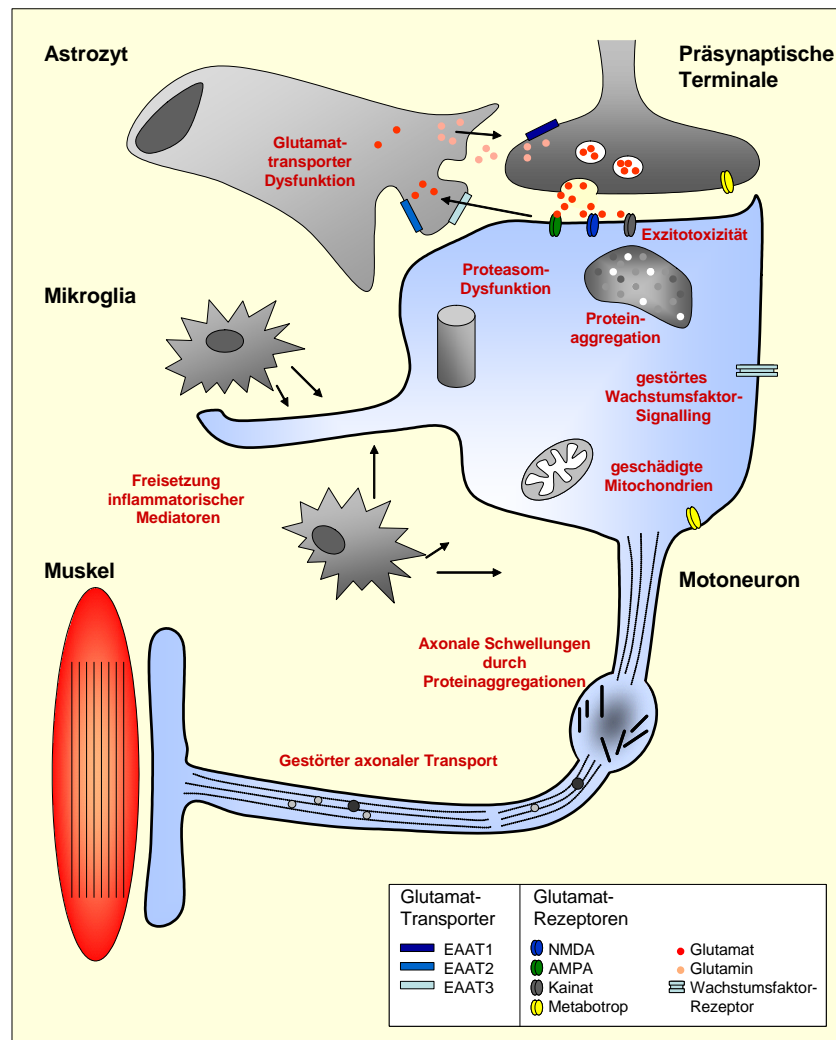


Abb. 3-1: Molekulare Mechanismen als mögliche Ursachen für Motoneurondegeneration (nach Shaw 2005)

Durch Genanalysen bei betroffenen Personen konnten eine Reihe weiterer Gene als Ursache bzw. Risikofaktor für das Entstehen einer Motoneuronerkrankung identifiziert werden (Tab. 3-2). Diese

Daten stützen die These eines multifaktoriellen Zusammenwirkens (Pasinelli & Brown, 2006; Shaw, 2005).

Als mögliche Ursachen von Motoneurondegenerationen werden beispielsweise eine reduzierte DNA-Stabilität, sowie Phänomene im Bereich der Virologie oder Immunologie angenommen (Okado-Matsumoto & Fridovich, 2002; Berger et al., 2000). Allerdings fehlen hierfür bislang schlüssige Beweise. Eine Störung neurotropher Wachstumsfaktoren oder ihrer Rezeptoren bzw. intrazellulärer Signalwege wird ebenso als Ursache für Motoneurondegeneration beschrieben (Meyer et al., 2003).

Durch Mausmodelle als gesichert gilt, dass auch eine Störung des axonalen Transports als Auslöser des neuronalen Zelltodes in Frage kommt. Eine solche Störung wird beispielsweise durch eine Akkumulation dysorganisierter Neurofilamente hervorgerufen (Hirano et al., 1984; Shaw, 2005; Mersiyanova et al., 2000; Julien & Mushynski, 1998). Neurofilamentproteine bilden eine Hauptkomponente der Zytoskeletts in Nervenzellen, vor allem in Neuronen mit langen Axonen, wie den Motoneuronen, sind sie als Strukturproteine zahlreich vertreten. Die Untereinheiten werden im Zellkörper der Neurone assembliert, durch langsamen, axonalen Transport entlang der Mikrotubuli transportiert, wobei eine zunehmende Phosphorylierung der Neurofilamente stattfindet (Shaw, 2005). Die Bedeutung der Neurofilamente für eine normale Funktion der Motoneurone wird dadurch unterstrichen, dass in ca. 1% der sporadisch auftretenden ALS Fälle Mutationen im Neurofilament H (NFH) Gen gefunden wurden (Tomkins et al., 1998; Figlewicz et al., 1994). Zudem entwickeln transgene Mäuse, die mutiertes Neurofilament L (NFL) überexprimieren, eine Degeneration der Motoneurone (Xu et al., 1993; Lee et al., 1994). In SOD1 transgenen Mäusen wiederum findet sich ebenfalls eine Veränderung der Neurofilamentorganisation (Zhang et al., 1997; Tu et al., 1996): Neurofilamentsphäriode, reduzierte Neurofilament Proteinspiegel und eine reduzierte Transportrate in Axonen ventraler Vorderhornzellen. Interessanterweise lässt sich in SOD1 mutierten Mäusen eine Störung des axonalen Transports bereits mehrere Monate vor Auftreten der ersten Krankheitssymptome nachweisen (Williamson & Cleveland, 1999).

Die molekularen Motoren für den anterograden Transport entlang von Mikrotubuli sind die Mitglieder der Kinesinfamilie. Mutationen in Genen, die für Proteine des Kinesin-Komplexes (Kinesin K1F1B β , Kinesin 21A, Kinesin KIF5A) kodieren, sind eng verbunden mit dem Auftreten verschiedener Motoneuronerkrankungen, darunter die hereditäre spastische Paraplegie (SPG10) und die Charcot-Marie-Tooth Krankheit vom Typ2A (Zhao et al., 2001; Reid et al., 2002; Yamada et al., 2003; Puls et al., 2003). Auch Mutationen, die den molekularen Motor für den retrograden Transport (Dynein-Dynactin-Komplex) betreffen, führen zu einer fortschreitenden Degeneration der Motoneurone (Puls et al., 2003; Hafezparast et al., 2003; LaMonte et al., 2002).

Der für die SMA verantwortliche Gendefekt ist eine Mutation oder Deletion des *survival of motor neuron (SMN1)* Genes (Lefebvre et al., 1995), wobei eine verminderte SMN-Proteinexpression zur Degeneration der Motoneurone führt. Das SMN-Protein spielt eine Rolle beim Zusammenbau der U snRNPs, beim Spleißen, der Transkription, sowie beim Transport von mRNAs (Jablonka et al., 2000c; Jablonka et al., 2000b; Rossoll et al., 2003b; Winkler et al., 2005). Gerade der axonale Transport von mRNAs scheint die Spezifität dieses Gendefektes für eine selektive Motoneuronerkrankung auszumachen (Jablonka et al., 2000a; Rossoll et al., 2003a).

Gen (Gensymbol)	Funktion	Erkrankung	Vererbung
Zytoskelettkomponenten und axonaler Transport			
Alsln (ALS2)	Vesikeltransport, GEF-Signalweg	Hereditäre spastische Paraplegie	AR
Atlantin (SPG3A)	Vesikelrecycling	Hereditäre spastische Paraplegie	AD
Dynaktin (DCTN1)	Transport Motor	ALS-like	AR
Gigaxonin (GAN)	Zytoskelett Filament	Periphere Neuropathie	AR
Kinesin 21A (KIF21A)	Transport Motor	Kongenitale Fibrose der extraokularen Muskeln	AD
Kinesin 5A (KIF5a)	Transport Motor	Hereditäre spastische Paraplegie	AD
Kinesin K1F1Bβ	Transport Motor	Periphere Neuropathie	AD
Maspardin (SPG21)	Golgi/Vesikeltransport und Sortierfaktor	Hereditäre spastische Paraplegie	AR
Mikrotubuliassoziiertes Protein Tau (MAPT)	Mikrotubuliassoziiertes Protein	ALS mit Parkinsonismus und Demenz	AD
Neurofilament L (NEFL)	Zytoskelett Filament	Periphere Neuropathie	AD
Neurofilament H (NEFH)	Zytoskelett Filament	sporadische ALS	
RAB7 (RAB7)	Golgi/Vesikeltransport und Sortierfaktor	Periphere Neuropathie	AD
Spastin (SPAST)	AAA-Prtein, Mikrotubuliassoziiertes Protein	Hereditäre spastische Paraplegie	AD
VAMP-assoziiertes Protein B (VAPB, ALS8)	Golgi/Vesikeltransport und Sortierfaktor	ALS	AD
Membranproteine und Transporter			
ABC1 (ABC1)	ABC Transporter	Periphere Neuropathie	AR
Adrenoleukodystrophie Protein (ABCD1)	ATP Transporter in Peroxisomen	Hereditäre spastische Paraplegie	AR
Exzitatorischer Aminosäuretransporter 2 (EAAT2)	Transporter	sporadische und familiäre ALS	
Kalium/Chlorid Co-Transporter	Kationen-Chlorid Cotransporter	Periphere Neuropathie	AR
Lamin A/C (LMNA)	Kernmembranprotein	Periphere Neuropathie	AD, AR
NIPA1 (NIPA1)	mögliches Membranprotein	Hereditäre spastische Paraplegie	AD
Signaltransduktion			
Alsln (ALS2)	GEF-Signalweg	ALS-like	AR
AMPA Rezeptor Untereinheit 2 (GluR2)	Ionenkanal	sporadische ALS	
Ciliary neurotrophic factor	Wachstumsfaktorrezeptor	fALS	
Dynamin (DNM2)	GTPase	Periphere Neuropathie	AD
Inhibitor of κ light chain enhancer in B cells (IKBKAP)	Transkriptionsfaktor	Periphere Neuropathie	AR
Rho-GEF 10 (ARHGFG10)	GEF-Signalweg	Periphere Neuropathie	AD
Tyrosinkinase A Rezeptor (TRKAR)	Wachstumsfaktorrezeptor	Periphere Neuropathie	AR
Vascular endothelial growth factor (VEGF)	Wachstumsfaktorrezeptor	sporadische ALS	
Mitochondrien			
Cytochrome C (COXC)	mitochondrialer Elektronentransport	kortikospinalbetonte ALS	M
Mitochondriale Isolysinyl tRNA Synthetase (MitrNAS)	mitochondrialer DNA/RNA Metabolismus	Lower motor predominant ALS	M
Mitofusin (MFN2)	mitochondriales Protein	Periphere Neuropathie	AD
Paraplegin (SPG7)	mitochondriale AAA Metalloprotease	Hereditäre spastische Paraplegie	AR
Superoxid Dismutase 1 (SOD1)	Radikalfänger, mitochondrienassoziiert	ALS	AD
DNA/RNA Metabolismus/Transport			
Senataxin (SETX, ALS4)	DNA/RNA Metabolismus	ALS-like	AD
Glycyl-tRNA Synthetase (GARS)	DNA/RNA Metabolismus	Periphere Neuropathie	AD
Tyrosyl-tRNA Synthetase (YARS)	DNA/RNA Metabolismus	Periphere Neuropathie	AD
Androgen Rezeptor	DNA/RNA Metabolismus	X-chromosomale spinobulbäre Muskelatrophie	AD
Immunoglobulin μ-bindendes Protein2 (IGSMBP2)	DNA/RNA Metabolismus	SMARD1	AR
Survival of motor neuron (SMN)	DNA/RNA Metabolismus, mRNA-Transport	Spinale Muskelatrophie	AR
weitere Proteine, Enzyme, Chaperone			
Apolipoprotein E (ApoE ε4)	Fettstoffwechsel	sporadische ALS	
Arylsulphatase A (ASA)	Enzym	Periphere Neuropathie	AR
Hexoseaminidase A und B (HEXA, HEXB)	Enzym	Tay-Sachs Erkrankung	AR
Hitzeschockprotein 22 (HSP22)	Hitzeschockprotein	Periphere Neuropathie	AD
Hitzeschockprotein 27 (HSP27)	Hitzeschockprotein	Periphere Neuropathie	AD
Hitzeschockprotein 60 (HSP60)	Mitochondriales Proteinchaperon	Silver Syndrom	AD
Phytanoyl CoA hydroxylase (PhyH)	Enzym	Periphere Neuropathie	AR
Porphobilinogen Deaminase (PBGD)	Enzym	Periphere Neuropathie	AD
Serin Palmitoyl Transferase (SPTLC1)	Enzym	Periphere Neuropathie	AD

Tab. 3-2: Mit Motoneuronenerkrankungen assoziierte neuronale Gendefekte und Risikofaktoren (nach Shaw 2005; Pasinelli and Brown 2006)

3.2 Die *pnm*-Maus als Modell für eine degenerative Motoneuronerkrankung

Ursprünglich wurde die *pnm*-Mauslinie durch eine spontane Mutation in einer Kolonie von NMRI Mäusen am Panum Institut in Dänemark identifiziert (Schmalbruch et al., 1991). Während heterozygote Mäuse klinisch unauffällig und nicht von wildtypischen Mäusen zu unterscheiden sind, entwickeln homozygote Mäuse neben Defekten in der Spermatogenese einige Anzeichen, wie man sie bei humanen Motoneuronerkrankungen findet. Bis zur zweiten postnatalen Woche sind die Mäuse klinisch unauffällig. Danach weisen sie eine progrediente Muskelschwäche der Hinterläufe auf. Innerhalb kurzer Zeit sind auch weitere Muskelgruppen betroffen, was zwischen der 4. und 6. postnatalen Woche schließlich zu einem Tod durch Atemlähmung führt (Schmalbruch et al., 1991).

Histologisch zeigen sich eine Atrophie und ein Verlust motorischer Axone in peripheren Nerven und der Motoneurone im Rückenmark und in den motorischen Kernen im Hirnstamm. Zudem sind Neurone im *Nucleus ruber* betroffen. Projektionen aus dem *Nucleus ruber* zu den spinalen Motoneuronen über den Tractus rubrospinalis sind bei Nagetieren funktionell mit dem Tractus corticospinalis verknüpft und tragen damit signifikant zur Innervation der spinalen Motoneurone bei (Jablonka et al., 2004). Dies entspricht funktionell der Innervation der spinalen Motoneurone durch das erste Motoneuron aus dem Cortex bei höheren Vertebraten.

Während die homozygoten *pnm*-Mäuse innerhalb von sechs Wochen sterben, kann der neurotrophe Faktor CNTF (ciliary neurotrophic factor) den Krankheitsverlauf beziehungsweise den Verlust von Motoneuronen verzögern (Sendtner et al., 1992; Sagot et al., 1998b). Auch die Gabe von GDNF (glia derived neurotrophic factor) hat einen signifikanten Einfluss auf die Überlebensrate der Zellkörper motorischer Neurone im *Nucleus facialis*, aber im Gegensatz zu CNTF zeigt GDNF keinen protektiven Einfluss auf Axone und auf den Krankheitsverlauf (Sagot et al., 1996). Auch andere neurotrophe Faktoren zeigen einen Einfluss auf die Motoneurondegeneration und den Krankheitsverlauf, wie NT-3 (neurotrophin-3) (Haase et al., 1997), BDNF (brain derived neurotrophic factor) (Sagot et al., 1998a) oder CT-1 (cardiotrophin-1) (Bordet et al., 1999).

Kulturen von isolierten embryonalen Motoneuronen aus *pnm*-Mäusen weisen keine Unterschiede in der Überlebensrate verglichen mit Motoneuronen aus Kontrolltieren auf. Dagegen ist die Länge der Axone bei Motoneuronen aus *pnm*-Mäusen deutlich reduziert (Bommel et al., 2002). Wie von anderen neurodegenerativen Erkrankungen bekannt, finden sich bei den kultivierten Motoneuronen aus *pnm*-Mäusen axonale Schwellungen, die auf Proteinaggregationen hindeuten (Chou, 1992; Bommel et al., 2002).

Verantwortlich für die Erkrankung der *pnm*-Mäuse ist eine Punktmutation (T1570G) im *Tubulin-spezifischen Chaperon E* (*tbce*, *Cofactor E*) Gen (Abb. 3-2, A), die zu einem Aminosäureaustausch (W524G) an einer evolutionär konservierten Aminosäure im TBCE-Protein führt (Abb. 3-2B) (Bommel et al., 2002; Martin et al., 2002). TBCE wird ubiquitär exprimiert (Bommel et al., 2002; Martin et al., 2002), wobei sich der Gendefekt spezifisch auf die Motoneurone auswirkt. Bei Überexpression von wildtypischem TBCE in *pnm*-Mäusen bleiben die transgenen Tiere phänotypisch gesund (Martin et al., 2002).

Sequenzanalysen zeigen eine 30%ige Aminosäure-Homologie des TBCE Proteins zu PAC2, einem Protein, das in die Mikrotubuli-Stabilität bei *Saccaromyces cerevisiae* involviert ist (Martin et al., 2002; Hoyt et al., 1997; Fleming et al., 2000). Zudem weist eine kurze Region des TBCE Proteins eine Homologie zur glyzinreichen CAP-Gly Domäne (Abb. 3-2, C) auf, wie man sie bei Mikrotubuli-assoziierten Proteinen, die einen Einfluss auf die Dynamik der Mikrotubuli haben, findet (Hirokawa, 1994; Hunter & Wordeman, 2000).

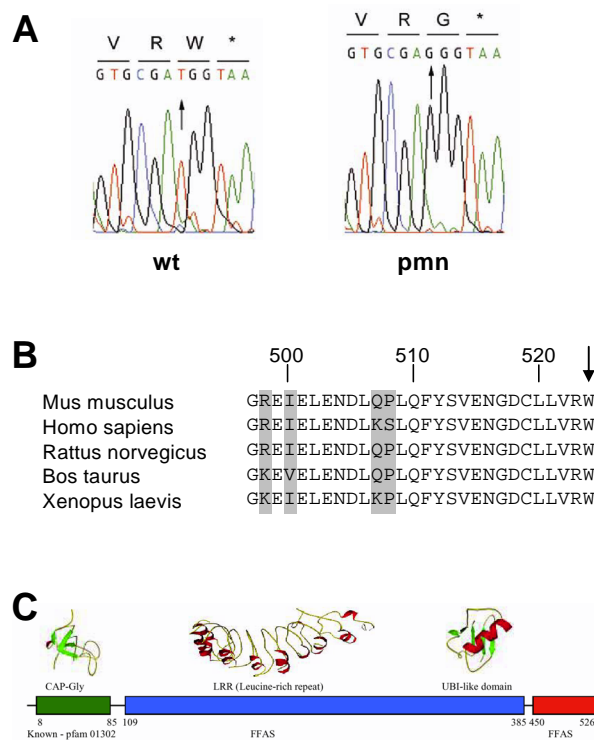


Abb. 3-2: Aufklärung des Gendefektes bei der *pmn*-Maus

(nach Bommel et al 2002; Grynberg et al. 2003; Martin et al. 2002)

A) Sequenzanalyse des *pmn* Genlokus bei Wildtyp und *pmn*-Mäusen

B) Darstellung der konservierten und semikonservierten (grau) Aminosäuren im TBCE-Protein

C) Darstellung der Proteindomänen im TBCE-Protein

Der Nachweis des Gendefektes in einer Komponente für den Aufbau der Mikrotubuli legt die Bedeutung der Mikrotubuli und des axonalen Transports für die Funktionsfähigkeit der Motoneurone nahe. Dass bei der *pmn*-Maus primär nicht das Überleben der Motoneurone betroffen ist, unterstreichen Experimente, bei denen *pmn*-Mäuse mit *bcl-2* transgenen Mäusen gekreuzt wurden. Obwohl der Zelltod der spinalen Motoneurone verhindert werden konnte, hatte die *bcl-2* Überexpression keinen Einfluss auf die axonale Degeneration, die fortschreitende Muskelschwäche und den Zeitpunkt des Todes (Sagot et al., 1995a).

Dass die *pmn*-Mäuse während der embryonalen Entwicklung, wenn die motorischen Axone auswachsen und erste Kontakte mit der Skelettmuskulatur ausbilden, gesund aussehen, ähnelt dem klinischen Phänotyp der humanen SMA und deutet darauf hin, dass TBCE erst nach der Geburt klinisch relevant wird. Inwieweit der Aminosäureaustausch an Position 524 im TBCE Protein jedoch seine zelluläre Funktion beeinträchtigt ist bislang ungeklärt.

3.3 Mikrotubuli und axonaler Transport

3.3.1 Aufbau und Assemblierung der Mikrotubuli

Mikrotubuli sind röhrenförmige Proteinfilamente in Zellen, die zusammen mit Aktinfilamenten und Intermediärfilamenten einen Bestandteil des Zytoskeletts bilden. Sie sind mitverantwortlich für die mechanische Stabilisierung der Zelle und ihrer äußeren Form, für aktive Bewegungen der Zelle als Ganzes, sowie für Bewegungen und Transporte innerhalb der Zelle.

Mikrotubuli bestehen aus Tubulin, einem Heterodimer aus α - und β -Tubulin Untereinheiten. Für die korrekte Faltung werden sowohl Prefoldin und das zytosolische Chaperonin CCT, als auch eine Reihe von Tubulin-spezifischen Chaperonen benötigt (Abb. 3-3) (Tian et al., 1997; Tian et al., 1996). Ungefaltete α - und β -Tubulin Polypeptidketten werden nach der Translation von Prefoldin übernommen und an CCT übergeben (Cowan & Lewis, 1999). Durch die Interaktion mit Prefoldin und CCT und nach ATP-Hydrolyse entstehen proteaseresistente Tubulin Monomere mit einer GTP-Bindestelle. Die Tubulin-spezifischen Cofaktoren A und B binden die β - und α -Tubulin Monomere und übergeben sie an die Cofaktoren D bzw. E. Anschließend wird ein Tubulin-Cofaktor-Superkomplex bestehend aus den Cofaktoren C, D und E, sowie den α - und β -Tubulin Monomeren gebildet. Eine GTP-Hydrolyse durch β -Tubulin in diesem Komplex führt schließlich zur Bildung der Heterodimere (Cowan & Lewis, 1999).

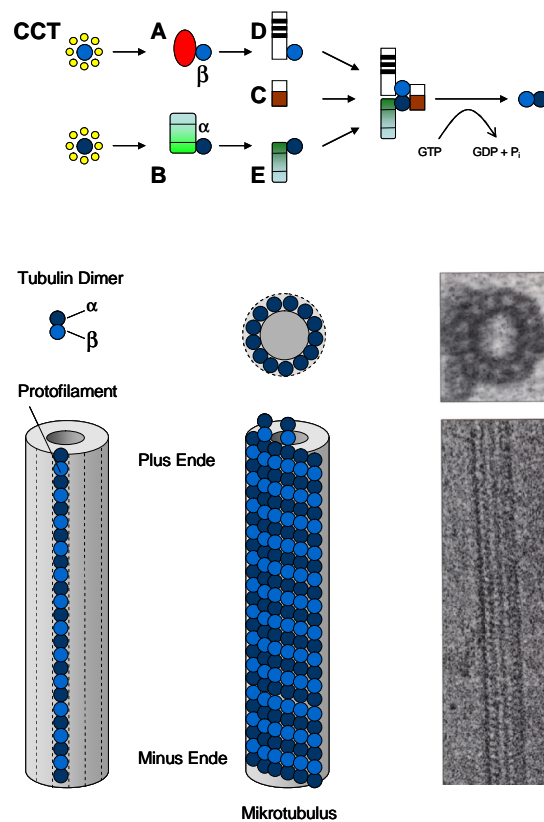


Abb. 3-3: Assemblierung von Tubulin und Aufbau der Mikrotubuli
(nach Grynberg et. al 2003)

Im weiteren Verlauf polymerisieren die Tubulin Heterodimere ausgehend vom MTOC, dem „microtubule organizing center“, zu Protofilamenten, die sich helikal zu einem Zylinder anordnen. Zur Ausbildung einer Drehung werden 13-14 Tubulindimere benötigt. Die Durchmesser der Mikrotubuli variieren zwischen 15 und 25 Nanometer. Abb. 3-3 zeigt den Aufbau der Mikrotubuli sowohl schematisch, als auch in elektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Im Zytoplasma der Zellen liegt in der Regel ein Gleichgewicht zwischen polymerisiertem und nicht-polymerisiertem Tubulin vor. Die Tubulindimere werden ständig am Plus-Ende des Mikrotubulus eingebaut und/oder abgebaut. Hierdurch entsteht ein dynamisches Netzwerk von Mikrotubuli-Filamenten in der Zelle.

Mit den Mikrotubuli sind zahlreiche Proteine assoziiert (Abb. 3-4). Die bekanntesten sind Motorproteine für den axonalen Transport, wie Dynein und Kinesin. Zudem gibt es eine ganze Gruppe von Proteinen mit dem Sammelnamen MAPs ("microtubule associated proteins"). Die meisten MAPs nehmen offenbar regulatorische Funktionen wahr.

3.3.2 Stathmin als Regulator der Mikrotubulidynamik

Ein wichtiger Regulator der Mikrotubulidynamik ist das Phosphoprotein Stathmin. Dieses kleine (18 kD) ubiquitär exprimierte Protein, das auch unter dem Namen Onkoprotein 18 bekannt ist, ist überwiegend im Zytoplasma lokalisiert (Ng et al., 2006). Zur Familie der Stathmin Proteine gehören auch das Suprazervikale Ganglionprotein 10 (SCG10), SCG10-like Protein (SCLIP) und RB3. Die Stathmin-verwandten Proteine weisen alle eine hochhomologe Tubulin-bindende Domäne an ihrem C-Terminus auf (Charbaut et al., 2001). An ihrem N-Terminus befindet sich eine variable membranverankernde Domäne, welche die Proteine überwiegend an den Golgi-Apparat bindet (Gavet et al., 1998).

Ursprünglich wurde Stathmin als ein Schlüsselfaktor bei der Regulation der Zellproliferation beschrieben (Sobel et al., 1989). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass Stathmin die Fähigkeit besitzt, α/β -Tubulin Heterodimere zu binden und so zu einer Destabilisierung der Mikrotubuli beiträgt (Belmont & Mitchison, 1996). Dieser Mechanismus spielt bei der Kontrolle des Aufbaus der Mikrotubulispindel wie auch bei anderen Prozessen, die auf eine Dynamik der Mikrotubuli angewiesen sind, eine entscheidende Rolle (Marklund et al., 1994; Iancu et al., 2001). Stathmin scheint auch an der Regulation der Zellmotilität beteiligt zu sein (Baldassarre et al., 2005; Giampietro et al., 2005). In einer Arbeit von Ng et al. (2006) wird die Proteininteraktion von Stathmin mit dem Transkriptionsfaktor STAT3 vorgestellt. Die Ergebnisse der Arbeit legen nahe, dass STAT3 durch eine direkte, funktionelle Interaktion mit Stathmin im Zytoplasma die Mikrotubulidynamik moduliert und so den Einfluss auf die Zellmigration ausübt.

3.3.3 Mikrotubuliabhängiger axonaler Transport

Der Transport von Molekülen, Zellorganellen und Vesikeln entlang der Mikrotubuli ist ein fundamentaler zellulärer Prozess, der für die Entwicklung, die Funktion und das Überleben von Nervenzellen von Bedeutung ist. Viele Moleküle und Zellorganellen werden vorwiegend im Soma der

Zelle synthetisiert und müssen an ihre zum Teil weit entfernten Wirkorte transportiert werden. Das Axon eines großen Motoneurons des Menschen mit einem Zellkörperdurchmesser von 100 μm hat z.B. einen Durchmesser von 15 μm und eine Länge von etwa 1 m. Diese Größenverhältnisse machen die Notwendigkeit eines effizienten Transportsystems in der Nervenzelle deutlich. Man unterscheidet hierbei den anterograden Transport (Vorwärtstransport), der vom Zellkörper in die Peripherie des Axons führt und eine langsame (1-5 mm/Tag) und eine schnelle Komponente (bis 400 mm/Tag) aufweist, vom retrograden Transport (Rückwärtstransport), der Substanzen zum Soma zurückführt und eine Geschwindigkeit von 200-300 μm /Tag hat (Grafstein & Forman, 1980; Vallee & Bloom, 1991). Während der schnelle anterograde Transport auf dem Motorprotein Kinesin beruht, erfolgt der retrograde Transport unter Beteiligung des Motorproteins Dynein. Beide Mechanismen basieren auf dem polar strukturierten Zellskelett des Axons.

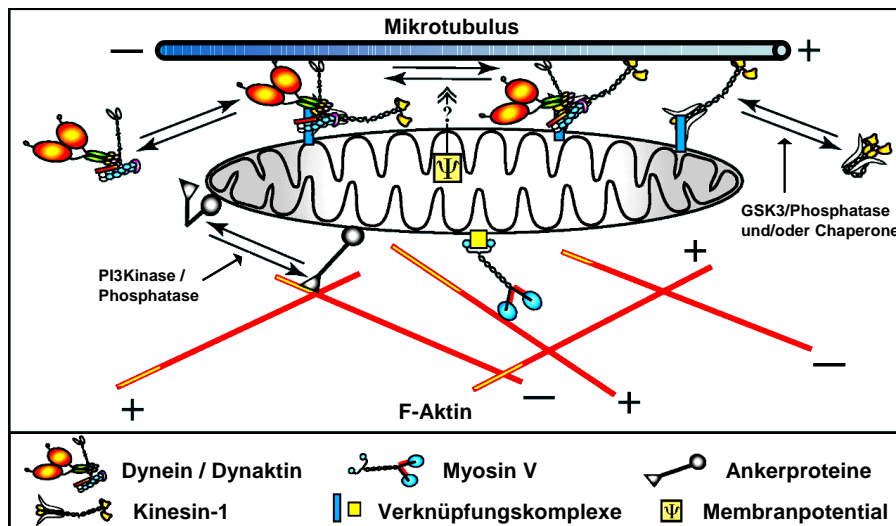


Abb. 3-4: Axonaler Transport von Mitochondrien
(nach Hollenbeck and Saxton 2005)

Für die genannten Transportsysteme bringt die Nervenzelle umfangreiche energieverbrauchende Prozesse in Gang. Energielieferanten der Zelle sind die Mitochondrien, die im Rahmen der Zellatmung unter Sauerstoff-Verbrauch ATP herstellen. Der axonale Transport von Mitochondrien (Abb. 3-4) ist charakteristisch. Sie werden sowohl anterograd wie retrograd transportiert, um sie an Stellen eines erhöhten Metabolismus anzureichern, wie beispielsweise an Synapsen (Palay, 1956; Treeck & Pirsig, 1979; Gotow et al., 1991; Bogan & Cabot, 1991), aktiven Wachstumskegeln und Verzweigungsstellen (Povlishock, 1976; Morris & Hollenbeck, 1993; Ruthel & Hollenbeck, 2003), Ranvier'schen Schnürringen (Fabricius et al., 1993), distalen Initiierungselementen (Li et al., 2004) und an Stellen mit axonaler Proteinsynthese (Martin et al., 1998). Der Transport der Mitochondrien ist ferner durch häufige Stopps entlang der Axone geprägt. Nach einer Verweildauer wird der Transport teilweise in die entgegengesetzte Richtung wieder aufgenommen, wobei ein schneller Richtungswechsel auch während des Transports erfolgen kann (Hollenbeck & Saxton, 2005).

Der axonale Transport von Mitochondrien über weite Distanzen ist Mikrotubuli-abhängig (Grafstein & Forman, 1980; Hollenbeck, 1996), wohingegen für kurze Strecken auch ein Aktin/Myosin-abhängiger Transport postuliert wird (Kuznetsov et al., 1992; Ligon & Steward, 2000; Langford, 2002; Bridgman, 2004; Morris & Hollenbeck, 1995).

3.4 Ziele der Arbeit

Nach Aufklärung der Punktmutation im TBCE-Gen bei der *pmn*-Mausmutante stellte sich die Frage, welche Rolle das mutierte TBCE bei der Entstehung und dem Verlauf der Motoneuronerkrankung in *pmn*-Mäusen spielt. Es wurde vermutet, dass das *pmn*-mutierte TBCE Protein eine geringere Stabilität aufweist als die wildtypische Variante. Es könnte jedoch auch sein, dass die subzelluläre Lokalisation und damit sekundär die Funktion des Proteins verändert ist. Zur Klärung dieser Fragen sollte zunächst ein Antiserum generiert und charakterisiert werden um anschließend die Stabilität und die subzelluläre Lokalisation des endogenen Proteins in Motoneuronen zu untersuchen.

Da TBCE bei der Assemblierung der Mikrotubuli beteiligt ist, sollte mittels elektronenmikroskopischer Analysen die Struktur des axonalen Mikrotubuliskeletts von *pmn*-mutierten Motoneuronen mit wildtypischen Motoneuronen verglichen werden. Etwaige Defizite im axonalen Mikrotubuliskelett könnten Auswirkungen auf die Aufrechterhaltung der Axone, insbesondere des axonalen Transports haben. Um Unterschiede im axonalen Transport von *pmn*-mutierten Motoneuronen zu untersuchen, sollten Mitochondrien, die in Axonen bidirektional entlang von Mikrotubuli transportiert werden, mittels geeigneter Farbstoffe sichtbar gemacht und ihr Transport in lebenden Zellen analysiert werden.

Es ist bekannt, dass verschiedene neurotrophe Faktoren bei in vivo Experimenten mit *pmn*-Mäusen differentielle Wirkungen haben. Nach Aufklärung des Gendefektes war es möglich, die Wirkung der neurotrophen Faktoren BDNF, CNTF und GDNF an isolierten embryonalen Motoneuronen zu studieren, um so Einfluss auf die bei *pmn*-mutierten Motoneuronen beschriebenen axonalen Pathologien zu nehmen und die intrazellulären Signalwege der neurotrophen Faktoren in Bezug auf die Rettung der axonalen Pathologien aufzuklären.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Versuchstiere

Alle Versuchstiere wurden gemäß den geltenden Richtlinien in einem 12h/12h Tag-Nacht-Rhythmus, mit freiem Zugang zu Futter und Wasser, gehalten.

4.1.1.1 *Pmn*-Mauslinie

Die *pnm*-Mauslinie ist durch eine spontane Mutation in einer Kolonie von NMRI Mäusen am Panum Institut in Dänemark entstanden (Schmalbruch et al., 1991). Der ihr zugrunde liegende Gendefekt ist eine Punktmutation (T à G) im Tubulin-spezifischen Chaperon E auf Chromosom 13. Die *pnm*-Mauslinie wurde kontinuierlich auf einen NMRI Hintergrund (Jackson ImmunoResearch Laboratories) zurückgekreuzt.

4.1.1.2 NFL-Cre Mauslinie

Die NFL-Cre Mauslinie wurde von Ulrich Schweizer generiert und weist eine motoneuronspezifische Expression der Cre-Rekombinase auf. Die Expression der Cre-Rekombinase steht dabei unter dem Promotor von Neurofilament L (NFL) (Schweizer et al., 2002).

4.1.1.3 STAT3 Mauslinien (STAT3^{flox/flox} und STAT3^{wt/ko})

Die STAT3 Mauslinien stammen aus dem Labor von S. Akira, Osaka (Takeda et al., 1997; Takeda et al., 1998). Bei der STAT3^{flox/flox} Mauslinie liegt STAT3 homozygot gefloxt vor, d.h. beide Allele von STAT3 werden von LoxP Seiten flankiert. Diese dienen als Schnittstellen für die Cre-Rekombinase, wodurch die flankierte Genregion aus dem Genom ausgeschnitten werden kann (Chapman et al., 2000). Die STAT3^{wt/ko} Mauslinie ist eine heterozygot STAT3-defiziente Linie.

4.1.2 Zelllinien

4.1.2.1 293T Zelllinie

Zum Herstellen von Lentiviren wurden 293T Zellen verwendet. Es handelt sich hierbei um einen Subklon von HEK293 Zellen, die das große Tumorantigen des Semian 40 Virus (SV40) exprimieren (DuBridge et al., 1987).

4.1.2.2 PC12 Zelllinie

Die immortale Tumorzelllinie PC12 wurde 1976 aus einem Tumor des Nebennierenmarks der Ratte isoliert (Greene & Tischler, 1976). Die Zellen wachsen adhärent, führen zu transplantierbaren Tumoren in Ratten und reagieren reversibel auf NGF (nerve growth factor) mit der Ausbildung neuronenhähnlicher Fortsätze. In der vorliegenden Arbeit wurden die PC12 Zellen zum Testen der Effizienz hergestellter Lentiviren verwendet.

4.1.3 Bakterienstämme

Für die Expression von Plasmiden wurden folgende Bakterienstämme verwendet: HB101, DH5 α und JM109.

4.1.4 Chemikalien und Enzyme

Alle Grundchemikalien und Reagenzien wurden in p.A. Qualität von folgenden Firmen bezogen: Amersham, Applichem, BD, Calbiochem, Chemicon, Fluka, Gibco, Invitrogen, Merck, R&D, Roche Roth, Sigma-Aldrich und Qiagen. Weiterhin wurden Enzyme von folgenden Firmen verwendet: Biotherm, Fermentas, Invitrogen, Roche und Sigma.

4.1.5 Puffer und Lösungen

Die Zusammensetzungen der Puffer und Lösungen wurden dem Laborhandbuch Sambrook et al. (1989) entnommen oder entsprechen bei kommerziellen Kits den Angaben in den jeweiligen Herstellerprotokollen bzw. den angegebenen Referenzen.

Lösungen, die dort nicht angegeben sind oder zur Optimierung verändert wurden sind unten angegeben:

Blotpuffer	48,5 mM Tris 39 mM Glyzin 0,4% SDS 20% Methanol
Boratpuffer	0,15 M Borsäure pH 8,3
Lämmli Probenpuffer (2x)	125 mM Tris, pH 6,8 6% Glyzerin 2% SDS 0,025% Bromphenolblau 5% 2-Mercaptoethanol
Lysispuffer für DNA-Extraktion	10 mM Tris, pH 7,5 100 mM EDTA 150 mM NaCl 0,5% SDS
Lysispuffer für Proteinextraktion	10 mM Tris, pH 7,5

	100 mM EDTA, pH 8,0 150 mM NaCl 0,5% SDS Protease Inhibitor Cocktail (Roche)
Paraformaldehydlösung (4%)	1,6g PFA 20 ml H ₂ O 3 Tropfen NaOH im Wasserbad bei 60°C erwärmen bis PFA gelöst 16,4 ml Na ₂ HPO ₄ (0,2 M) 3,6 ml NaH ₂ PO ₄ (0,2M) pH 7,1 – 7,4
PBS	1,48 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O 0,43 g KH ₂ PO ₄ 7,2 g NaCl ad 1 l dH ₂ O, pH 7,4-7,6
RIPA-Puffer	50 mM Tris, pH 7,5 150 mM NaCl 0,1% SDS Protease Inhibitor Cocktail (Roche)
TBST (10x)	100 mM Tris, pH 7,6 1,5 M NaCl 0,5% Tween 20

4.1.6 Medien und Medienzusätze

4.1.6.1 Medien und Medienzusätze für die Zellkultur

Medium für PC12-Zellen:	DMEM mit Glutamax 10% Pferdeserum 5% FCS 1% Ampicillin/Streptomycin
Medium für HEK293T-Zellen:	MEM mit Glutamax 10% FCS 1% Ampicillin/Streptomycin
Medium für primäre Motoneurone	Neurobasal Glutamax

	B27 Supplement
	2% Pferdeserum
B27 Supplement	Invitrogen
BDNF	Promega
CNTF	Promega
DMEM	Invitrogen
DMSO	Sigma
Fötale Kälberserum	Linaris
GDNF	Promega
Glutamax	Invitrogen
HBSS	Invitrogen
Laminin	Rupert Timpl (MPI, München)
Lektin	Sigma
MEM	Invitrogen
Neurobasal	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen
Pferdeserum	Linaris
Poly-D,L-Ornithin	Sigma

4.1.6.2 Medien und Medienzusätze für Bakterienkultur

Ampicillin	Sigma
Kanamycin	Sigma
LB-Medium	Invitrogen
SOC-Medium	Invitrogen

4.1.7 Nukleinsäuren und Vektoren

pGJ3	Institut für Virologie, Würzburg
pGJ3(SFFVp)	Institut für Virologie, Würzburg
pczVSV-G	VSV-Glykoprotein-Expressionsplasmid Institut für Virologie, Würzburg (Pietschmann et al., 1999)
pEGFP-C1	Eukaryotischer Expressionsvektor, Clontech
pcDNA3.1 (+/Zeo)	Eukaryotischer Expressionsvektor, Promega
pCR4-TOPO	Invitrogen
pLL3.7	Lentilox 3.7, Institut für Virologie, Würzburg (Rubinson et al., 2003)
pRSV-REV	Institut für Virologie, Würzburg (Dull et al., 1998)
pMD.G	Institut für Virologie, Würzburg (Dull et al., 1998)

pMDLg/pRRE

Institut für Virologie, Würzburg (Dull et al., 1998)

Die folgenden Plasmide wurden selbst hergestellt (Beschreibung im Anhang Kap. 7.4)

pGJ3 polylinker

pGJ3(SFFVp) polylinker

pGJ3(SFFVp)-EGFP

pGJ3(CMVp)-EGFP

pGJ3(SFFVp)HA-Tbce wt

pGJ3(SFFVp)HA-Tbce pmn

pLL3.7 Stathmin Oligo1

pLL3.7 Stathmin Oligo2

pLL3.7 Stathmin Oligo3

pLL3.7 Stathmin Kontrolle (mismatch)

4.1.8 Oligonukleotide

NFL-SEQ	5'-TCG CAG GCT GCG TCA GGA G-3'
pMC-Cre	5'-GGT ATG CTC AGA AAA CGC C-3'
STAT3 a ko	5'-AGC AGC TGA CAA CGC TGG CTG AGA AGC T-3'
STAT3 b ko	5'-TTG CTG CTC TCG CTG AAG CGC AGT AGG-3'
STAT3 c ko	5'-ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC CAG-3'
STAT3 flox s	5'-CCT GAA GAC CAA GTT CAT CTG TGT GAC-3'
STAT3 flox as	5'-CAC ACA AGC CAT CAA ACT CTG GTC TCC-3'
Tbce (Restr) s	5'-TGA CCA ACC AAA TCA CTG CTG TAG TG-3'
Tbce (Restr) as	5'-TAG CAT GCA CCA TCA GAT CG-3'
Tbce (Seq) s	5'-GCA TGC ACC ATC AGA TCG GT-3'
Tbce (Seq) as	5'-CTG AAG ATG TGG TTC CTC AG-3'
Tbce (SNP) s	5'-CAC CAT CAG ATC GGT CTT ACT GC-3'
Tbce (SNP) as	5'-AAC CAA ATG GTC TTT TCC CAA C-3'
Tbce 1570Sensor	5'- GCC TAC TAG TGC GAT GGT AAC AG (FL)-3'
Tbce 1570Anker	5'- (LC Red640)-CCA ACC GTA AGA GTT TAA CGA CTG GAA TGT p-3'
StathminOligo 1	tcg aga aaa aag cgc gct tca ggc cag gct tct ctt gaa agc ctg gcc tga agc gcg cA
Stathmin Oligo 2	tcg aga aaa aag tct cat gag gcg gaa gtc tct ctt gaa gac ttc cgc ctc atg aga cA
Stathmin Oligo 3	tcg aga aaa aag ggg aga aac tga aag tgt tct ctt gaa aca ctt tca gtt tct ccc cA
Stathmin Kontrolle	tcg aga aaa aag gtt aga aac tta aag tgt tct ctt gaa aca ctt taa gtt tct aac cA

4.1.9 Kits

Big Dye Terminator Mix

Applied Biosystems

Dye Ex 2.0 Spin Kit	Qiagen
NucleoSpin [®] Plasmid	Machery-Nagel
QIAGEN Plasmid Kit	QIAGEN
QIAquick Gelextraction Kit	QIAGEN
QIAGEN PCR Purification Kit	QIAGEN
SuperScript [™] First-Strand	Invitrogen
Synthesis System for RT-PCR	
TOPO TA Cloning [®]	Invitrogen

4.1.10 Antikörper und Detektionssysteme

Name	Antikörperart, Spezies	Verdünnung	Bezugsquelle
anti-β-Aktin	monoklonal, Maus	IF: 1:1000 WB: 1:3000	Abcam
anti-βIII-Tubulin	monoklonal, Maus	IF: 1:1000 WB: 1:3000	Chemicon
anti-γ-Tubulin	monoklonal, Maus	IF: 1:2	Sigma-Aldrich
anti-GFP	polyklonal, Kaninchen	WB: 1:1000	Santa Cruz Biotechnology
anti-Islet1	monoklonal, Maus	IF: 1:1	Institut für Klinische Neurobiologie
anti-MAP-2	monoklonal, Maus	IF: 1:1000	Chemicon
anti-p75 ^{NTR}	monoklonal, Maus	ZK: 1:1000	Chemicon
anti-pTau	polyklonal, Kaninchen	IF: 1:1000	Sigma
anti-Stathmin	polyklonal, Kaninchen	IF: 1:200 WB: 1:200	Cell Singaling
anti-TBCE	polyklonal, Kaninchen	IF: 1:1000 WB: 1:1500	Institut für Klinische Neurobiologie
Cy 2 anti-Kaninchen	Ziege	IF: 1:250	Jackson ImmunoResearch
Cy 2 anti-Maus	Ziege	IF: 1:250	Jackson ImmunoResearch
Cy 3 anti-Kaninchen	Ziege	IF: 1:250	Jackson ImmunoResearch
Cy 3 anti-Maus	Ziege	IF: 1:250	Jackson ImmunoResearch
HRP anti-Kaninchen	Ziege	WB: 1:5000	Jackson ImmunoResearch
HRP anti-Maus	Ziege	WB: 1:5000	Jackson ImmunoResearch

4.1.11 Software

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit kamen folgende Computerprogramme zum Einsatz: Adobe Illustrator, Adobe Photoshop, GraphPadPrism, ImageJ und Leica Confocal Software.

4.2 Methoden

4.2.1 Gewebeentnahme und –aufbereitung

Für eine Gewebeentnahme wurden die Tiere durch zervikale Dislokation getötet. Anschließend wurde das benötigte Gewebe für die verschiedenen Verwendungszwecke auf unterschiedliche Arten entnommen:

4.2.1.1 Nukleinsäureextraktion

Das Gewebe wurde nach der Entnahme auf Eis zerteilt, in ein Reaktionsgefäß mit Trizol[®] Reagenz (Invitrogen) überführt und entweder bei -70°C gelagert oder gemäß den Angaben des Herstellers die DNA bzw. RNA isoliert.

4.2.1.2 Proteinextraktion

Nach der Präparation wurde das Gewebe in ein Reaktionsgefäß mit RIPA- bzw. Lysispuffer auf Eis überführt. Nach mechanischer Zerteilung des Gewebes mit einem Mikropistill, wurde das Lysat für Proteinbiochemische Analysen verwendet.

4.2.1.3 Primärkultur

Für das Anlegen von primären Motoneuronkulturen wurden Mausembryonen vom Embryonaltag E14 verwendet. Dabei wurde der Tag nach der Paarung, erkennbar am „Vaginalpropf“, als Tag 1 der Embryonalentwicklung festgelegt. Zunächst wurden die beiden Hörner des Uterus am Stück aus dem Muttertier entnommen und die Fruchtblasen freipräpariert. Anschließend wurden die Embryonen einzeln aus der Fruchtblase entnommen. Zum Zwecke der Genotypisierung wurde der Kopf bzw. der Schwanz abgetrennt und in einem Reaktionsgefäß mit Lysispuffer für DNA-Extraktion gesammelt. Mit zwei spitzen Pinzetten wurde das lumbale Rückenmark am Stück entnommen und in HBSS überführt. Nach Entfernung der Glia limitans wurde das embryonale Rückenmark in 180 µl HBSS aufbewahrt, bis alle Embryonen entsprechend präpariert waren.

4.2.2 Anlegen von Primärkulturen embryonaler Motoneurone

Für das Anlegen primärer Motoneuronkulturen wurde das lumbale Rückenmark wie unter 4.2.1.3 beschrieben präpariert. Nach Zugabe von 20 µl Trypsin (1%) wurde das Gewebe 15 min bei 37°C inkubiert und der enzymatische Verdau anschließend mit 20 µl Sojabohnen-Trypsininhibitor (0,1%) abgestoppt. Nach einer Trituration des Gewebes wurde die Zellsuspension in 800 µl Neurobasalmedium auf einer 24-Lochplatte überführt, die zuvor mit 10 ng/ml anti-p75^{NTR} Antikörper bzw. mit 10 µg/ml Lektin (beides in 10 mM Tris, pH 8,0) für 2 h bei RT beschichtet worden war. Alle nicht-gebundenen Zellen wurden durch dreimaliges Waschen mit Neurobasalmedium entfernt, die gebundenen Motoneurone mit 300 µl Depolarisationslösung (30 mM KCl, 0,8% NaCl) abgelöst und mit 2 ml Vollmedium (Neurobasalmedium, B27 Supplement, Glutamax, 2% Pferdeserum) suspendiert. Die Motoneurone wurden anschließend bei 400 g für 5 min zentrifugiert, das Pellet in frischem Vollmedium

suspendiert und die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Für die Ermittlung von Überlebensraten, das Ausmessen neuronaler Fortsätze und Immunfluoreszenz-Analysen wurden 1000 – 1500 Zellen pro Vertiefung auf Nunc 4-Lochplatten in 100 µl Vollmedium plattiert, die zuvor mit Poly-D,L-Ornithin (0,5 mg/ml in 0,15 M Boratpuffer pH 8,3) und danach mit Laminin (2,5 µg/ml in HBSS) beschichtet worden waren. Für elektronenmikroskopische Analysen und Lebendzellbeobachtungen wurden 5000 oder 10000 Zellen in beschichtete 3 cm Lochplatten plattiert. Nach dem Absetzen der Zellen wurden je nach Experiment unterschiedliche neurotrophe Faktoren (BDNF 1 ng/ml, CNTF 1 bzw. 10 ng/ml, GDNF 1 ng/ml) zugesetzt. Das Medium wurde am Tag nach dem Anlegen der Kultur (2 DIV) und dann an jedem zweiten Tag gewechselt.

Zur Bestimmung von Überlebensraten wurden ca. 3-5 Stunden nach dem Ausplattieren adhärente, im Phasenkontrast dunkel erscheinende Zellen mit hellem Rand als Motoneurone gezählt. Später sind die Motoneurone deutlich an ihrem polaren Aufbau (langes Axon, kurze Dendriten) zu erkennen und beispielsweise von bipolaren Spinalganglienzellen zu unterscheiden.

4.2.3 Eukaryonten-Zellkultur

Alle oben aufgeführten Zelllinien wurden in ihrem jeweiligen Wachstumsmedium bei 37°C im Begasungsbrutschrank bei 95% rel. Luftfeuchte und 5% CO₂ kultiviert. Medien und Lösungen wurden vor Benutzung auf 37°C erwärmt.

Die adhärent wachsenden Zelllinien (PC12 und HEK293T) wurden routinemäßig alle 4-6 Tage gesplittet. Hierzu wurden sie bei 37°C einige Minuten lang mit Trypsin/EDTA-Lösung (0,05% Trypsin, 0,02% EDTA in PBS) behandelt (mikroskopische Kontrolle).

4.2.4 Herstellung von Lentiviren

Für einen Gentransfer in primäre Motoneurone wurde ein lentivirales System verwendet, da sich Motoneurone für konventionelle Transfektionsmethoden (Kalziumphosphat, Lipofektion) und Elektroporation nicht eignen. Die Herstellung von Lentiviren in 293T-Zellen wurde 2006 in einer Methodenarbeit bereits publiziert (Bender et al., 2006).

4.2.5 Mikrobiologie

Allgemeine mikrobiologische Arbeiten, wie die Herstellung transformationskompetenter Zellen oder die Transformation in *E. coli* wurden aus dem Laborhandbuch Sambrook et al. (1989) entnommen, bzw. gemäß den Angaben kommerzieller Kits durchgeführt.

4.2.6 Molekularbiologische Methoden

Grundlegende molekularbiologische Arbeitsprinzipien und Methoden, wie DNA-Restriktionsverdau, DNA-Gelelektrophorese, Ligation etc., wurden aus Sambrook et al. (1989) übernommen.

4.2.6.1 Nukleinsäuren

Plasmide aus *E. coli* wurden mit Kits der Firma QIAGEN präpariert. Entsprechend der Kulturgrößen wurden das Mini Spin Kit (max. 10 µg Plasmid aus 1,5 ml Kultur) oder das Maxi Kit (bis zu 600 µg aus 100 ml Kultur) verwendet. BAC DNA wurde durch Phenol:Chloroform Extraktion und anschließender Ethanolpräzipitation extrahiert.

Bei der Extraktion von DNA aus Agarosegelen wurde nach dem Protokoll des QIAquick Gelextraction Kit vorgegangen.

4.2.6.2 Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Bei der reversen Transkription wird RNA in cDNA umgeschrieben. Als Ansatzstelle der Reversen Transkriptase dienen beispielsweise Oligo(dT)₁₅₋₁₈ Primer, die spezifisch an den Poly-A-Schwanz der mRNA binden.

Die Gesamt-RNA aus Gewebe oder Zellkultur wurde mittels TRIZOL[®] Reagenz entsprechend der Anleitung des Herstellers präpariert. Anschließend wurden 100 ng Gesamt-RNA mit Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen) entsprechend den Herstellerangaben revers transkribiert. Nach Verdau der RNA mit RNase H konnte die cDNA als Ausgangsmaterial für Klonierungen oder (semi)quantitative PCR-Analysen verwendet werden.

4.2.6.3 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Soweit nicht anders angegeben, wurden PCR-Reaktionen in einem Volumen von 50 µl angesetzt. Die Konzentrationen der Primer waren 0,3 µM, der dNTPs 0,2 µM und die Taq-Polymerase wurde mit 1 U pro Ansatz eingesetzt. Alle Denaturierungsschritte bei 95°C dauerten 30 Sekunden. Fast alle PCR-Reaktionen wurden dann mit einer Annealingtemperatur von 56-60°C durchgeführt. Die Elongationszeit bei 72°C wurde mit 1000 Basen pro Minute für jedes PCR-Produkt angepasst, wobei die Elongationszeit nie unter 30 Sekunden lag.

4.2.6.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe des Big Dye Terminator Mix (Applied Biosystems) und anschließender Aufreinigung mit dem Dye Ex 2.0 Spin Kit (QIAGEN) nach der modifizierten Didesoxynukleotid-Strangabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Die Sequenzanalyse wurde wahlweise an einem ABI 3130 (Applied Biosystems) oder einem ABI 373 DNA Sequencer Stretch (Applied Biosystems) durchgeführt.

4.2.6.5 Genotypisierung der Mauslinien

4.2.6.5.1 *Pmn*-Mauslinie

Zur Genotypisierung der *pmn*-Mauslinie standen drei verschiedene Methoden zur Verfügung. Neben der Sequenzierung der durch die Punktmutation betroffenen Genregion wurde für die Mauszucht routinemäßig eine RFLP-Analyse mit der entsprechenden, amplifizierten Genregion durchgeführt. Zur schnellen Genotypisierung parallel zu einer Motoneuronpräparation wurde ein Verfahren zur SNP-Analyse (Single Nucleotide Polymorphism) an einem LightCycler[®] (Roche) entwickelt.

4.2.6.5.1.1 Sequenzierung

Für die Genotypisierung der *pmn*-Mauslinie mittels Sequenzierung wurde zunächst ein ~500 bp DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert:

Primer	„Tbce Seq s“ und „Tbce Seq as“
Annealing-Temperatur	53°C
Elongationszeit	30 sek
Anzahl der Zyklen	45

Die entsprechende Bande wurde aus einem Agarosegel eluiert und gemäß den Angaben des Herstellers für die Sequenzanalyse vorbereitet. Die Sequenzanalyse wurde wahlweise an einem ABI 3130 (Applied Biosystems) oder einem ABI 373 DNA Sequencer Stretch (Applied Biosystems) durchgeführt.

4.2.6.5.1.2 RFLP-Analyse

Die Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (RFLP) Analyse beruht auf dem Prinzip, dass durch einen Nukleotidaustausch Schnittstellen für Restriktionsenzyme wegfallen oder geschaffen werden. Nach einer PCR mit sequenzspezifischen Primern wird das PCR-Produkt mit einem Restriktionsenzym verdaut und anschließend auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anhand des Bandenmuster bzw. der Fragmentlängen können die Proben genotypisiert werden.

Für die Genotypisierung der *pmn*-Mauslinie mittels RFLP-Analyse wurde zunächst ein ~450 bp DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert:

Primer	„Tbce Restr s“ und „Tbce Restr as“
Annealing-Temperatur	53°C
Elongationszeit	1 min
Anzahl der Zyklen	45

Nach erfolgreicher Amplifikation wurde ein Teil des Reaktionsansatzes mit dem Restriktionsenzym Mnl I über Nacht bei 37°C verdaut und anschließend auf einem 2%-igem Agarosegel analysiert. Die möglichen Genotypen stellen sich als Bandenmuster wie folgt dar:

- 1) *pmn* Wildtyp 200 bp / 300 bp
- 2) *pmn* Heterozygot 100 bp / 200 bp / 300 bp
- 3) *pmn* Mutante 100 bp / 200 bp

4.2.6.5.1.3 SNP-Analyse am LightCycler®

Bei einer SNP-Analyse am LightCycler® (Roche) wird eine PCR durchgeführt, bei der zusätzlich zu den Primern sequenzspezifische fluoreszenzmarkierte Sonden eingesetzt werden, die mit den gebildeten PCR-Produkten hybridisieren. Der LightCycler® ist ein Thermocycler mit integriertem Fluorimeter (Wittwer et al., 1997b; Wittwer et al., 1997a). Im Gegensatz zur konventionellen PCR erfolgt die Reaktion in Glaskapillaren, die lichtdurchlässig sind und durch die große Oberfläche schnelle Heiz- und Abkühlgeschwindigkeiten ermöglichen und somit die Reaktionsdauer verkürzen.

Zur Genotypisierung von Proben werden zwei Hybridisierungssonden eingesetzt, die mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert sind (Anker- und Sensorsonde). Die Sensorsonde ist mit Fluoreszein am 3'-Ende (Donor-Fluorophor) markiert, die Ankersonde mit LightCyclerRed640 am 5'-Ende (Akzeptor-Fluorophor). Die Sonden binden nach Denaturierung an den komplementären Strang des sich bildenden PCR-Produkts zwischen den Primern. Wenn beide Sonden nebeneinander binden und das Fluoreszein durch einen entsprechenden Lichtimpuls angeregt wird, findet ein „Fluorescence Resonance Energy Transfer“ (FRET) vom Donor- auf das Akzeptor-Fluorophor statt (Hamprrecht, 2005; Roche, 1998): Das vom Fluoreszein emittierte Licht dient als Anregungsenergie für das LightCyclerRed640 der Ankersonde. Die Emission des Akzeptor-Fluorophors kann dann detektiert werden. Mit zunehmender Zyklenzahl wird mehr Amplifikat gebildet, mehr Sonden können binden und die Fluoreszenzintensität steigt proportional zur Menge des entstandenen PCR-Produktes. Dies ermöglicht die Quantifizierung des PCR-Produktes in Echtzeit („quantitative real time PCR“).

Im Anschluss an die PCR wird eine Schmelzkurve erstellt. Dazu wird von einem Ausgangswert von 95°C die Temperatur kontinuierlich erhöht, was zum Ablösen der Sonden bei Überschreiten ihrer Schmelztemperatur und damit zum Abbruch des Fluoreszenzsignals führt. Dieser Schmelzpunkt ist ein für jede Sonde und Reaktion charakteristischer Wert. Liegt eine Fehlpaarung von zwei Basen vor, z.B. bei einem Nukleotidaustausch durch einen Polymorphismus, löst sich die Sonde bereits bei niedrigeren Temperaturen und der Schmelzpunkt ist verschoben. Bei heterozygoten Proben liegen zwei verschiedene Allele vor und entsprechend werden zwei Schmelzpunkte gemessen. Zur einfacheren Ableitung der Schmelzpunkte wird die erste negative Ableitung der Fluoreszenz gegen die Temperatur aufgetragen (Abb. 4-1). Anhand der Schmelzwerte und des Kurvenverlaufs kann dann die Genotypisierung erfolgen (Hamprrecht, 2005).

Die SNP-Analyse am LightCycler® wurde parallel zur Präparation von embryonalen Motoneuronen durchgeführt. Hierzu wurde zunächst von jedem Embryo ein ca. 1 mm langes Schwanzbiopsat in 200 µl Wasser überführt, 5 min bei 99°C inkubiert und anschließend zentrifugiert. Von diesem Ansatz wurden 2 µl als Template für den PCR-Reaktionsansatz verwendet, der gemäß den Herstellerangaben angesetzt wurde (LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe, Roche). Dem Reaktionsansatz wurden auch die entsprechenden Primer („Tbce SNP s“ und „Tbce SNP as“) und die Hybridisierungssonden („Tbce 1570Sensor“ und „Tbce 1570Anker“) zugesetzt.

	Segment	Temp [°C]	Dauer [sek]	Slope [°C/sek]	Aufnahmemodus
Denaturierung	1	95	30	20	
Amplifikation (40 Zyklen)	1	95	10	20	single
	2	62	10	20	
	3	72	10	20	
Schmelzkurve	1	95	10	20	continuous
	2	40	30	20	
	3	85	0	0,1	
Abkühlen	1	40	0	20	

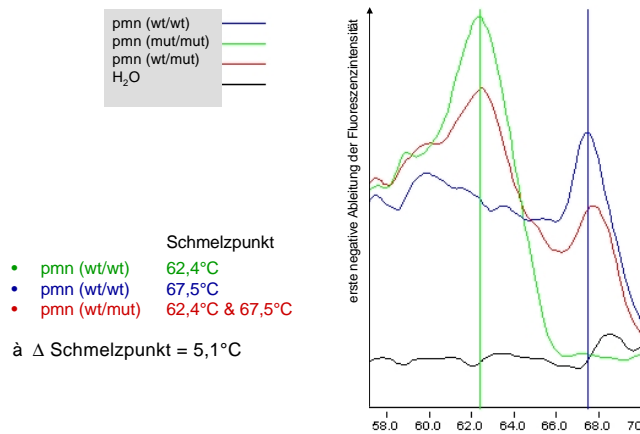


Abb. 4-1: Schmelzpunkte bei der SNP-Analyse der *pmn*-Mauslinie

4.2.6.5.2 STAT3 Mauslinien (STAT3^{flox/flox} und STAT3^{wt/ko})

Die Genotypisierung der STAT3-Mauslinien wurde mittels PCR durchgeführt:

STAT3^{wt/ko}: Nachweis der Wildtypbande

Primer	„STAT3 a ko“ und „STAT3 b ko“
Annealing-Temperatur	56°C
Elongationszeit	60 sek
Anzahl der Zyklen	40
Fragmentgröße	1 kb

STAT3^{wt/ko}: Nachweis der ko Bande

Primer	„STAT3 a ko“ und „STAT3 c ko“
Annealing-Temperatur	56°C
Elongationszeit	60 sek
Anzahl der Zyklen	40
Fragmentgröße	1 kb

STAT3^{flox/flox}

Primer	„STAT3 flox s“ und „STAT3 flox as“
Annealing-Temperatur	56°C
Elongationszeit	60 sek
Anzahl der Zyklen	40
Fragmentgrößen	STAT3 ^{wt/wt} 250 bp STAT3 ^{flox/wt} 250 + 400 bp STAT3 ^{flox/flox} 400 bp

4.2.6.5.3 NFL-Cre Mauslinie

Mittels PCR wird die Kombination aus dem humanen Neurofilament L Promotor mit der Cre Rekombinase cDNA detektiert.

Primer	„NFL-SEQ“ und „pMC-Cre“
Annealing-Temperatur	59°C
Elongationszeit	60 sek
Anzahl der Zyklen	34
Fragmentgröße	250 bp

4.2.7 Proteinbiochemische Methoden**4.2.7.1 Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Durchführung der SDS-PAGE, sowie die Zusammensetzungen der benötigten Puffer und Lösungen wurden aus Veröffentlichungen entnommen (Bollag D.M. et al., 1996; Funk, 2003). Verwendet wurden 10, 12,5 und 20%-ige Polyacrylamidgele. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen auf das Gel 2 Minuten bei 99°C denaturiert.

Nach der Gelelektrophorese wurden die Proteinbanden der Gele mit Coomassie Blue angefärbt (Bollag D.M. et al., 1996).

4.2.7.2 Western Blot

Nach der elektrophoretischen Auftrennung mittels SDS-PAGE wurden die Proteine mit Hilfe einer Apparatur von PEQLAB nach dem Semi-Dry-Blotting Verfahren (Kyhse-Anderson, 1984) auf eine Nitrozellulose Transfermembran (45 µm, Schleicher & Schuell) überführt. Nach dem Blotten wurde mit 5% Milchpulver alle freien Proteinbindestellen der Membran abgesättigt. Der Nachweis einzelner Proteinbanden auf der Membran erfolgte durch Immundetektion mittels Antikörpern in TBST und anschließendem Nachweis mit „ECL Western Blotting Detection Reagent“ (Amersham).

4.2.7.3 Immunfluoreszenzmikroskopie

Die zur Immunfluoreszenz eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper sind mit ihren eingesetzten Konzentrationen oben aufgeführt (4.1.12).

4.2.7.3.1 Antigendetektion mittels Immunfluoreszenz

Für Immunfluoreszenz-Analysen wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert und nach Fixation mit PFA (37°C vortemperiert, 10-15 min) mehrmals mit PBS gewaschen. In der Regel wurden die Zellkerne anschließend mit 1 µg/ml DAPI (4-6-Diamidino-2-phenylindol-di-hydrochlorid), einem in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff, angefärbt. Um unspezifische Bindungen der Antikörper zu verhindern, wurden die Zellen für 2 h bei RT mit einer Blockierlösung inkubiert. Diese PBS-Lösung enthielt 0,3% Triton X100 zum Permeabilisieren der Zellen und 5% BSA. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern entweder über Nacht bei 4°C oder 2 h bei RT. Vor der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurden die Zellen mehrmals mit PBS gewaschen und dann für 2 h mit dem Sekundärantikörper bei RT inkubiert. Bei Doppelmarkierungen wurden sowohl die Primär- als auch Sekundärantikörper jeweils gleichzeitig auf die Zellen gegeben.

Nach wiederholtem Waschen mit PBS und zuletzt H₂O wurden die Deckgläschen mit einem Tropfen Moviol auf einem Objektträger eingebettet.

4.2.7.3.2 Mikroskopische Auswertung

Die mikroskopische Auswertung und Dokumentation erfolgte an einem DM RE-7 SDK (Leica) in Verbindung mit einer Konfokalen Laserscanning Einheit TCS SP2 (Leica). Mit Hilfe der Leica Confocal Software 2.61 konnten auch Längenmessungen neuronaler Fortsätze und Fluoreszenzintensitätsmessungen durchgeführt werden.

4.2.8 Lebendzellbeobachtungen

Für die Untersuchungen des axonalen Transports und des mitochondrialen Redoxpotentials wurden die Motoneurone auf Poly-D,L-Ornithin und Lamininbeschichteten Deckgläschen (3,2 cm Durchmesser) kultiviert und nach 5-7 Tagen mit mitochondrienspezifischen Farbstoffen behandelt:

Rhodamin 123 (Invitrogen)

Anregungsenergie: 496 nm

Emissionsmaximum: 530 nm

Inkubation der Zellen für 10 Minuten bei 37°C mit 0,2 µg/ml Rhodamin 123. Anschließend mehrmaliges Waschen der Zellen mit 37°C warmem L15-Leibowitz Medium.

Rhodamin 123 ermöglicht die Analyse des axonalen Transports und dient als ekliptischer Indikator für das mitochondriale Potential.

JC-1 (Invitrogen)

Anregungsenergie: 496 nm bzw. 594 nm

Emissionsmaximum: 529 nm bzw. 590 nm

Inkubation der Zellen für 5-20 Minuten bei 37°C mit 0,075-2 µg/ml JC-1. Anschließend mehrmaliges Waschen der Zellen mit 37°C warmem L15-Leibowitz Medium.

JC-1 akkumuliert potentialabhängig in Mitochondrien was durch eine ratiometrische Fluoreszenz-emissionsänderung angezeigt wird. JC-1 eignet sich jedoch nicht für die Untersuchung des axonalen Transports.

MitoTracker Green (Invitrogen)

Anregungsenergie: 488 nm

Emissionsmaximum: 516 nm

Inkubation der Zellen für 10 Minuten bei 37°C mit 25 nM MitoTracker Green. Anschließend mehrmaliges Waschen der Zellen mit 37°C warmem L15-Leibowitz Medium.

MitoTracker Green ist ein mitochondrien-selektiven Farbstoff, der in aktiven Mitochondrien membranunabhängig konzentriert wird und sich auch für die Analyse des mikrotubuliabhängigen Transports von Mitochondrien eignet.

MitoFluor Red594 (Invitrogen)

Anregungsenergie: 594 nm

Emissionsmaximum: 630 nm

Inkubation der Zellen für 10 Minuten bei 37°C mit 100 nM MitoFluor Red594. Anschließend mehrmaliges Waschen der Zellen mit 37°C warmem L15-Leibowitz Medium.

MitoFluor Red 594 ist ein Membranpotential-sensitiver ekliptischer Indikator, der sich auch für Untersuchungen des axonalen Transport eignet.

Für die alle Farbstoffe wurden jeweils vor dem Experiment frische Vorverdünnungen in L15-Leibowitz Medium hergestellt.

Die anschließende Lebendzellbeobachtungen wurde am Konfokalen Laserscanning Mikroskop TCS SP2 (Leica) durchgeführt, wobei eine POC-Kammer für Zellkultivierungen (Helmut Saur Laborbedarf) verwendet wurde. Diese ermöglichte eine Temperierung der Zellen auf 37°C. Da die Zellen nicht mit CO₂ begast werden konnten, wurde L15-Leibowitz Medium verwendet, das ohne einen Natrium-Bikarbonatpuffer einen physiologischen pH-Wert einstellt.

Für die Untersuchung des axonalen Transports der Mitochondrien wurden Zeitrafferaufnahmen erstellt. Dabei wurden in einem Zeitintervall von 2 Sekunden Bilder der Axone und ihrer Mitochondrien aufgenommen. Die Analyse der Aufnahmen erfolgte mittels der frei zugänglichen Software ImageJ (NIH) und entsprechender PlugIns: PlugIn Manual Tracking wurde verwendet, um die maximalen Transportgeschwindigkeiten der Mitochondrien zu messen. Die Kymographen wurden dem PlugIn Multiple Kymographs erstellt. Für die Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde das PlugIn Grid verwendet.

4.2.9 Elektronenmikroskopie

Für elektronenmikroskopische Analysen wurden die sieben Tage kultivierten Motoneurone in den Zellkulturschalen mit 2% Glutaraldehyd in 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,8 für 5 Minuten bei 37°C fixiert, anschließend nach einem Wechsel des Fixans für weitere 5 Minuten bei RT. Die fixierten Zellen wurden dann mit 1% OsO₄ in 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,8 behandelt. Nach Behandlung mit einer aufsteigenden Alkoholreihe zur Entwässerung wurden die Zellen in Epon Harz eingebettet. Das auspolymerisierte Epon wurde aus den Schälchen herausgeholt und die Zellen anschließend mit Methyleneblau gefärbt. Unter dem Mikroskop konnten so einzelne Motoneurone, bei denen die Axone sich nicht mit Fortsätzen anderer Zellen überschneiden, herausgesucht und zur Dokumentation fotografiert werden. Diese Zellen wurden dann ausgeschnitten und der kleine Epon-Harzblock auf einen Leerblock aufgeklebt. Sodann wurden Ultradünnschnitte (ca. 80 nm) angefertigt, auf Formvarbeschichtete Nickel-Netzchen aufgezogen, mit Uranylacetat und Bleicitrat kontrastiert (REYNOLDS, 1963), und mit einem LEO 912 AB Transmissionselektronenmikroskop (Zeiss SMT, Oberkochen) analysiert. Die quantitative Analyse wurde mit der Software ImageJ (NIH) durchgeführt..

4.2.10 Statistik

Alle statistischen Berechnungen wurden mit der GraphPadPrism Software durchgeführt.

4.2.10.1 Student's t-Test

Dieser Test wurde zur Bestimmung der Signifikanz von parametrischen Daten verwendet, wenn nur zwei Gruppen verglichen wurden (z.B. Länge der Axonen wt vs. *pmn*-mutierter Motoneurone). Die Nullhypothese wurde auf der 5%-Basis verworfen.

4.2.10.2 ANOVA

Wenn mehrere Gruppen verglichen werden sollten, wurde eine einfache Analyse der Varianz (Einweg-ANOVA) durchgeführt. Einzelne Gruppen wurden mit Bonferronis post-hoc Test miteinander verglichen. Die Nullhypothese wurde auf der 5%-Basis verworfen.

5 Ergebnisse

5.1 Einfluss der Mutation in *pmn* / *Tbce* auf die Funktion von TBCE

5.1.1 Zielsetzung und Zusammenfassung

Die *pmn*-Mausmutante ist eine spontan entstandene Mausmutante, bei der es ab der 3. postnatalen Woche zu einer progredienten Motoneuronerkrankung kommt, die innerhalb von 2 bis 3 Wochen zum Tod der Tiere durch Denervation der Atemmuskulatur führt. Der zu Grunde liegende Gendefekt bei der *pmn*-Mausmutante geht auf einen einzelnen Nukleotidaustausch (T à G Transition) an Position 1682 der *Tbce* cDNA auf dem Maus-Chromosom 13 zurück. Die Punktmutation ist für einen Tryptophan zu Glyzin (W à G) Austausch an Position 524 des *tbce*-Genproduktes, des Cofaktor E-Proteins aus dem Tubulin-spezifischen Chaperon-Komplex verantwortlich (Bommel et al., 2002; Martin et al., 2002). Bislang war unklar, welchen Einfluss die Mutation im *tbce* Gen bzw. TBCE Protein auf die Funktion des Proteins ausübt. Eine mögliche Hypothese ist, dass die Stabilität des Proteins durch die Mutation beeinflusst wird. Eine Überexpression von wildtypischem und mutiertem TBCE in COS-7 Zellen zeigt, dass der Anteil an mutiertem TBCE 24h und 48h Stunden nach der Transfektion deutlich geringer ist, als der Anteil von wildtypischem TBCE (Martin et al., 2002).

Ein Ziel dieser Arbeit war es, das endogene TBCE mittels eines spezifischen Antiserums nachzuweisen, um so Aussagen über Stabilität und Lokalisation treffen zu können. Wenn das mutierte TBCE weniger stabil ist, sollte es auch in geringerer Menge im Rückenmark von *pmn*-Mäusen vorliegen. Eine Überexpression in Motoneuronen von *pmn*-Mäusen sollte die beschriebene axonale Pathologie retten.

Mit dem generierten Antiserum #9.2A gegen den N-Terminus des TBCE lässt sich das endogene TBCE im Western Blot und mittels Immunfluoreszenz nachweisen. Im Rückenmark der *pmn*-Maus liegt TBCE in deutlich geringerer Menge vor, was die Hypothese der gestörten Stabilität des Proteins belegt. Eine Überexpression von wildtypischem, aber auch mutiertem TBCE in Motoneuronen von *pmn*-Mäusen kompensiert das reduzierte Längenwachstum bei *pmn*-mutierten Motoneuronen.

5.1.2 Charakterisierung eines Antiserums gegen TBCE

Um den Einfluss der Mutation im TBCE Protein auf die Funktion des Proteins zu untersuchen, wurden zunächst Antiseren gegen das TBCE Protein hergestellt. Hierzu wurde ein Kaninchen mit Peptiden des TBCE-Proteins immunisiert und später das Antiserum isoliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich mit dem Antiserum #9.2A gearbeitet, das sich in den Vorversuchen von Herrn Ali Murat Kaya als spezifisch erwiesen hatte (Kaya, 2004). Das Antiserum #9.2A wurde durch Immunisierung mit einem N-terminalen Peptid des TBCE-Proteins hergestellt.

Die Proteinlysate von transfizierten und nicht-transfizierten 293T Zellen wurden mittels SDS-PAGE und anschließendem Western Blot analysiert. Der Western Blot (Abb. 5-1, A) zeigt in den mit einem leeren Plasmid transfizierten 293T Zellen (Mock) eine starke Bande bei ~60 kD, die der endogenen TBCE-Proteinexpression entspricht. Um die Spezifität des Antiserums zu überprüfen, wurde HA-

markiertes TBCE in HEK 293T Zellen überexprimiert, was zu einer zusätzlichen Bande bei ~63 kD führt. Das präabsorbierte Antiserum zeigt keinerlei Immunreaktivität.

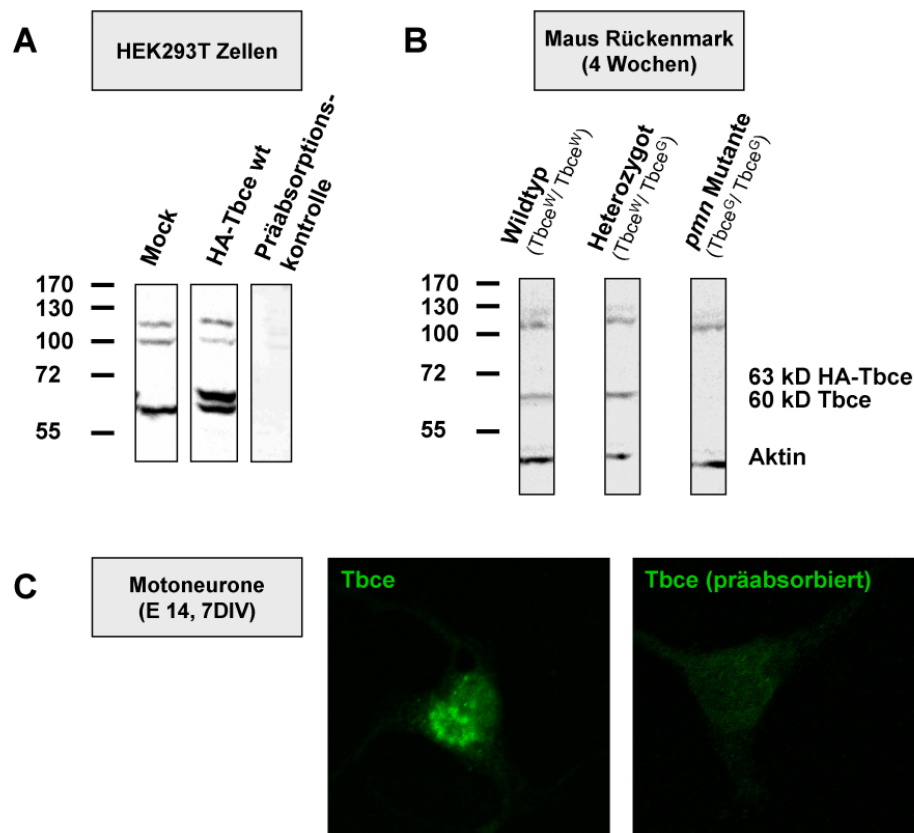


Abb. 5-1: Nachweis der TBCE-Proteinexpression mittels eines im Kaninchen generierten Antiserums gegen den N-Terminus des TBCE Proteins

(A) Überexpression von HA-markiertem wildtypischem TBCE in HEK 293T Zellen; (B) Nachweis der endogenen TBCE-Proteinexpression in Rückenmark von 4 Wochen alten Mäusen; (C) Immunzytochemischer Nachweis der TBCE-Proteinexpression in kultivierten Motoneuronen.

Neben der Detektion von TBCE im Western Blot wurde das Antiserum auch für den Nachweis von endogenem TBCE in fixierten Zellen getestet. Hierzu wurden kultivierte Motoneurone mit PFA fixiert und anschließend eine Immunfluoreszenz durchgeführt. Hierbei bindet das im Kaninchen generierte Antiserum gegen TBCE an die TBCE Proteine in der Zelle. Diese Bindung wird anschließend mittels eines fluoreszenzmarkierten Antikörpers gegen Kaninchen Antikörper detektiert. Die Abb. 5-1 C zeigt eine deutliche Immunreaktivität im Soma der Motoneurone, welche in der Präabsorptionskontrolle nicht vorhanden ist.

5.1.3 Stabilität des TBCE Proteins im Rückenmark von *pmn*-Mäusen

Martin et al. haben 2002 die Hypothese aufgestellt, dass das *pmn*-mutierte TBCE eine geringere Proteinestabilität aufweist, was in der Folge zu einer Motoneurondegeneration führt. Die Hypothese wurde gestützt durch Experimente, bei denen wildtypisches und mutiertes TBCE in COS-7 Zellen

überexprimiert wurde. Das Protein wurde mittels einer FLAG-Markierung im Western Blot nachgewiesen. Im Gegensatz zu wildtypischem TBCE nimmt der Anteil an mutiertem TBCE in einem Zeitverlauf von bis zu 48h deutlich ab (Martin et al., 2002).

Mit dem im Kaninchen generierten Antiserum gegen TBCE ist es erstmals möglich, die Hypothese der geringeren Proteinstabilität an den endogenen TBCE Expressionsspiegeln zu überprüfen.

Endogenes TBCE Protein lässt sich in Rückenmarklysaten von 4 Wochen alten wildtypischen und heterozygoten *pmn*-Mäusen nachweisen (Abb. 5-1, B). Im Rückenmark von homozygot mutierten *pmn*-Mäusen fehlt zu diesem Zeitpunkt die 60 kD Bande im Western Blot.

5.1.4 Überexpression von wildtypischem und mutiertem TBCE rettet die axonalen Pathologien

Werden embryonale Motoneurone von *pmn*-Mäusen in Gegenwart von BDNF kultiviert, zeigen diese im Vergleich zu Motoneuronen von wildtypischen Mäusen deutliche pathologische Veränderungen (Bommel et al., 2002): Während die Dendriten normal auswachsen, sind die Axone nach sieben Tagen in Kultur deutlich verkürzt und bilden „axonale Schwellungen“ (Abb. 5-10) aus. Diese sind gekennzeichnet durch eine zwei- bis dreifache Anschwellung des Axondurchmessers (Bommel et al., 2002).

Um den Einfluss von wildtypischem und *pmn*-mutiertem TBCE auf die Morphologie kultivierter Motoneurone zu überprüfen, wurden die beiden Proteine jeweils in den Motoneuronen überexprimiert. Motoneurone lassen sich jedoch nur sehr schlecht mit konventionellen Methoden, wie beispielsweise Kalziumphosphat oder Elektroporation transfizieren. Eine direkte Injektion der cDNA hat einen negativen Einfluss auf das Überleben der Motoneurone.

Für einen Gentransfer in Motoneurone wurde ein lentivirales System zum Gentransfer (Jarmy et al., 2001) modifiziert und hinsichtlich der Infektionsrate und dem Einfluss auf Überleben und Morphologie von Motoneuronen untersucht. Hierzu wurden nicht-replikative Lentiviren in Helferzellen (HEK 293T) durch Transfektion von zwei Plasmiden (pGJ3 und pCZVSV-G) hergestellt. Die lentiviralen Infektionsraten der Motoneurone liegen bei über 50%, während das Überleben und die Morphologie durch die Infektionen nicht beeinflusst werden. Die Ergebnisse dieser Infektionsstudien wurden 2006 in einem Methodenartikel publiziert (Bender et al., 2006).

Für die Infektion von Motoneuronen aus Wildtyp- und *pmn*-Mäusen wurden Lentiviren mit folgenden Plasmiden hergestellt: pGJ3(SFFVp)HA-Tbce wt für die Überexpression von wildtypischem Tbce und pGJ3(SFFVp)HA-Tbce *pmn* für die mutierte Form des Tbce. Beide Gene stehen unter der Kontrolle des SFFV Promotors. Die Ergebnisse der Überexpression sind in Abb. 5-2 dargestellt.

Die rekombinanten TBCE Proteine wurden mittels Immunfluoreszenz-Detektion des HA-Tags nachgewiesen (Abb. 5-2, A) und anschließend die Axone und Dendriten ausgemessen. Die Dendritenlängen weisen keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp und *pmn*-Mäusen auf. Auch die Überexpression von TBCE Protein hat keinen Einfluss auf das

Dendritenwachstum (Abb. 5-2, B). Die Axone von *pmn*-mutierten Motoneuronen zeigen dagegen eine deutliche Längenreduktion. Diese Axonpathologie lässt sich durch eine Überexpression von wildtypischem TBCE Protein vollständig normalisieren (Abb. 5-2, C). Die Überexpression des mutierten TBCE Proteins beeinflusst das Axonwachstum ebenfalls positiv, wenn auch nicht in der gleichen Ausprägung wie das wildtypische TBCE.

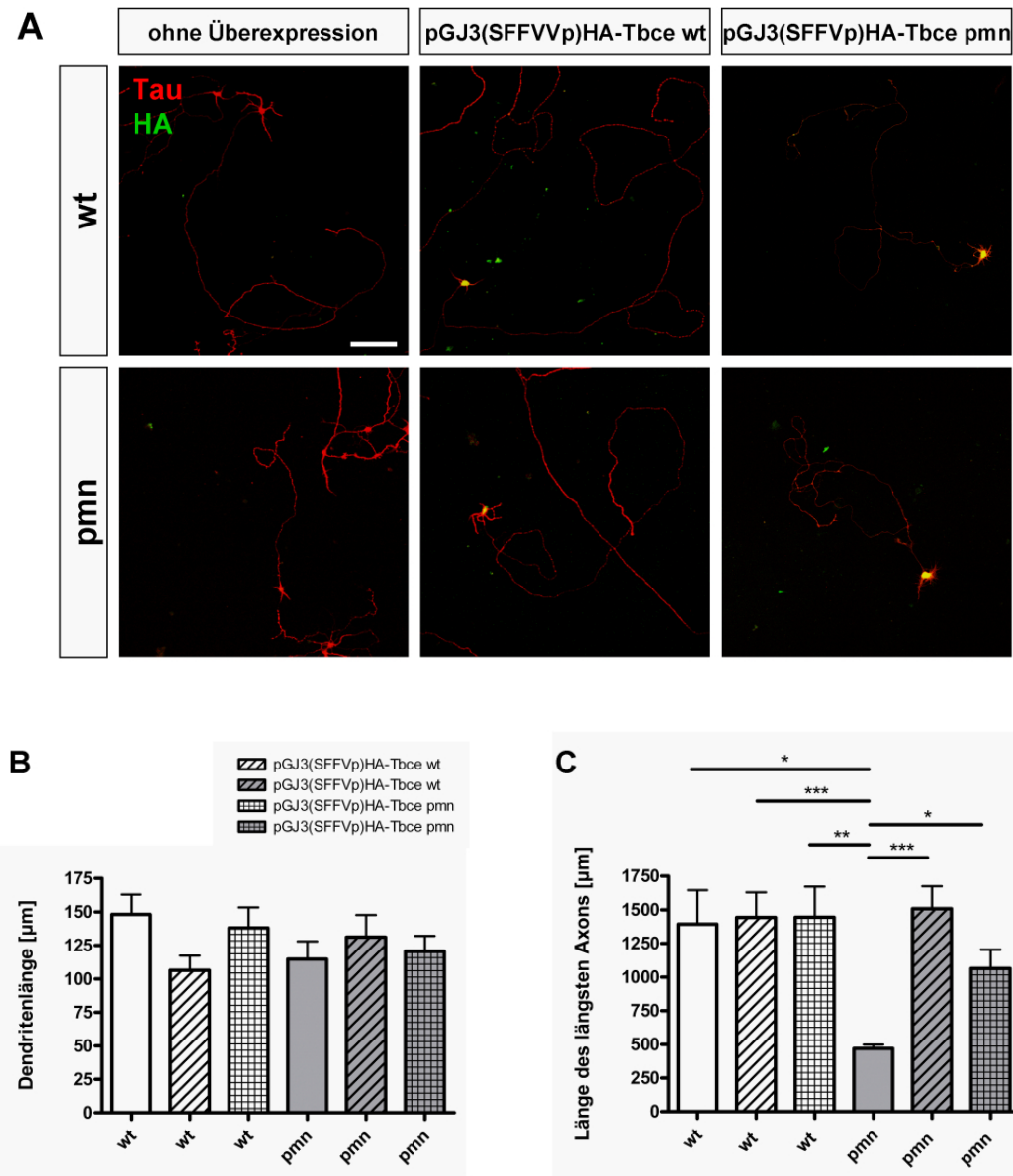


Abb. 5-2: Überexpression von TBCE in kultivierten Motoneuronen

(A) Embryonale Motoneurone (E 13) von wildtypischen bzw. *pmn*-mutierten Mäusen, 7 Tage kultiviert in Gegenwart von 1 ng/ml BDNF. Überexpression von HA-markiertem TBCE in der wildtypischen (pGJ3(SFFVp)HA-TBCE wt) bzw. *pmn*-mutierten Form (pGJ3(SFFVp)HA-TBCE *pmn*) durch lentivirale Infektion. Nach Fixation mit PFA Detektion von Tau (Cy3, rot) und HA (Cy2, grün) mittels Immunfluoreszenz. Nach 7 Tagen in Kultur wurden die Dendritenlängen (B) bzw. die Längen des längsten Axons (C) ausgemessen und statistisch ausgewertet. Die Balken zeigen die Mittelwerte \pm SEM; nicht signifikant $p > 0,05$; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

5.2 Subzelluläre Verteilung von TBCE in kultivierten Motoneuronen

5.2.1 Zielsetzung und Zusammenfassung

Die zelluläre Lokalisation des TBCE Proteins war bislang nicht bekannt. Auf Grund seiner postulierten Rolle bei der Assemblierung von Mikrotubuli wurde angenommen, dass TBCE an den Orten in der Zelle lokalisiert ist, an denen der Aufbau der Mikrotubuli stattfindet. Neben der Stabilität des TBCE Proteins könnte durch die Mutation auch die zelluläre Verteilung des Proteins beeinflusst werden.

Mit dem generierten Antiserum gegen TBCE kann die subzelluläre Verteilung von TBCE in Wildtyp Motoneuronen untersucht und mit der Lokalisation in Motoneuronen von *pnn*-Mäusen verglichen werden.

Die Immunfluoreszenz-Analysen zeigen neben einer schwachen, körnigen TBCE Immunreaktivität im Soma und den neuronalen Fortsätzen auch eine starke TBCE Immunreaktivität neben dem Zellkern. Durch Doppelfärbungen konnte gezeigt werden, dass es sich bei dieser Struktur um den Golgi-Apparat handelt. Die Centrosomen, die eine wichtige Rolle bei der Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts spielen, weisen ebenfalls eine starke TBCE-Immunreaktivität auf.

Hinsichtlich der subzellulären Verteilung von TBCE gibt es keine Unterschiede in Motoneuronen von Wildtyp vs. *pnn*-Mutanten.

5.2.2 TBCE-Immunfluoreszenz

Um die Lokalisation von endogenem TBCE in Motoneuronen zu untersuchen wurde das TBCE Protein in sieben Tage kultivierten Motoneuronen (E14) mit dem Antiserum (#9.2A) gegen TBCE mittels Immunfluoreszenz detektiert (Abb. 5-3 / Abb. 5-4, grün). Zusätzlich wurde in den Motoneuronen β III-Tubulin (rot) mit einem monoklonalen Antikörper angefärbt. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) eingefärbt. Die Abbildungen Abb. 5-3 Abb. 5-4 A, B und C geben einen Überblick über die gesamte Zelle mit ihren Fortsätzen. In den Abbildungen D, E und F ist jeweils das Soma der Motoneurone vergrößert dargestellt. Weitere Beispiele für die TBCE-immunreaktiven Strukturen im Zellsoma sind in den Abbildungen G, H und I gezeigt. Die Abbildungen J, K und L zeigen beispielhaft verschiedene Wachstumskegel, bzw. Abb. 5-4 L eine axonale Verzweigungsstelle.

In der gesamten Zelle zeigt sich eine schwache TBCE-Immunreaktivität, die sich als feine Körner im Zytoplasma, dem Axon, den Dendriten und in den Wachstumskegeln darstellt. Neben dem Zellkern befindet sich eine stark angefärbte TBCE-immunreaktive zytoplasmatische Struktur.

Die Färbungen geben keinen Hinweis darauf, dass das TBCE Protein in Motoneuronen von *pnn*-Mäusen (Abb. 5-3) subzellulär anders verteilt ist, als in Motoneuronen von Kontrolltieren (Abb. 5-4).

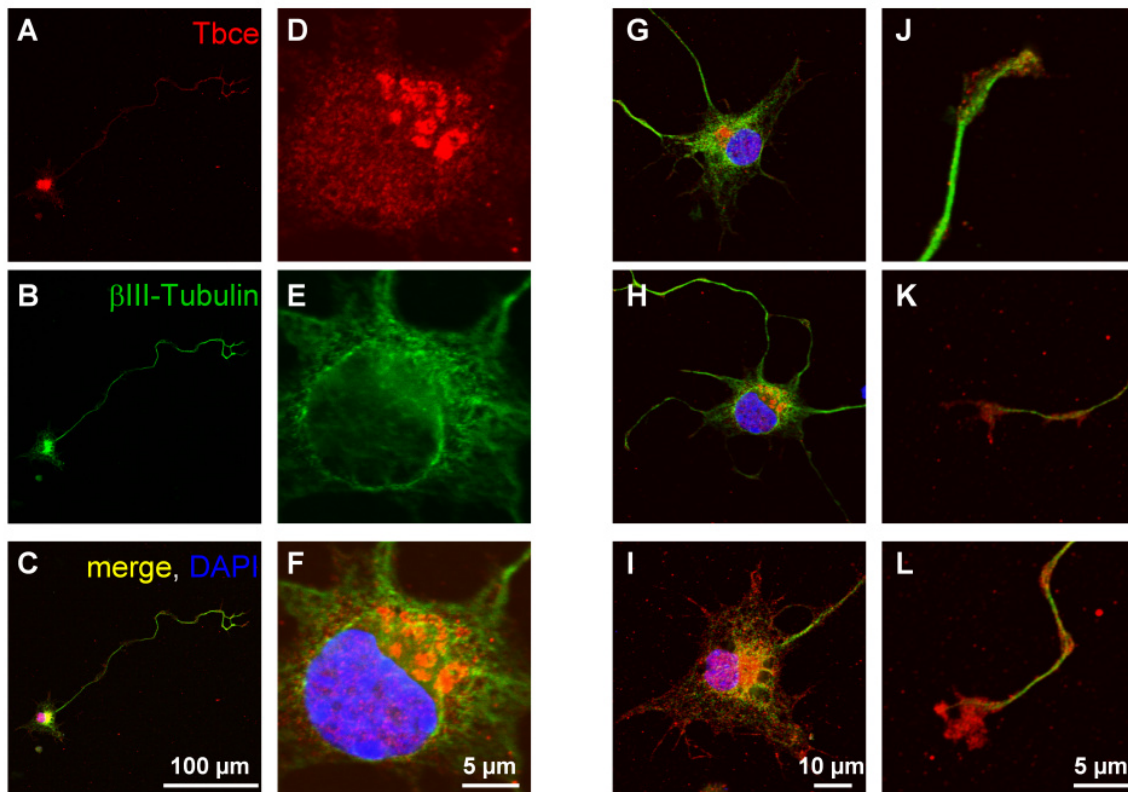


Abb. 5-3: Nachweis von TBCE in wildtypischen Motoneuronen mittels Immunfluoreszenz

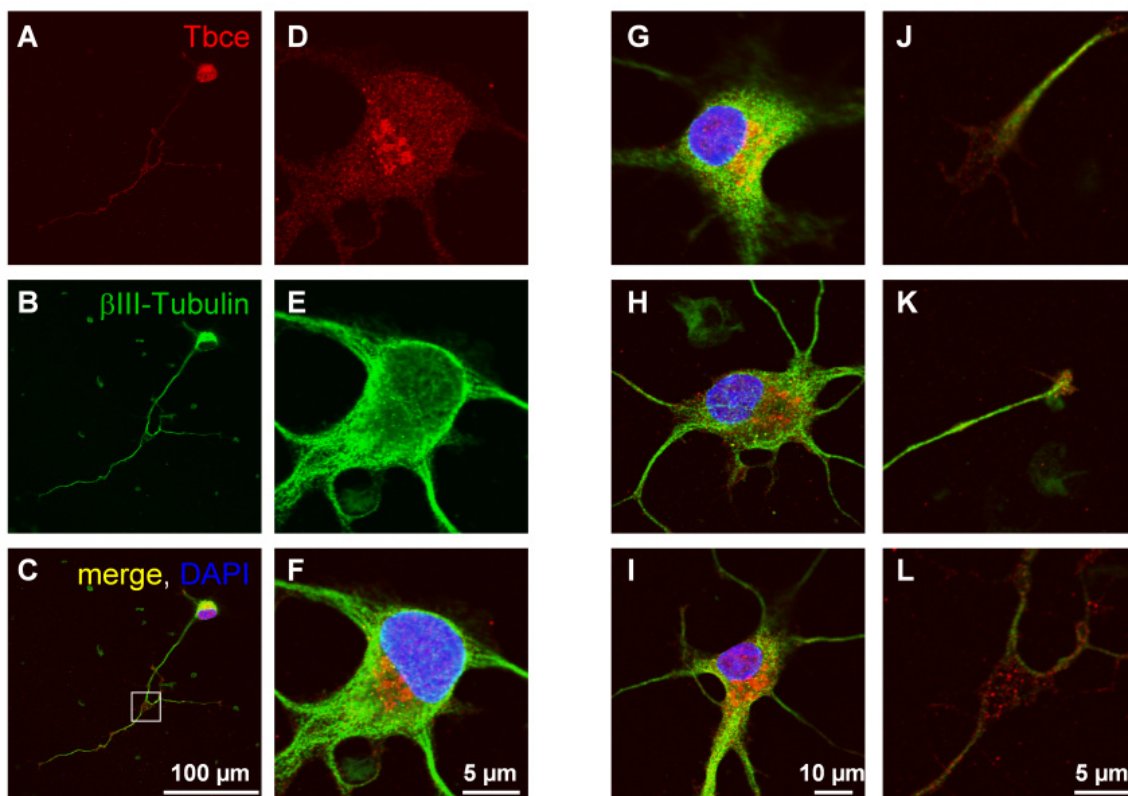


Abb. 5-4: Nachweis von TBCE in *pmn*-mutierten Motoneuronen mittels Immunfluoreszenz

Immunfluoreszenz-Nachweis von TBCE in wildtypischen (Abb. 5-1) und *pmn*-mutierten (Abb. 5-2) Motoneuronen (E 13, 7 DIV) mit dem Antiserum #9.2A gegen TBCE (Cy3, rot) und Comarkierung von β III-Tubulin (Cy3, rot). Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt. Die Abbildungen A-C zeigen jeweils ein isoliertes Motoneuron in der Übersicht, in D-I sind jeweils Zellkörper der Motoneurone vergrößert dargestellt. Abb. 5-1 J-L und Abb. 5-2 J und K zeigen beispielhaft die Wachstumskegel, Abb. 5-2 L eine Verzweigungsstelle.

5.2.3 TBCE Immunreaktivität im Golgi-Apparat

Der Golgi-Apparat, benannt nach dem italienischen Pathologen Camillo Golgi (1844-1926) umfasst die Gesamtheit aller Dictyosomen einer Zelle. Dictyosomen erfüllen vielfältige Aufgaben der Umwandlung, Sortierung, Lagerung und Konzentration von Stoffen. Der Golgi-Apparat steht in direktem Kontakt zu den Mikrotubuli, an denen Vesikel vom Golgi-Apparat in die Zelle, bzw. Vesikel zum Golgi-Apparat transportiert werden. Der Golgi-Komplex wird zudem als Mikrotubuliorganisierende Organelle angesehen (Chabin-Brion et al., 2001).

Der Nachweis des Golgi-Matrix-Proteins 130 (GM130) in kultivierten Motoneuronen mittels Immunfluoreszenz zeigt eine sehr starke Überlappung der Immunreaktivität für GM130 mit TBCE (Abb. 5-5).

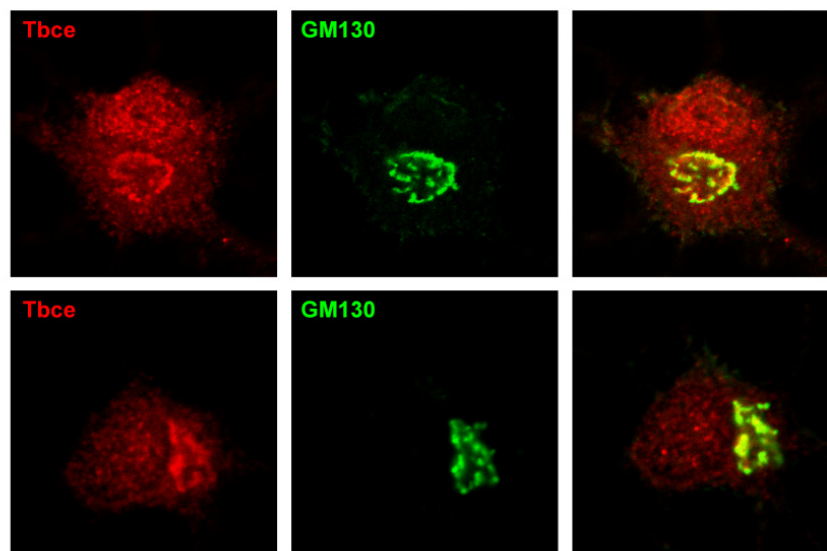


Abb. 5-5: Co-Immunfluoreszenz für TBCE und GM130

Nachweis von TBCE (Cy3, rot) und Golgi-Matrix-Protein 130 (GM130, Cy2, grün) im Zellkörper von kultivierten Motoneuronen (E 13, 7 DIV) mittels Immunfluoreszenz.

Bei anderen neurodegenerativen Erkrankungen wurde eine Fragmentierung des Golgi-Apparates beschrieben (Gonatas et al., 2006b). Auch beim Kenny-Caffey Syndrom, das durch eine Deletion im *Tbce* Gen hervorgerufen wird, werden Störungen im Golgi-Apparat beobachtet (Chabin-Brion et al., 2001; Parvari et al., 2002).

Die Untersuchung des Golgi-Apparates in Motoneuronen von *pmn*-Mäusen zeigt jedoch, dass bei der *pmn*-Erkrankung keine Unterschiede in der Morphologie des Golgi-Apparates im Vergleich zu Kontrolltieren bestehen (Abb. 5-6), zumindest soweit dies auf lichtmikroskopischer Ebene beurteilbar ist.

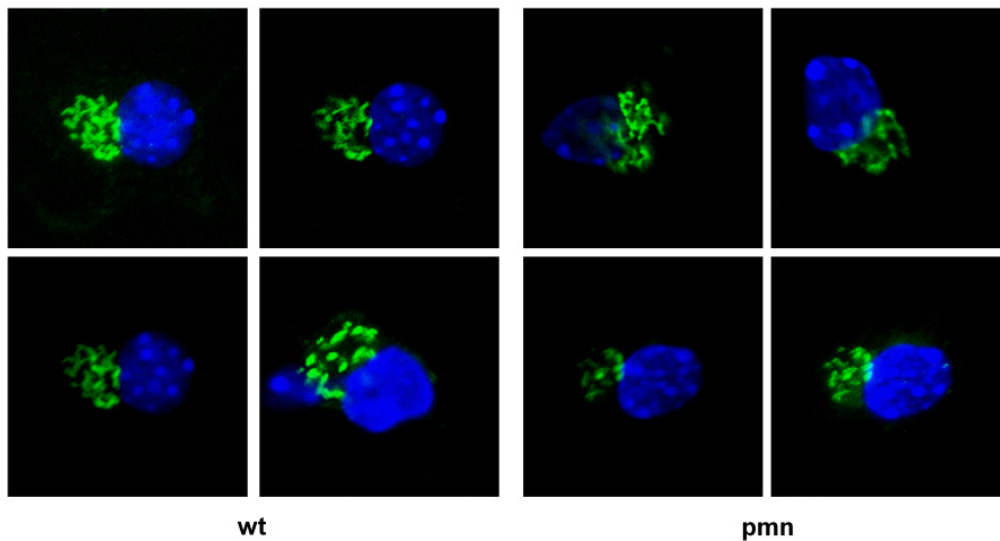


Abb. 5-6: Vergleich des Golgi-Apparates in Motoneuronen von Wildtyp und *pmn*-Mäusen

Nachweis des Golgi-Matrix-Proteins 130 (GM130, Cy2, grün) im Zellkörper kultivierter Motoneurone (E 13, 7 DIV) von *pmn*-Mäusen (*pmn*) und Wildtypmäusen (wt) mittels Immunfluoreszenz. Die Zellkerne wurden mit DAPI (blau) angefärbt.

5.2.4 TBCE Immunreaktivität in Centrosomen

Das Centrosom wurde 1888 von Theodor Boveri entdeckt und wurde als 'spezielles Organ zur Zellteilung' beschrieben. Es handelt sich um eine zelluläre Struktur, die eine wichtige Rolle bei der Organisation des Mikrotubuli-Zytoskeletts spielt und wird daher auch als MTOC (microtubule organizing center) bezeichnet.

Es kann daher vermutet werden, dass TBCE, als ein an der Assemblierung der Mikrotubuli beteiligtes Chaperon, vermehrt in der Nähe der Centrosomen lokalisiert ist. Um dies zu überprüfen wurden die Centrosomen mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen γ -Tubulin (TU30) sichtbar gemacht. Eine Doppelfärbung mit dem Antiserum gegen TBCE zeigt, dass innerhalb der Centrosomen eine starke TBCE-Immunreaktivität vorliegt.

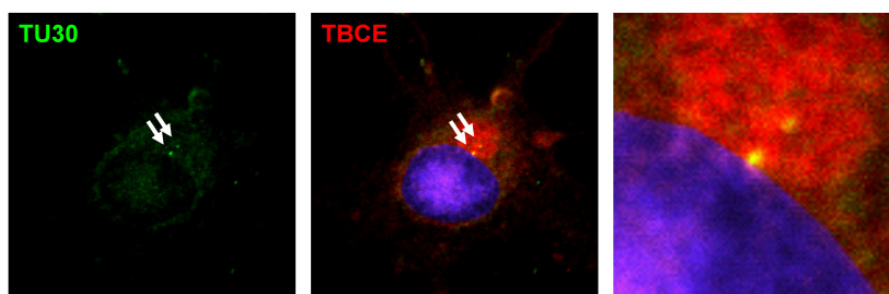


Abb. 5-7: TBCE Immunreaktivität im Centrosom

Nachweis der Centrosomen mit einem γ -Tubulin-spezifischen Antikörper (TU30, Cy2, grün) und von TBCE (Cy3, rot) in isolierten Motoneuronen (E13, 7 DIV) mittels Immunfluoreszenz. Der Zellkern wurde mit DAPI (blau) angefärbt.

5.3 Elektronenmikroskopische Analyse kultivierter Motoneurone

5.3.1 Zielsetzung und Zusammenfassung

Das Tubulin-spezifische Chaperon E spielt bei der Assemblierung der Mikrotubuli eine essentielle Rolle. Wenn die Stabilität oder Funktion des TBCE Proteins beeinträchtigt ist, könnte sich dies auf den Aufbau der einzelnen Mikrotubuli und des Mikrotubuli-Zytoskeletts auswirken. Um einzelne Mikrotubuli und eventuelle Veränderungen am Mikrotubuli-Zytoskelett in Motoneuronen zu untersuchen, wurden sieben Tage kultivierte Motoneurone (E14) elektronenmikroskopisch untersucht. Die elektronenmikroskopische Analyse von Axonen ergab eine Veränderung der Anzahl einzelner Mikrotubuli im proximalen Axonabschnitt bei Motoneuronen aus *pmn*-Mäusen. Parallel hierzu ist die Anzahl axonaler Intermediärfilamente deutlich erhöht. Der Axondurchmesser ist bei Motoneuronen aus *pmn*-Mäusen unverändert.

5.3.2 Veränderungen am Zytoskelett in Motoneuronen von *pmn*-Mäusen

Die sieben Tage kultivierten Motoneurone aus *pmn*-Mäusen und Kontrolltieren wurden mit 2% Glutaraldehyd in 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,8 fixiert und für elektronenmikroskopische Analysen aufbereitet. Hierzu wurden die in Zellkulturschalen fixierten Zellen zunächst mit 1% OsO₄ in 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,8 behandelt. Nach einer Entwässerung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe wurden die Zellen in Epon Harz eingebettet. Das auspolymerisierte Epon wurde aus den Schälchen herausgeholt und die Zellen anschließend mit Methylenblau gefärbt. Unter dem Mikroskop konnten so einzelne Motoneurone, bei denen die Axone sich nicht mit Fortsätzen anderer Zellen überschneiden, herausgesucht und zur Dokumentation fotografiert werden. Diese Zellen wurden dann ausgeschnitten und der kleine Epon-Harzblock auf einen Leerblock aufgeklebt. Das weitere Vorgehen entspricht dann einer normalen Elektronenmikroskopie (siehe Material und Methoden).

Die Abb. 5-8 zeigt exemplarisch elektronenmikroskopische Aufnahmen eines Motoneurons. In der Übersicht (Abb. 5-8 A) ist deutlich das Soma mit Dendriten, sowie das Axon des Motoneurons zu erkennen. Die Abb. 5-8 B, C und D zeigen jeweils Detailaufnahmen des Somas, bzw. des proximalen und distalen Axonabschnitts.

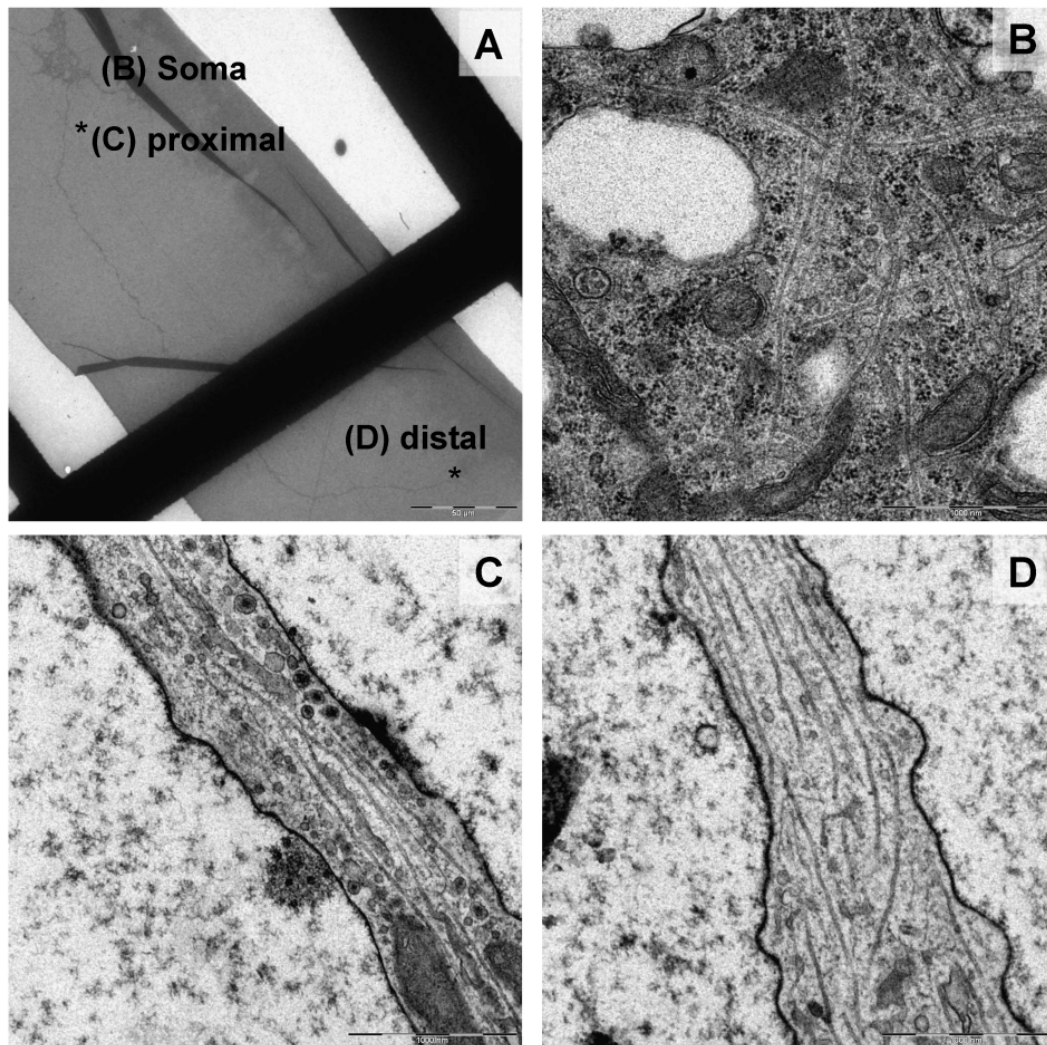


Abb. 5-8: Elektronenmikroskopie von kultivierten Motoneuronen

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von embryonalen Motoneuronen (E 13, 7DIV). Nach Fixation mit 2% Glutaraldehyd in 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,8 wurden die Zellen mit 1% OsO_4 in 0,05 M Phosphatpuffer pH 6,8 behandelt, entwässert und in Epon Harz eingebettet. Einzelne Zellen wurden nach Färbung mit Methyleneblau isoliert und für die weitere Elektronenmikroskopie aufbereitet. (A) Übersichtsbild eines Motoneurons auf einem Nickel-Netzchen; Größenbalken 50 nm. Die weiteren Aufnahmen zeigen Detailaufnahmen vom (B) Soma, sowie der (C) proximalen und (D) distalen Axonabschnitte; Größenbalken 1000 nm.

Abb. 5-9 zeigt Längsschnitte von unterschiedlichen Axonabschnitten. Über die Aufnahmen wurde ein Gitternetz mit Quadraten von jeweils 30.000 nm^2 gelegt und die Anzahl der Schnittpunkte von Mikrotubuli bzw. Filamenten mit den Querlinien ermittelt. Hierüber wurde anschließend die Anzahl der Mikrotubuli bzw. der Filamente pro 500 nm Axondurchmesser berechnet, um einen Wert für die Dichte an Mikrotubuli im Axonquerschnitt zu erhalten.

Die Mikrotubuli haben einen gemessenen Durchmesser von $25,36 \pm 0,85$ nm (Mittelwert \pm SEM, $n=15$), die Filamente einen Durchmesser von $11,29 \pm 0,46$ nm ($n=22$).

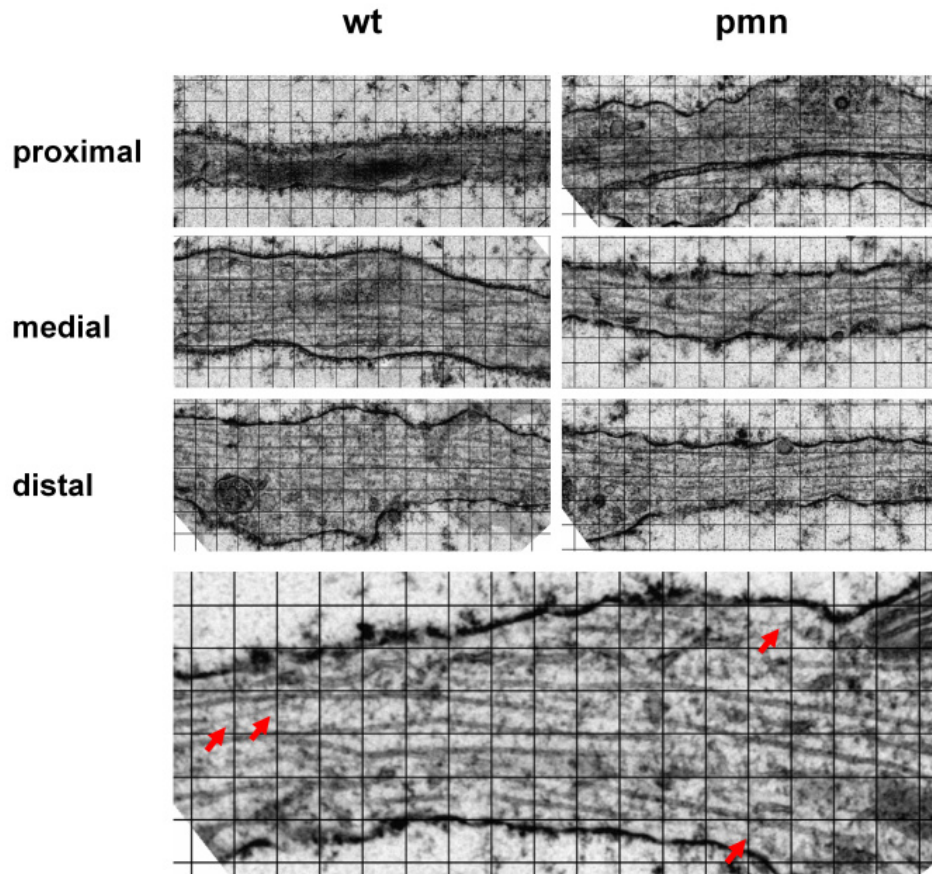


Abb. 5-9: Auswertung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen kultivierter Motoneurone

Beispielhafte Darstellung von proximalen, medialen und distalen Axonabschnitten von Motoneuronen aus Wildtyp- bzw. *pmn*-Mäusen. Über die Aufnahmen wurde ein Gitternetz mit Quadraten von jeweils 30.000 nm² gelegt um die Anzahl der Schnittpunkte von Mikrotubuli bzw. Neurofilamenten mit den quer zum Axondurchmesser verlaufenden Linien zu ermitteln. Die roten Pfeile zeigen derartige Schnittpunkte von Neurofilamenten an.

Die Durchmesser der Axone von kultivierten *pmn*-mutierten Motoneuronen unterscheiden sich nicht denen wildtypischer Motoneurone (Abb. 5-11 E, F). Einziger Unterschied, was den Verlauf der Axone angeht, ist das Auftreten von axonalen Schwellungen bei *pmn*-mutierten Motoneuronen. Die Abb. 5-10 zeigt derartige Axonale Schwellungen, die eine Tau-Immunreaktivität und eine Akkumulation Rhodamin 123 gefärbter Mitochondrien aufweisen. Elektronenmikroskopisch finden sich ebenfalls intakte, aber auch degenerierte Mitochondrien, sowie Einschlusskörperchen.

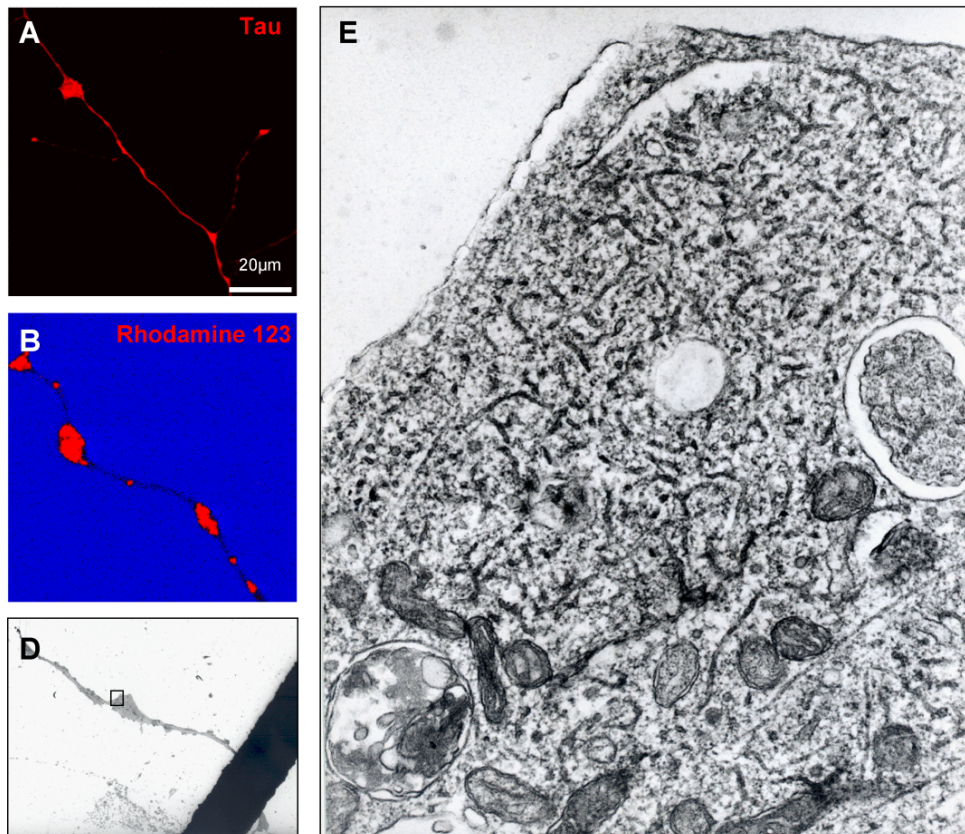


Abb. 5-10: Darstellung der axonalen Schwellungen

Axonale Schwellungen bei *pmn*-mutierten Motoneuronen (E13, 7 DIV), die in Gegenwart von BDNF kultiviert wurden. (A) Detektion von Tau (Cy3, rot) im Axon mittels Immunfluoreszenz; (B) Rhodamin 123 gefärbte Mitochondrien akkumulieren in axonalen Schwellungen; (D) Elektronenmikroskopische Übersichtsaufnahme eines Axons mit einer axonalen Schwellung. Das Rechteck markiert den Bereich der Detailaufnahme (E) der axonalen Schwellung, in der Mitochondrien und Einschlüsse zu erkennen sind.

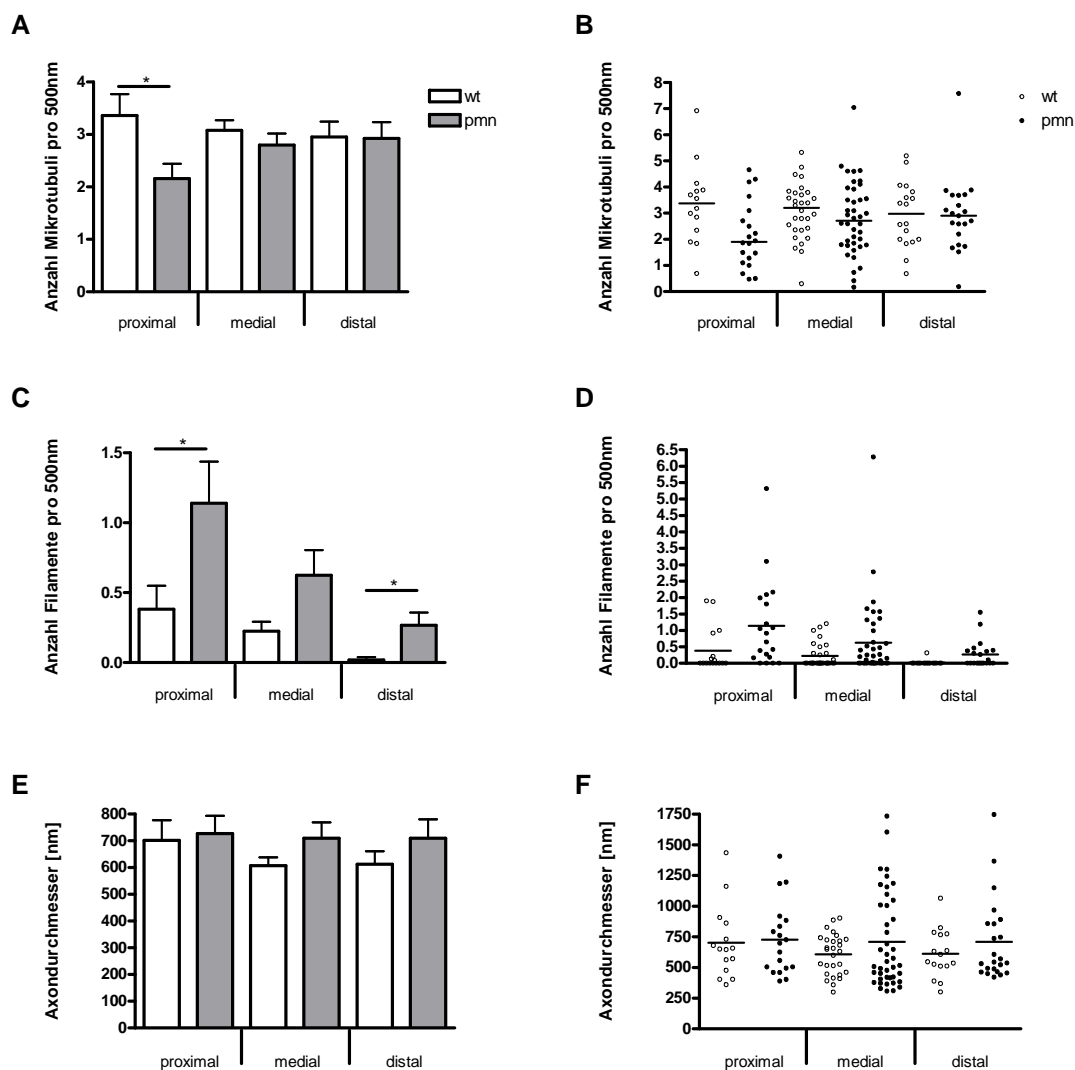


Abb. 5-11: Statistische Analyse der Elektronenmikroskopie

Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder und statistische Analyse mittels ANOVA-Analyse und Bonferroni post-hoc Test von wildtypischen (weiße Balken/Punkte) und *pmn*-mutierten Motoneuronen (dunkle Balken/Punkte), E13, 7 DIV; * $p < 0.05$. Die Abbildungen A, C, E zeigen die Mittelwerte \pm SEM, die Abbildungen B, D, F zeigen die einzelnen Messwerte in Form eines Streudiagramms mit Angabe des Medians.

Die Anzahl der Mikrotubuli pro 500 nm Axondurchmesser sind in den Abbildungen A und B dargestellt, die Anzahl der Neurofilamente pro 500 nm Axondurchmesser in den Abbildungen C und D. Die Axondurchmesser sind in den Abbildungen E und F dargestellt.

Während im medialen und distalen Teil der Axone die Anzahl der Mikrotubuli in Motoneuronen von *pmn*-Mäusen im Vergleich zu Kontrolltieren nicht verändert ist, liegt im proximalen Axonabschnitt eine statistisch signifikante Reduktion um ca. 1/3 (Abb. 5-11 A, B). Parallel hierzu ist bei Motoneuronen von *pmn*-Mäusen die Anzahl der Intermediärfilamente im proximalen und distalen Axonabschnitt signifikant erhöht (Abb. 5-11 C, D).

5.4 Einfluss von neurotrophen Faktoren auf die axonale Pathologie von Motoneuronen

5.4.1 Zielsetzung und Zusammenfassung

Aus in-vivo Experimenten mit *pmn*-Mäusen ist bekannt, dass verschiedene neurotrophe Faktoren, wie CNTF (Sagot et al., 1998c; Sendtner et al., 1992), NT-3 (Haase et al., 1998), BDNF (Sagot et al., 1998c) oder CT-1 (Bordet et al., 1999), den Beginn bzw. den Verlauf der Motoneurondegeneration hinauszögern können. Neurotrophe Faktoren sind primär Überlebensfaktoren. Sie wirken oft antimitotisch auf Grund eines differenzierenden Einflusses auf die jeweiligen Zellen im Zielgebiet. Dies konnte schon in den 1950er Jahren in eindrucksvollen Experimenten von Rita Levi-Montalcini und Viktor Hamburger gezeigt werden, die wegweisende Experimente zur Entdeckung des Nervenwachstumsfaktors (nerve growth factor, NGF) durchgeführt haben (Levi-Montalcini et al., 1954; Levi-Montalcini, 1976). NGF gehört wie BDNF zur Gruppe der Neurotrophine.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von neurotrophen Faktoren (BDNF, CNTF, GDNF) auf den Phänotyp kultivierter Motoneurone untersucht. Werden embryonale Motoneurone von *pmn*-Mäusen in Gegenwart des neurotrophen Faktors BDNF kultiviert, weisen diese im Vergleich zu Motoneuronen aus Kontrolltieren völlig normale Überlebensraten auf. Allerdings bilden sich bei *pmn*-mutierten Motoneuronen die bereits beschriebenen axonalen Pathologien (Bommel et al., 2002; Kaya, 2004): Die Axone sind nach sieben Tagen in Kultur um mehr als die Hälfte im Vergleich zu Motoneuronaxonen aus Kontrolltieren verkürzt und weisen axonale Schwellungen auf. Der gleiche Phänotyp zeigt sich, wenn Motoneurone aus *pmn*-Mäusen in Gegenwart des Wachstumsfaktors GDNF kultiviert werden. Im Gegensatz zu BDNF und GDNF führt der neurotrophe Faktor CNTF zu einer Rettung der axonalen Pathologien.

5.4.2 CNTF moduliert die pathologischen Veränderungen an *pmn*-mutierten Motoneuronen

Um den Einfluss von neurotrophen Faktoren auf den Phänotyp kultivierter Motoneurone aus *pmn*-Mäusen zu untersuchen, wurden diese für jeweils sieben Tage in Gegenwart von jeweils 10ng/ml der jeweiligen neurotrophen Faktoren kultiviert. Mittels Immunfluoreszenz wurden die Axone mit einem Antiserum gegen pTau, die Dendriten mit einem Antikörper gegen MAP2 dargestellt und anschließend das Längenwachstum und das Auftreten von axonalen Schwellungen ausgewertet.

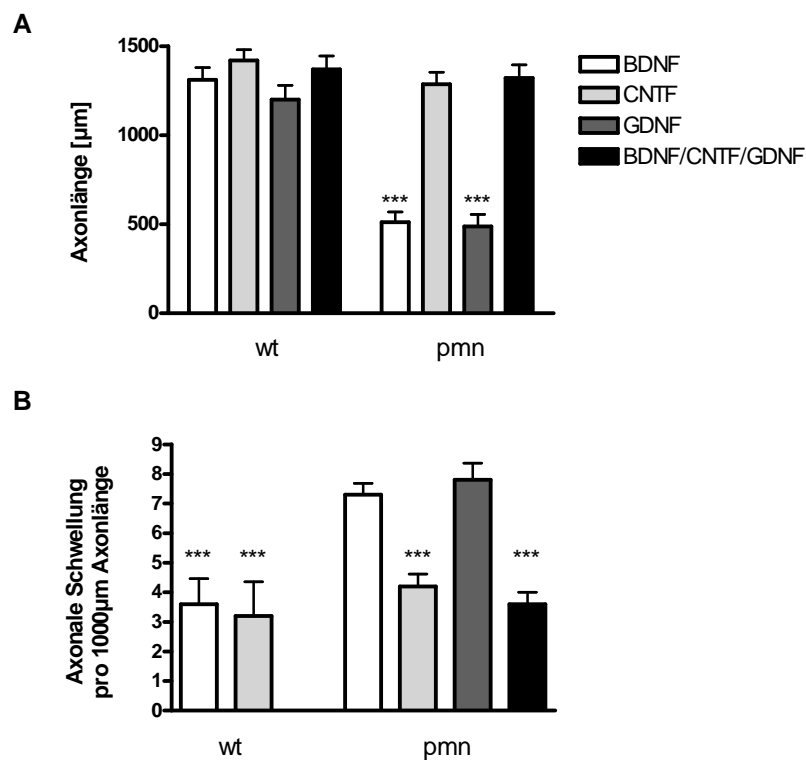


Abb. 5-12: CNTF reduziert die axonalen Pathologien bei kultivierten Motoneuronen von *pmn*-Mäusen

Ausmessung und statistische Analyse der (A) Axonlängen des längsten Axons und der (B) Anzahl axonaler Schwellungen pro 1000 µm Axonlänge von wildtypischen und *pmn*-mutierten Motoneuronen (E13, 7 DIV), die in Gegenwart von verschiedenen neurotrophen Faktoren kultiviert wurden: BDNF (10 ng/ml), CNTF (10 ng/ml), GDNF (10 ng/ml). Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA-Analyse und dem Bonferroni post-hoc Test; *** $p < 0,001$.

In Gegenwart des Wachstumsfaktors BDNF sind die Axone bei *pmn*-mutierten Motoneuronen deutlich verkürzt (Abb. 5-12, A), bei einem gleichzeitigem Auftreten von axonalen Schwellungen (Abb. 5-12, B). Das gleiche Bild zeigt sich, wenn die Motoneurone mit GDNF in Kultur gehalten werden (Abb. 5-12). Der neurotrophe Faktor CNTF führt dagegen zu einer Reduktion der axonalen Pathologien. Die Axone wachsen auf eine normale Länge von ~1300µm aus und zeigen keine vermehrte Anzahl von axonalen Schwellungen, verglichen mit Motoneuronaxonen aus Kontrolltieren (Abb. 5-12). Lässt man die Motoneurone in Gegenwart aller drei Wachstumsfaktoren, BDNF, CNTF und GDNF auswachsen, so zeigt sich keine Verbesserung, die über die alleinige CNTF Gabe hinausreicht (Abb. 5-12).

5.5 Analyse des axonalen Transports

5.5.1 Zielsetzung und Zusammenfassung

Bei der *p_{mn}*-Maus liegt eine Punktmutation im *tbce* Gen vor, welche zu einem Aminosäureaustausch im Tubulin-spezifischen Chaperon E führt (Bommel et al., 2002; Martin et al., 2002). Die Identifikation des Gendefekts in einer Komponente der Mikrotubuli-Assemblierungs-Maschinerie deutet auf den Stellenwert von Mikrotubuli und axonalem Transport für die Integrität von Motoneuronen hin (Jablonka et al., 2006).

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den axonalen Transport in kultivierten Motoneuronen aus *p_{mn}*-Mäusen zu untersuchen. Hierfür wurden Mitochondrien mit verschiedenen Farbstoffen markiert und ihr Transport entlang der axonalen Mikrotubuli analysiert. Um auszuschließen, dass eine Störung der Mitochondrien selbst für einen veränderten axonalen Transport der Mitochondrien verantwortlich ist, wurde neben dem Transport der Mitochondrien auch das mitochondriale Membranpotential untersucht. Defekte im mitochondrialen Potential sind bereits für andere Motoneuronerkrankungen beschrieben. So führt beispielsweise die transgene Überexpression einer mutierten Form der Superoxid Dismutase 1 (SOD1) zu einer Dysfunktion der oxidativen Phosphorylierung in Mitochondrien von transgenen Mäusen, was eine Störung des axonalen Transports der Mitochondrien und schließlich eine Motoneurondegeneration nach sich zieht (Higgins et al., 2002; Mattiazzi et al., 2002; Rizzardini et al., 2006; Rizzardini et al., 2005).

Durch die Analyse des axonalen Transports und des Membranpotentials der Mitochondrien konnte gezeigt werden, dass in Motoneuronen aus *p_{mn}*-Mäusen eine bidirektionale Störung des axonalen Transports von Mitochondrien bei einem intakten mitochondrialen Potential vorliegt. Diese Störung des axonalen Transports verschwindet, wenn die Motoneurone in Gegenwart des neurotrophen Faktors CNTF kultiviert werden. Damit rettet CNTF nicht nur die phänotypischen axonalen Pathologien, sondern hebt auch die funktionellen Defizite in kultivierten Motoneuronen aus *p_{mn}*-Mäusen auf.

5.5.2 Axonaler Transport von Mitochondrien

Eine Störung im Aufbau des Mikrotubuliskeletts sollte sich auf den mikrotubuliabhängigen axonalen Transport auswirken. Der schnelle axonale Transport von Mitochondrien über lange Distanzen ist abhängig von axonalen Mikrotubuli (Grafstein & Forman, 1980; Hollenbeck, 1996). Die Mitochondrien werden sowohl in anterograder als auch in retrograder Richtung transportiert. Das Studium des axonalen Transports von Mitochondrien eignet sich daher besonders für die im Rahmen dieser Arbeit angestrebten Untersuchungen zum axonalen Transport in Motoneuronen.

In lebenden Zellen lassen sich Mitochondrien mittels verschiedener Farbstoffe anfärben. Für die vorliegende Arbeit kamen dabei je nach Fragestellung Rhodamin 123, JC-1, MitoTracker Green und MitoFluor Red594 zum Einsatz (Tab. 5-1, Abb. 5-19). Die Studien zum axonalen Transport wurden mit Rhodamin 123 durchgeführt. Rhodamin 123 ist ein zellpermeabler, kationischer Fluoreszenzfarbstoff, der für die Zellen nicht toxisch ist und sich auch auf den axonalen Transport der Mitochondrien nicht

auswirkt (Johnson et al., 1980; Takenaka et al., 1990). Das Emissionsmaximum liegt bei 529nm, wobei die Fluoreszenzintensität von der Höhe des Membranpotentials der Mitochondrien abhängig ist (Grouselle et al., 1990).

Für die Untersuchung des axonalen Transports wurden die Motoneurone 5 Tage zunächst nur mit BDNF kultiviert und vor der Analyse 10 Minuten bei 37°C mit 0,2 µg/ml Rhodamin 123 inkubiert. Die weitere Analyse erfolgte an einem Konfokalen Laserscanning Mikroskop (TSC SP2, Leica), wobei die Motoneurone konstant bei 37°C in einer Kammer für Lebendzellbeobachtungen gehalten wurden. Da die Zellen nicht mit CO₂ begast werden konnten, wurde L15-Leibowitz Medium verwendet, das ohne einen Natrium-Bikarbonatpuffer einen physiologischen pH-Wert einstellt.

Die Abb. 5-13 zeigt eine Falschfarbendarstellung der Mitochondrien in Motoneuronen von einer *pmn*-Maus (Abb. 5-13 A) im Vergleich zu einer Wildtypmaus (Abb. 5-13 B). In beiden Motoneuronen befinden sich die Mitochondrien verteilt im Soma, den Dendriten und im Axon. Vermutlich bedingt durch die verkürzten Axone bei *pmn* Motoneuronen, findet man dort teilweise Akkumulationen von Mitochondrien.

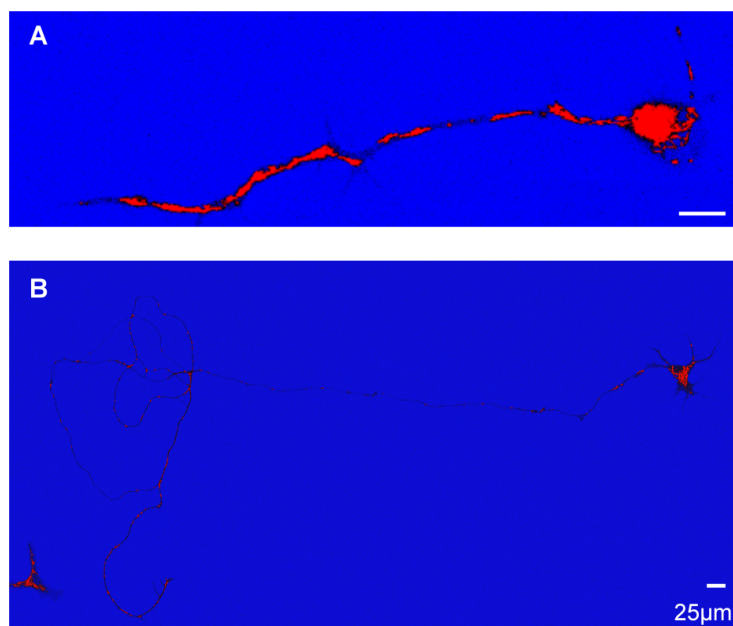


Abb. 5-13: Rhodamin123 gefärbte Mitochondrien in kultivierten Motoneuronen

Kultivierte embryonale Motoneurone (E13, 5 DIV) von Wildtyp- (A) und *pmn*-Mäusen (B) wurden für 10 min mit Rhodamin 123 inkubiert und anschließend die Mitochondrien (rot) mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie dargestellt. Längsbalken entsprechen 25 µm.

Zur Analyse des axonalen Transports der Mitochondrien wurden von den kultivierten und Rhodamin 123 gefärbten Motoneuronen Zeitrafferaufnahmen mit einem Zeitintervall von 2 Sekunden aufgenommen. Die Abb. 5-14 zeigt beispielhaft eine derartige Aufnahme. Während zwei Mitochondrien in einem Zeitintervall von 14 Sekunden ein stationäres Verhalten zeigen, wird ein sehr

langgestrecktes Mitochondrium an den stationären Mitochondrien vorbei entlang des Axons transportiert.

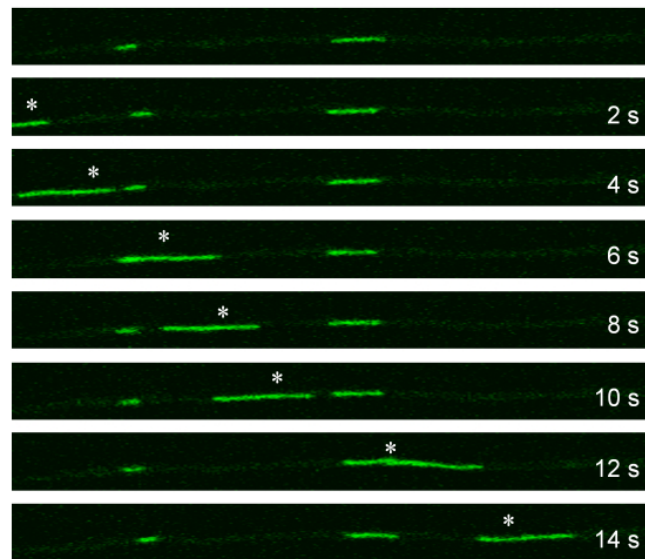


Abb. 5-14: Zeitrafferaufnahmen von transportierten Mitochondrien

Kultivierte embryonale Motoneurone (E13, 5 DIV) von Wildtyp-Mäusen wurden für 10 min mit Rhodamin 123 inkubiert und anschließend der axonale Transport der Mitochondrien (grün) mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie untersucht. Dargestellt sind Zeitrafferaufnahmen mit einem Zeitintervall von 2 Sekunden. Während zwei Mitochondrien während dieser Zeit sich stationär verhalten, wird ein langgestrecktes Mitochondrium (*) anterograd transportiert.

Vergleicht man die Anzahl der stationären Mitochondrien in einem Zeitintervall von 10 min in Motoneuronaxonen von *pnm*-Mäusen mit denen von Wildtypmäusen (

Abb. 5-16), so zeigt sich ein deutlicher Unterschied, wenn die Motoneurone nur mit dem Wachstumsfaktor BDNF kultiviert werden. Während auf 10 μ m Axonlänge bei Motoneuronen aus Wildtypmäusen durchschnittlich $2,1 \pm 0,3$ (MW \pm StdAW) stationäre Mitochondrien vorliegen, verhalten sich bei *pnm*-mutierten Motoneuronen $3,5 \pm 0,5$ Mitochondrien stationär. Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass es funktionelle Defizite im axonalen Transport von *pnm*-mutierten Motoneuronen gibt.

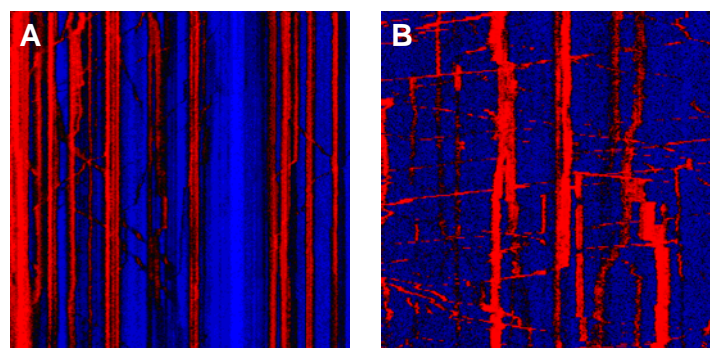


Abb. 5-15: Kymographen von axonalen Mitochondrien in Motoneuronen von *pnm*-Mäusen (A) und Kontrolltieren (B)

Darstellung des axonalen Transports von Rhodamin 123 gefärbten Mitochondrien in *pnm*-mutierten Motoneuronen (A) im Vergleich zu wildtypischen Motoneuronen (B) in Form von Kymographen.

Einen Eindruck über die Unterschiede im axonalen Transport von Mitochondrien vermitteln die Kymographen von axonalen Mitochondrien in Motoneuronen von *pmn*-Mäusen (Abb. 5-15, A) und Kontrolltieren (Abb. 5-15, B). Kymographen sind zeitabhängige Raumplots, die aus Zeitrafferaufnahmen generiert werden. Während sich stationäre Mitochondrien als vertikale Linien darstellen, werden transportierte Mitochondrien als diagonale Linien präsentiert. Je flacher hierbei die Steigung der Diagonale ist, umso schneller läuft der Transport der Mitochondrien ab.

Werden die Motoneurone jedoch in Gegenwart von CNTF kultiviert, so gibt es keine Unterschiede mehr zwischen Motoneuronen von *pmn*- versus Wildtypmäusen (Abb. 5-16). Die Anzahl der stationären Mitochondrien ist vergleichbar mit der Anzahl bei Motoneuronen aus Wildtypmäusen, die mit BDNF kultiviert wurden. Damit hat CNTF nicht nur einen Effekt auf die Morphologie, sondern auch auf funktionelle Komponenten von Motoneuronen.

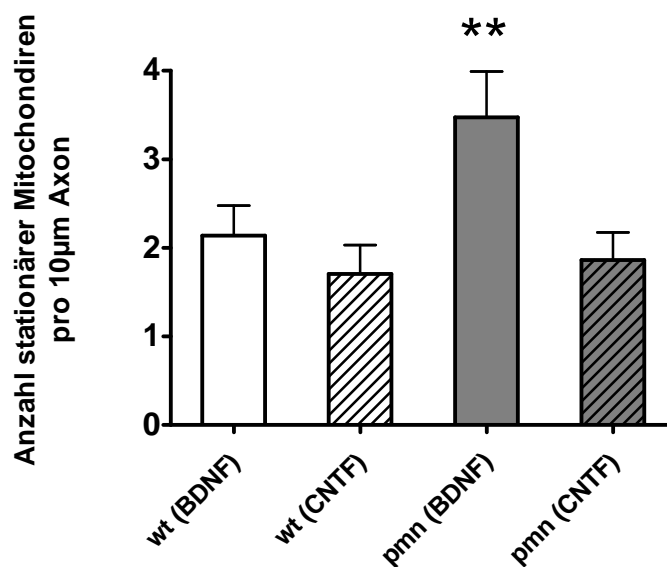


Abb. 5-16: Anzahl der stationären Mitochondrien in Motoneuronen

Statistische Analyse der Anzahl stationärer Mitochondrien pro 10 μm Axon in wildtypischen und *pmn*-mutierten Motoneuronen (E13, 5 DIV), die in Gegenwart von BDNF (10 ng/ml) bzw. CNTF (10 ng/ml) kultiviert wurden. Statistisch signifikante Erhöhung der Anzahl stationärer Mitochondrien bei *pmn*-mutierten Motoneuronen in Gegenwart von CNTF im Vergleich zu den anderen Gruppen. ANOVA-Analyse mit Bonferroni post-hoc Test, ** $p < 0.01$

Als nächstes wurden die Anzahl der transportierten Mitochondrien und deren maximale Transportgeschwindigkeiten ermittelt (Abb. 5-17, Abb. 5-18).

In einem Zeitintervall von 10 min wurden zunächst die anterograd und retrograd transportierten Mitochondrien ausgezählt. Auch hierbei zeigt sich ein deutliches Defizit bei BDNF-behandelten *pmn*-mutierten Motoneuronen, verglichen mit wildtypischen Motoneuronen (Abb. 5-17). Im gleichen Zeitraum werden bei Motoneuronen aus *pmn*-Mäusen weniger als die Hälfte an Mitochondrien transportiert. Allerdings führt auch hier der Wachstumsfaktor CNTF zu einer Wiederherstellung.

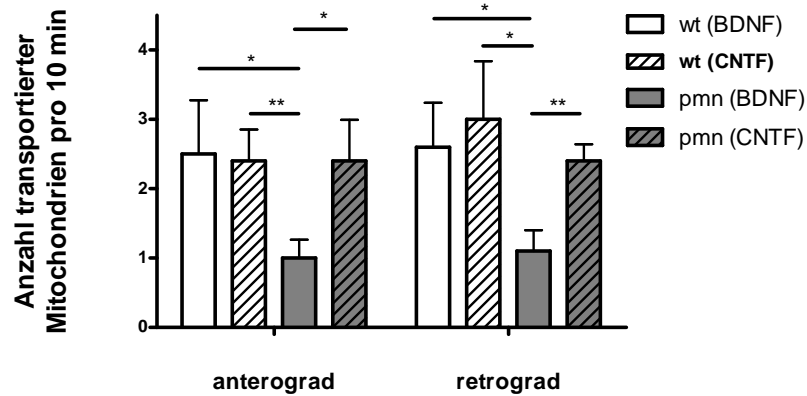


Abb. 5-17: Anzahl transportierter Mitochondrien

Statistische Analyse der Anzahl transportierter Mitochondrien in einem Zeitintervall von 10 min in wildtypischen und *pmn*-mutierten Motoneuronen (E13, 5 DIV), die in Gegenwart von BDNF (10 ng/ml) bzw. CNTF (10 ng/ml) kultiviert wurden. Sowohl anterograd als auch retrograd statistisch signifikante Reduktion der Anzahl transportierter Mitochondrien in *pmn*-mutierten Motoneuronen unter BDNF-Gabe (10 ng/ml). ANOVA-Analyse mit Bonferroni post-hoc Test, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Weniger deutlich sind die Effekte bei der maximalen Transportgeschwindigkeit der Mitochondrien (Abb. 5-18). Zwar ist die maximale anterograde Transportgeschwindigkeit von Mitochondrien in mit BDNF kultivierten Motoneuronaxonen von *pmn*-Mäusen etwas niedriger als im Vergleich zu Wildtypmäusen, jedoch ist dieser Unterschied nicht signifikant. Ein signifikanter Unterschied besteht jedoch, wenn die *pmn*-mutierten Motoneurone mit BDNF bzw. CNTF kultiviert werden. Hier führt CNTF zu einem signifikanten Anstieg der maximalen Transportgeschwindigkeiten.

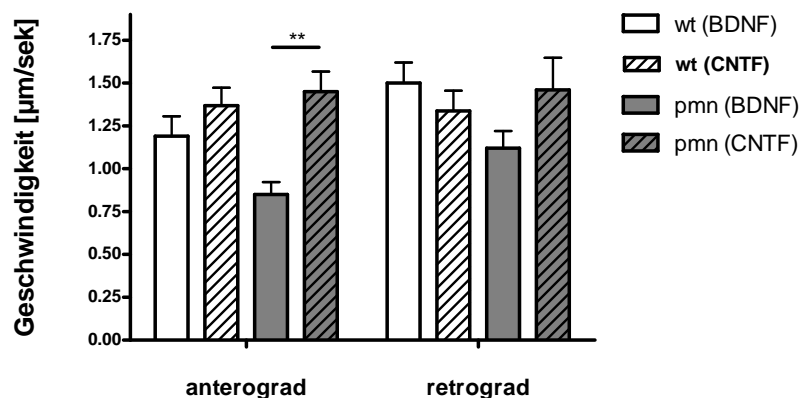


Abb. 5-18: Maximale Transportgeschwindigkeiten von axonal transportierten Mitochondrien

Statistische Analyse der maximalen Transportgeschwindigkeiten [μm/sek] von Mitochondrien in wildtypischen und *pmn*-mutierten Motoneuronen (E13, 5 DIV), die in Gegenwart von BDNF (10 ng/ml) bzw. CNTF (10 ng/ml) kultiviert wurden. Bei *pmn*-mutierten Motoneuronen ist die maximale Transportgeschwindigkeit für anterograd transportierte Mitochondrien in Gegenwart von BDNF im Vergleich zu CNTF-behandelten Zellen statistisch signifikant reduziert. ANOVA-Analyse mit Bonferroni post-hoc Test, ** $p < 0.01$.

5.5.3 Mitochondriales Potential

Eine Störung des axonalen Transports von Mitochondrien, wie sie bei Motoneuronen aus *pmn*-Mäusen nachgewiesen wurde, kann durch einen Defekt der axonalen Mikrotubuli hervorgerufen werden. Allerdings könnte auch eine Störung der Mitochondrien selbst zu einem veränderten axonalen Transport der Mitochondrien führen. Es ist bekannt, dass Motoneuronenerkrankungen auch durch eine Dysfunktion der Mitochondrien hervorgerufen werden können (s. 3.1.2). Eine Dysfunktion der Mitochondrien äußert sich auch in einer Störung des mitochondrialen Membranpotentials. Das mitochondriale Membranpotential über die innere mitochondriale Membran stellt die wichtigste Energiequelle tierischer Zellen dar.

Um einen Defekt des mitochondrialen Membranpotentials bei *pmn*-mutierten Motoneuronen auszuschließen, wurden die mit BDNF kultivierten Motoneurone hinsichtlich ihres mitochondrialen Potentials untersucht.

5.5.3.1 Vorversuche zur Wahl eines geeigneten Farbstoffs zur Analyse des mitochondrialen Potentials

Der für den axonalen Transport verwendete Farbstoff Rhodamin 123 ist auch für die Messung des Membranpotentials geeignet. Die Fluoreszenzintensität der gefärbten Mitochondrien ist potentialabhängig (Tab. 5-1, Abb. 5-19). Es handelt sich hierbei also um einen ekliptischen Indikator. Allerdings ist eine exakte Messung der Fluoreszenzintensitätsänderung nicht einfach zu bewerkstelligen. Daher wird zur Analyse des mitochondrialen Membranpotentials häufiger auf ratiometrische Indikatoren zurückgegriffen, wie es der Farbstoff JC-1 ermöglicht (Smiley et al., 1991; Salvioli et al., 1997; Cossarizza et al., 1993).

	Axonaler Transport	Redox-potential
Rhodamin 123	Ü	Ü ekliptisch
JC-1	Ū	Ü ratiometrisch
MitoTracker Green	Ū	Ū
MitoFluor Red594	Ü	Ü ekliptisch

Tab. 5-1: Mitochondrienfarbstoffe

Der kationische Farbstoff JC-1 akkumuliert potentialabhängig in Mitochondrien, was durch eine Fluoreszenzemissionsänderung vom grünen (~529 nm) in den roten (~590 nm) Bereich angezeigt wird (Abb. 5-19). In intakten Zellen liegt ein hohes Membranpotential (–170 mV bis –220 mV) an den

Mitochondrien vor. JC-1 existiert als Di-Multimer und kann im roten Bereich detektiert werden. Mit zunehmender Schädigung der Mitochondrien nimmt das Potential ab und JC-1 zerfällt in Monomere, die dann grün leuchten. Das Verhältnis der grünen zur roten Fluoreszenz ist nur vom Membranpotential der Mitochondrien abhängig und wird nicht durch andere Faktoren, wie der Größe der Mitochondrien, der Form oder der Dichte beeinflusst. Das Verhältnis von grüner zu roter Fluoreszenz ist daher ein Maß für den Verlust des Membranpotentials.

Bei Zellkulturuntersuchungen mit kortikalen Neuronen der Ratte wurden diese 20-30 Minuten mit 2,0 µg/ml JC-1 inkubiert und anschließend das mitochondriale Potential untersucht (White & Reynolds, 1996). Bei Versuchen mit embryonalen Motoneuronkulturen, die mit 2,0 µg/ml JC-1 inkubiert wurden, zeigte sich jedoch, dass der Transport der Mitochondrien in der gesamten Zelle zum Erliegen kam. Eine Verkürzung der Inkubationszeit bei gleicher Konzentration blieb ebenfalls ohne Erfolg. Bis zu einer Verdünnung des JC-1 zu 0,125 µg/ml konnten die Mitochondrien zwar mikroskopisch nachgewiesen werden, allerdings nur bei komplettem Versagen des axonalen Transports. Ab einer JC-1 Konzentration von 0,075 µg/ml war es nicht mehr möglich, die Mitochondrien in den embryonalen Motoneuronen darzustellen. Der potentialabhängige Farbstoff JC-1 konnte daher nicht zur Analyse des mitochondrialen Membranpotentials in embryonalen Motoneuronkulturen verwendet werden.

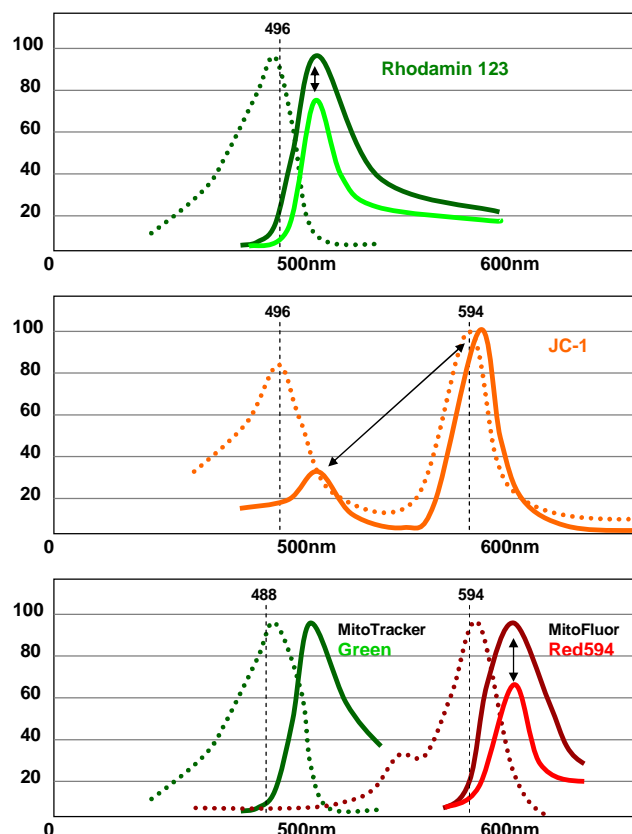


Abb. 5-19: Anregungswellenlängen und Emissionsspektren der verwendeten Mitochondrienfarbstoffe

Darstellung der Anregungsspektren (gepunktete Linien) mit Anregungsoptima und der Emissionsspektren (durchgezogene Linien) für verschiedene Mitochondrienfarbstoffe (Rhodamin 123, JC-1, MitoTracker Green, MitoFluor Red594). Für die potentialabhängigen Farbstoffe ist die Änderung der Emissionsspektren in Abhängigkeit vom mitochondrialen Potential in Form schwarzer Pfeile markiert.

Im Folgenden wurden zwei weitere mitochondriale Farbstoffe getestet: Der MitoTracker Green und MitoFluor Red594 (Tab. 5-1, Abb. 5-19). Beim MitoTracker GreenFM handelt es sich um einen Mitochondrien-selektiven Farbstoff, der, bereits in nanomolaren Konzentrationen zugesetzt, in aktiven Mitochondrien membranunabhängig konzentriert wird und sich für die Analyse des mikrotubuliabhängigen Transports von Mitochondrien eignet (Baumann & Murphy, 1995). MitoFluor Red594 wiederum ist ein Membranpotential-sensitiver ekliptischer Indikator mit einem Emissionsmaximum bei 630 nm. Da er unterhalb von 600 nm kaum eine Emission zeigt, eignet sich dieser Farbstoff sehr gut für einen kombinierten Einsatz mit dem MitoTracker Green. Während alle Mitochondrien eine Emission im grünen Bereich zeigen, ist die Emission im roten Bereich vom mitochondrialen Membranpotential abhängig.

Nachdem die kultivierten Motoneurone mit MitoTracker Green und MitoFluor Red594 bei 37°C inkubiert wurden, fand die weitere Analyse in einer Kammer für Lebendzellbeobachtungen mittels eines Konfokalen Laserscanning-Mikroskopes statt. Die Abb. 5-20 zeigt beispielhaft die Emission von MitoTracker Green (Abb. 5-20, A) und MitoFluor Red594 (Abb. 5-20, B). Die für jedes Pixel ermittelten Fluoreszenzintensitäten werden in einem Streudiagramm dargestellt (Abb. 5-20, D). Über eine Auswahlmaske kann die Fläche ausgewählt werden, deren dargestellte Punkte gleichzeitig eine hohe Fluoreszenzintensität für MitoTracker Green und eine hohe Fluoreszenzintensität für MitoFluor Red594 repräsentieren (Abb. 5-20, D, gelbe Maske). Die Pixel aller in dieser Maske enthaltenen Punkte werden dann in dem konfokal aufgenommenen Bild als weiße Pixel dargestellt (Abb. 5-20, C). Sie repräsentieren letztlich alle Mitochondrien mit einem hohen mitochondrialen Membranpotential.

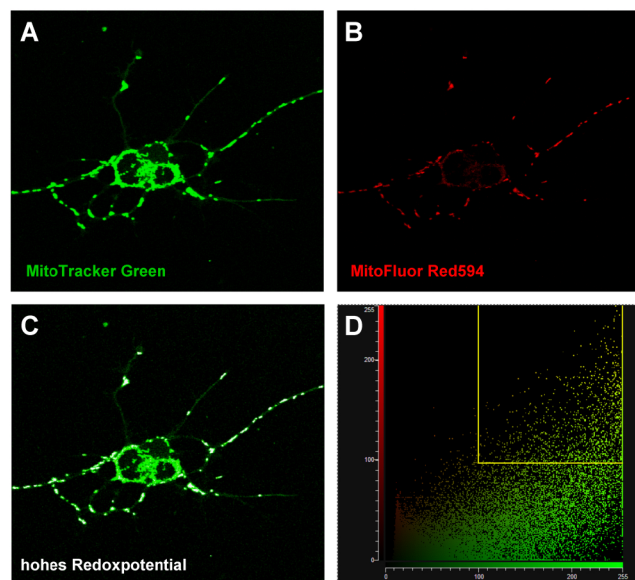


Abb. 5-20: Darstellung des mitochondrialen Membranpotentials in kultivierten Motoneuronen

Embryonale Motoneurone (E13, 5 DIV) wurden mit (A) MitoTracker Green (25 nM) und (B) MitoFluor Red594 (100 nM) inkubiert und mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie hinsichtlich ihres mitochondrialen Potentials untersucht. In Abbildung C sind alle Mitochondrien mit hohem Redoxpotential in weiß dargestellt. Die Auswahl dieser Mitochondrien entspricht den Punkten im gelben Rechteck des Streudiagramms in Abbildung D, bei dem jedes Pixel aus A und B in Abhängigkeit von seiner Fluoreszenzintensität im grünen und roten Bereich dargestellt ist.

Die Abb. 5-20 und Abb. 5-21 zeigen beispielhaft, dass es durch den kombinierten Einsatz von MitoTracker Green und MitoFluor Red594 möglich ist, Mitochondrien mit einem hohen Membranpotential von Mitochondrien mit niedrigem Membranpotential zu unterscheiden. Zugleich kommt der axonale Transport der Mitochondrien nicht zum Erliegen, wie es beim Farbstoff JC-1 der Fall war. So sieht man in Abb. 5-21 A beispielsweise ein Mitochondrium mit niedrigem Membranpotential, das retrograd in einem Axon eines embryonalen Motoneurons transportiert wird.

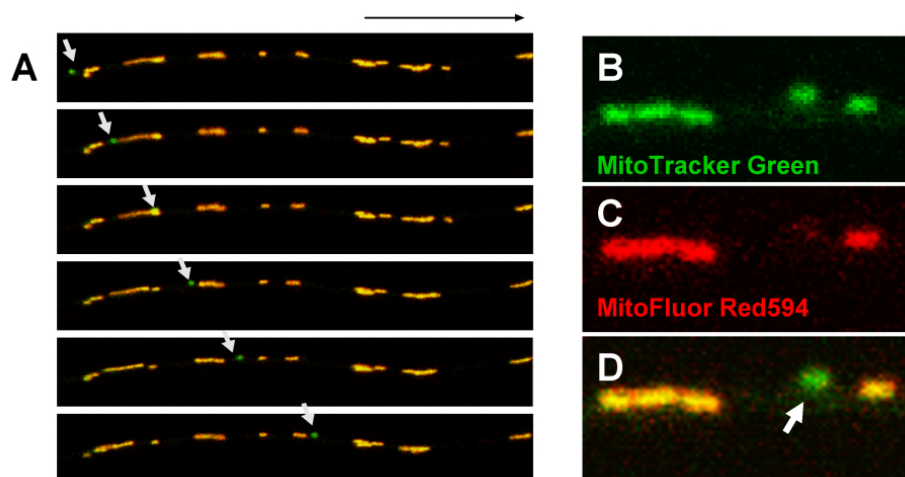


Abb. 5-21: Analyse des mitochondrialen Membranpotentials

Embryonale Motoneurone (E13, 5 DIV) wurden mit MitoTracker Green (25 nM) und MitoFluor Red594 (100 nM) inkubiert und mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie hinsichtlich ihres mitochondrialen Potentials untersucht. Abbildung A zeigt Zeitrafferaufnahmen mit einem Zeitintervall von 2 Sekunden. Der weiße Pfeil markiert ein Mitochondrium mit geringem Redoxpotential, das retrograd transportiert wird. Die Abbildungen B, C, D zeigen dieses Mitochondrium in höherer Vergrößerung.

5.5.3.2 Analyse des mitochondrialen Potentials

Zur Analyse des mitochondrialen Redoxpotentials wurden die kultivierten embryonalen Motoneurone mit MitoTracker Green und MitoFluor Red594 bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop untersucht.

Das Ergebnis der Auswertung für wildtypische Motoneurone ist beispielhaft in der Abb. 5-22 dargestellt. Neben einem Übersichtsbild sind Soma, proximales und distales Axon vergrößert abgebildet. Nahezu alle Mitochondrien weisen ein hohes mitochondriales Membranpotential auf (Abb. 5-22, C1-4), was darauf hindeutet, dass die Zellen vital sind und keine Anzeichen von Apoptose aufweisen.

Um die Methode auf ihre Funktionsfähigkeit hin zu überprüfen, wurden die Zellen mit FCCP (Carbonyl Cyanid p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon), einem Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette, behandelt. FCCP ist ein H⁺-Ionophor und Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien, mit der Fähigkeit, die mitochondrialen Membranen zu depolarisieren. Dadurch gelingt es Protonen (H⁺), die innere Mitochondrienmembran zu passieren. FCCP erzwingt damit einen

Sauerstoffverbrauch, jedoch ohne die Synthese von ATP. Das Redoxpotential der Mitochondrien bricht zusammen.

Die Abb. 5-23 (A3, B3, C3, D3) zeigt den akuten Effekt auf das mitochondriale Membranpotential. Während die Emission im grünen Bereich erhalten bleibt (Abb. 5-23, A3), nimmt die Emission im roten Bereich ab (Abb. 5-23, B3). Im Streudiagramm ist dieser Fluoreszenzshift deutlich zu erkennen (Abb. 5-23, D3), nur noch wenige Mitochondrien weisen ein normales mitochondriales Potential auf (Abb. 5-23, C3).

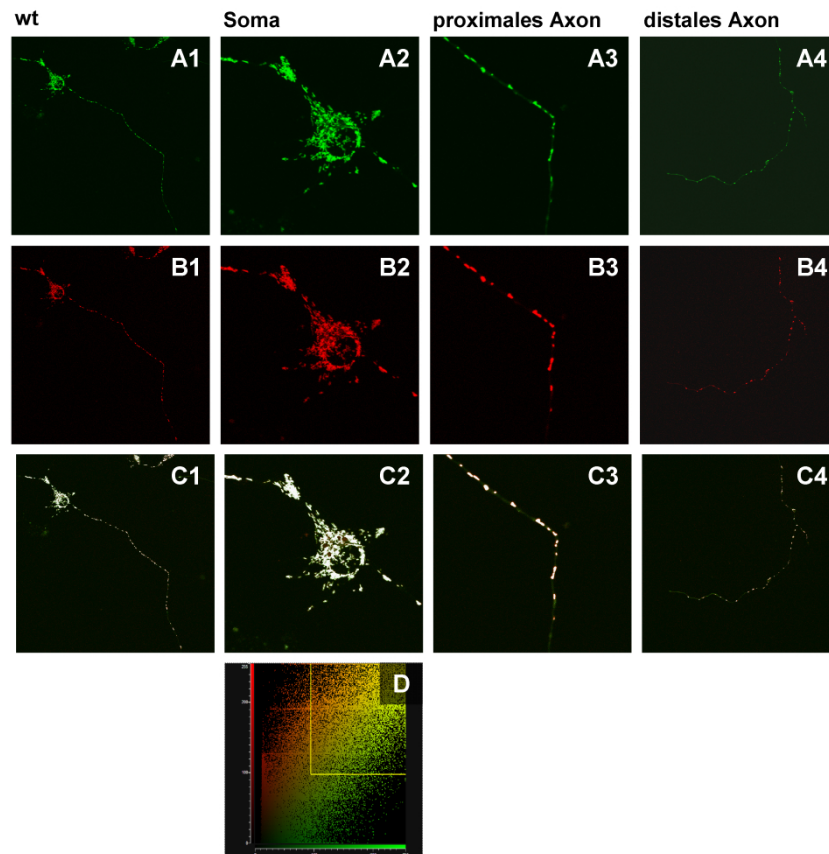


Abb. 5-22: Mitochondriales Membranpotential in wildtypischen Motoneuronen

Embryonale wildtypische Motoneurone (E13, 5 DIV) wurden mit (A1-4) MitoTracker Green (25 nM) und (B1-4) MitoFluor Red594 (100 nM) inkubiert und mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie hinsichtlich ihres mitochondrialen Potentials untersucht. Die Abbildungen C1-4 zeigen in weiß alle Mitochondrien mit einem hohen mitochondrialem Potential. In D ist das entsprechende Streudiagramm dargestellt. Die Abbildungen zeigen verschiedene Ausschnitte: (1) Übersicht, (2) Soma, (3) proximales Axon, (4) distales Axon.

Sollten die Mitochondrien in Motoneuronen von *pnr*-Mäusen eine Dysfunktion des mitochondrialen Membranpotentials aufweisen, müsste bei der Analyse ebenfalls ein Fluoreszenzshift wie bei den FCCP-behandelten Neuronen zu detektieren sein.

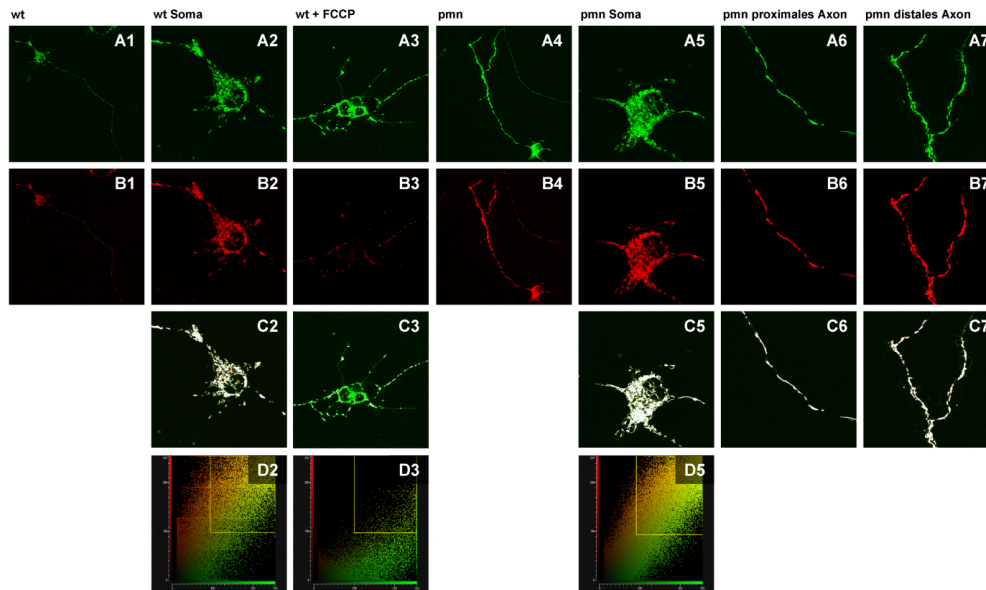


Abb. 5-23: Mitochondriales Membranpotential in Motoneuronen aus *pmn*-Mäusen

Embryonale Motoneurone (E13, 5 DIV) wurden mit (A1-4) MitoTracker Green (25 nM) und (B1-4) MitoFluor Red594 (100 nM) inkubiert und mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie hinsichtlich ihres mitochondrialen Potentials untersucht. Die Abbildungen C1-4 zeigen in weiß alle Mitochondrien mit einem hohen mitochondrialem Potential. In D ist das entsprechende Streudiagramm dargestellt. Die Abbildungen zeigen verschiedene Ausschnitte: (1) Übersicht Wildtyp, (2) Soma Wildtyp, (3) Soma Wildtyp von mit FCCP behandelten Zellen. FCCP ist ein Entkoppler der mitochondrialen Atmungskette und zerstört das mitochondriale Membranpotential, was durch die in den grünen Bereich verschobene Punktwolke im Streudiagramm (D3) ersichtlich wird. (4) Übersicht *pmn*-mutiertes Motoneuron, (5) Soma *pmn*, (6) proximales Axon *pmn*, (7) distales Axon *pmn*.

Die Abb. 5-23 (4-7) zeigt deutlich, dass kein Unterschied hinsichtlich des mitochondrialen Membranpotentials in *pmn*-mutierten Motoneuronen im Vergleich zu wildtypischen Motoneuronen besteht. Das Streudiagramm für *pmn*-Motoneurone (Abb. 5-23, D5) zeigt ein ähnliches Bild wie für wildtypische Motoneurone Abb. 5-23, D2). In den Übersichtsvergrößerungen (Abb. 5-23, C5-C7) sind kaum Mitochondrien mit niedrigem Membranpotential zu finden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass in Motoneuronen aus *pmn*-Mäusen kein Defekt im mitochondrialen Membranpotential besteht. Eine vorliegende Dysfunktion der Mitochondrien, die den axonalen Transport der Mitochondrien beeinflussen könnte, liegt nicht vor.

5.6 Untersuchung des bei der Rettung der axonalen Pathologien in Motoneuronen von *p_{mn}*-Mäusen beteiligten CNTF-Signalweges

5.6.1 Zielsetzung und Zusammenfassung

Der neurotrophe Faktor CNTF kann im Gegensatz zu GDNF in vivo bei *p_{mn}*-Mäusen den Beginn bzw. den Verlauf der Motoneurondegeneration hinauszuzögern (Sagot et al., 1998c; Sendtner et al., 1992). In dieser Arbeit konnte ferner gezeigt werden, dass CNTF einen direkten Effekt auf die Ausprägung der axonalen Pathologien hat (Kap. 5.4). Werden *p_{mn}*-mutierte Motoneurone in Gegenwart von CNTF kultiviert, so zeigen diese ein normales Auswachsen der Axone und das Auftreten von axonalen Schwellungen bleibt aus. Neben diesen Effekten auf die Morphologie der Motoneurone konnte in dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden, dass CNTF die bei *p_{mn}*-mutierten Motoneuronen vorhandene Störung des axonalen Transports behebt (Kap. 5.5.2).

Daraus ergibt sich die Frage, wie CNTF diese Effekte, insbesondere im Vergleich zu BDNF und GDNF, vermittelt. Um die Rolle des Signaltransduktors STAT3 bei der Vermittlung der CNTF-Effekte auf *p_{mn}*-mutierte Motoneurone zu untersuchen, wurden motoneuronspezifische STAT3-defiziente Tiere hergestellt und mit *p_{mn}*-Mäusen verkreuzt. Im Zellkultursystem zeigt sich, dass die CNTF-vermittelte Rettung der axonalen Pathologien nur in *p_{mn}*-mutierten Motoneuronen beobachtet werden kann, wenn diese eine Expression von STAT3 aufweisen. STAT3-defiziente *p_{mn}*-mutierte Motoneurone dagegen weisen die gleichen axonalen Pathologien in Gegenwart von CNTF auf, wie sie auch in Gegenwart von BDNF und GDNF beobachtet wurden.

5.6.2 Herstellung STAT3-defizienter *p_{mn}*-mutierter Motoneurone

Um die Wirkung von CNTF auf STAT3-defiziente *p_{mn}*-mutierte Motoneurone zu untersuchen, wurde eine mehrfach transgene Maus generiert, der folgende Mauslinien zugrunde lagen:

- A) ***P_{mn}*-Mauslinie** mit heterozygot vorliegendem mutiertem *tbce* Gen.
- B) **NFL-Cre Mauslinie** mit einer motoneuronspezifischen Expression der Cre-Rekombinase, wobei die Cre-Rekombinase unter dem Promotor von Neurofilament L (NFL), der etwa ab der zwölften Embryonalwoche aktiv ist, exprimiert wird (Schweizer et al., 2002).
- C) **STAT3^{flox}/STAT3^{flox} Mauslinie** aus dem Labor von S. Akira. Bei dieser Mauslinie liegt STAT3 homozygot gefloxt vor, d.h. beide Allele von STAT3 werden von LoxP Seiten flankiert. Diese dienen als Schnittstellen für die Cre-Rekombinase, wodurch die flankierte Genregion aus dem Genom ausgeschnitten werden kann (Chapman et al., 2000).
- D) **STAT3^{ko} / STAT3^{wt} Mauslinie**, bei der nur noch ein STAT3-Allel vorliegt.

Da homozygot STAT3-defiziente Mäuse embryonal letal sind (Takeda et al., 1997), wurden Mäuse generiert bei denen ein STAT3-Allel mutiert ist, das andere über das Cre-LoxP-System motoneuronspezifisch deletiert wird. Durch Herstellung von zwei geeigneten Zuchtlinien (STAT3^{flox}/STAT3^{flox}; wt/*p_{mn}* und STAT3^{ko}/STAT3^{wt}; NFL-Cre/NFL-Cre; wt/*p_{mn}*) konnten Embryonen generiert werden, die den gewünschten Phänotyp aufwiesen: STAT3^{ko}/STAT3^{flox}; NFL-Cre; *p_{mn}*/*p_{mn}*

Diese transgenen Mäuse wurden hinsichtlich ihres Überlebens mit STAT3-exprimierenden *pmn*-mutierten Tieren verglichen. Zudem wurden Motoneuronkulturen hergestellt und der Einfluss von CNTF auf die axonalen Pathologien untersucht.

5.6.3 Einfluss der motoneuronspezifischen STAT3-Defizienz auf den Krankheitsverlauf und die Überlebenszeit von *pmn*-mutierten Mäusen

Es ist bereits bekannt, dass eine motoneuronspezifische Deletion von STAT3 zu einem erhöhten Zelltod von Motoneuronen nach postnataler Nervenläsion, nicht jedoch zu Veränderungen der Embryonalentwicklung führt (Schweizer et al., 2002).

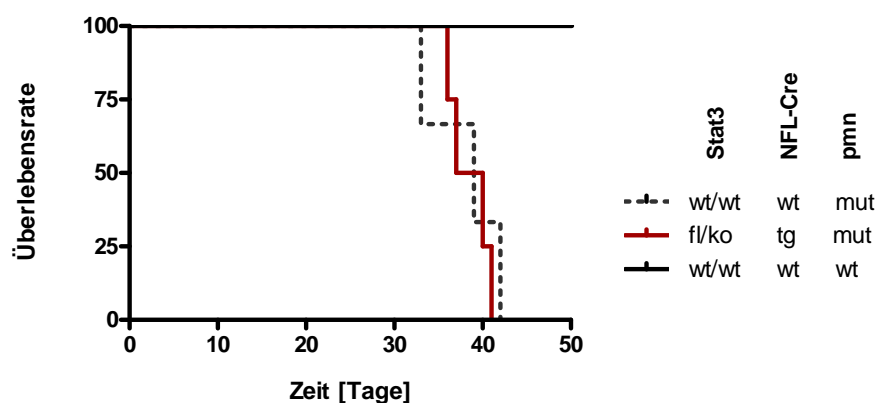


Abb. 5-24: Überlebenskurve von motoneuronspezifisch STAT3-defizienten *pmn*-mutierten Mäusen

Darstellung einer Kaplan-Meier-Überlebenskurve. Genotypen der verwendeten Mauslinien: (1) *Pmn*-Maus mit intakter STAT3-Expression $Stat3^{wt/wt}$, $NFL-Cre^{wt/wt}$, $pmn^{mut/mut}$ (gestrichelte schwarze Linie), (2) *Pmn*-Maus mit motoneuronspezifischer STAT3-Defizienz $Stat3^{lox/ko}$, $NFL-Cre^{tg/wt}$, $pmn^{mut/mut}$ (rote Linie), (3) Wildtyp-Maus mit intakter STAT3-Expression $Stat3^{wt/wt}$, $NFL-Cre^{wt/wt}$, $pmn^{wt/wt}$ (durchgezogene schwarze Linie)

Im Folgenden wurde die Auswirkung einer motoneuronspezifischen STAT3-Defizienz auf den Verlauf der fortschreitenden Motoneurondegeneration bei *pmn*-mutierten Mäusen untersucht. Die Abb. 5-24 zeigt die Überlebenskurven von motoneuronspezifisch STAT3-defizienten *pmn*-mutierten Mäusen ($fl/ko;tg;mut$) verglichen mit *pmn*-mutierten Mäusen mit intakter STAT3 Expression ($wt/wt;wt;mut$). Die *pmn*-mutierten Mäuse mit motoneuronspezifischer STAT3-Defizienz zeigen dabei keine Veränderungen hinsichtlich ihrer Überlebenszeit, es ist weder ein schnellerer Verlauf der Erkrankung auszumachen, noch überleben die Tiere länger als die Kontrollgruppe mit intakter STAT3-Expression.

5.6.4 Einfluss der motoneuronspezifischen STAT3-Defizienz auf das Axon- und Dendritenwachstum bei *pmn*-mutierten Motoneuronen

Aus der Arbeit von Schweizer et al. (2002) ist bekannt, dass auch isolierte STAT3-defiziente Motoneurone in Gegenwart von CNTF überleben können. Auch auf das Auswachsen von Axonen und Dendriten in mit CNTF kultivierten wildtypischen Motoneuronen hat eine STAT3-Defizienz keinen Einfluss (Abb. 5-25, schwarze Balken). Sowohl die Axone als auch die Dendriten zeigen in Gegenwart

von CNTF ein Längenwachstum, das mit dem von Motoneuronen vergleichbar ist, die in Gegenwart von BDNF kultiviert wurden.

Die *pmn*-mutierten Motoneurone mit STAT3 Expression (Abb. 5-25, weiße Balken), heterozygoter STAT3-Defizienz (Abb. 5-25, orange Balken) und homozygoter STAT3-Defizienz (Abb. 5-25, rote Balken) unterscheiden sich nicht hinsichtlich ihrer Axonlängen, wenn die Motoneurone in Gegenwart von BDNF kultiviert werden. Die Motoneurone aller drei *pmn*-mutierter transgener Mäuse zeigen die für *pmn*-mutierte Motoneurone deutliche Reduktion des Axonwachstums. Für das Dendritenwachstum in Gegenwart von BDNF sind keine statistisch signifikanten Unterschiede zum Dendritenwachstum wildtypischer Motoneurone auszumachen.

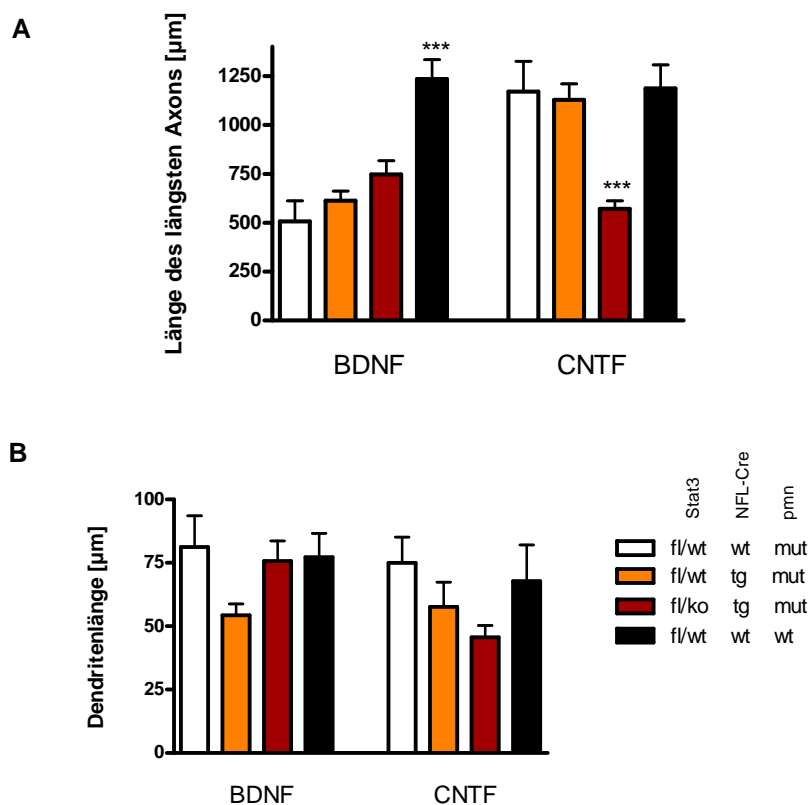


Abb. 5-25: Einfluss der STAT3-Defizienz auf Axon- und Dendritenlänge in *pmn*-mutierten Motoneuronen

Embryonale Motoneurone (E13, 7 DIV) wurden entweder mit BDNF (10 ng/ml) oder CNTF (10 ng/ml) kultiviert und anschließend die Axon- und Dendritenlänge ermittelt. Genotypen der verwendeten Mauslinien: (1) *Pmn*-Maus mit intakter STAT3-Expression $Stat3^{lox/wt}$, $NFL-Cre^{wt/wt}$, $pmn^{mut/mut}$ (weiß), (2) *Pmn*-Maus mit heterozygoter STAT3-Expression in Motoneuronen $Stat3^{lox/wt}$, $NFL-Cre^{tg/wt}$, $pmn^{mut/mut}$ (orange), (3) *Pmn*-Maus mit motoneuronspezifischer STAT3-Defizienz $Stat3^{lox/ko}$, $NFL-Cre^{tg/wt}$, $pmn^{mut/mut}$ (rot), (4) Wildtyp-Maus mit STAT3-Expression $Stat3^{lox/wt}$, $NFL-Cre^{wt/wt}$, $pmn^{wt/wt}$. Statistische Analyse erfolgte mittels ANOVA und Bonferroni post-hoc Test, *** $p < 0,001$.

Die STAT3- homozygot bzw. heterozygot exprimierenden *pmn*-mutierten Motoneurone zeigen den bekannten positiven CNTF-Effekt auf das Axonwachstum (Abb. 5-25, weiße bzw. orange Balken). Allerdings bleibt die Normalisierung der Axonlängen in den STAT3-defizienten Motoneuron aus (Abb. 5-25, rote Balken), die Axone zeigen die gleiche Reduktion der Axonlängen wie die mit BDNF kultivierten *pmn*-mutierten Motoneurone.

5.7 Reduktion der axonalen Pathologien durch Modulation der STAT3-Stathmin Interaktion

5.7.1 Zielsetzung und Zusammenfassung

Bislang ging man davon aus, dass der Signaltransduktor STAT3 ausschließlich über eine transkriptionale Aktivität im Zellkern wirkt und dadurch vielfältige biologische Prozesse in Gang setzt (Levy & Lee, 2002; Bromberg & Chen, 2001; Bromberg & Darnell, Jr., 2000). Über „Gain-of-Funktion“-Studien ist die Rolle von STAT3 als Onkogen bei der Zelltransformation belegt (Bromberg, 2002; Bromberg et al., 1999). Das onkogene Potential von STAT3 schreibt man dem positiven Einfluss auf die Zellproliferation und/oder dem Schutz vor Apoptose zu (Bromberg & Darnell, Jr., 2000). Allerdings könnte das Tumorwachstum auch durch den Einfluss von STAT3 auf die Zellmotilität und Zellmigration und damit auf die Tumordinvasion bewirkt werden (Silver et al., 2004; Sano et al., 1999). Durch Genexpressionsanalysen nach cytokinindizierter STAT3-Phosphorylierung sind eine Reihe von Genen bekannt, deren Transkription durch STAT3 verstärkt werden, darunter Cyclin D1, c-myc, Bcl-2 und Bcl-X_L (Turkson & Jove, 2000). Diese könnten die STAT3-vermittelte Tumorgenese durch Regulation des Zellzyklus und des Zellüberlebens erklären. Die Funktion von STAT3 bei der Regulation der Zellmigration ist derzeit nicht bekannt. Ebenso ist unklar, ob zytoplasmatisches STAT3, das einen Großteil der STAT3-Population in normalen Zellen ausmacht, unabhängig von der transkriptionellen Aktivität eine weitere Rolle spielt (Ng et al., 2006).

In einer Arbeit von Ng et. al (2006) wird die Interaktion von STAT3 mit dem ubiquitär exprimierten Phosphoprotein Stathmin vorgestellt. Die Ergebnisse der Arbeit legen nahe, dass STAT3 durch eine direkte, funktionelle Interaktion mit Stathmin im Zytoplasma die Mikrotubulidynamik moduliert und so einen Einfluss auf die Zellmigration ausübt.

Diese Arbeit war Anstoß dafür, die Rolle von Stathmin bei der CNTF-vermittelten Rettung der axonalen Pathologien bei *pnm*-mutierten Motoneuronen zu überprüfen. Mutiertes TBCE wirkt sich negativ auf die Assemblierung der Mikrotubuli aus, die Elongation der Mikrotubuli ist vermindert. Wenn eine Interaktion von STAT3 mit Stathmin dazu führt, dass weniger Stathmin für die Depolymerisation der Mikrotubuli zur Verfügung steht, so würde sich eine Störung bei der Assemblierung der Mikrotubuli weniger stark auswirken. Eine Reduktion von freiem Stathmin, das normalerweise zu einer Destabilisierung der Mikrotubuli führt, könnte auch durch eine Suppression der Stathmin Gen- bzw. Proteinexpression erreicht werden. Als ein einfaches Werkzeug für die Reduktion der Genexpression hat sich in diesem Zusammenhang das Verfahren der RNA-Interferenz erwiesen. Mittels lentiviralen Gentransfers wurde in kultivierte Motoneurone shRNA (short hairpin RNA) kodierende DNA eingebracht, welche die Stathmin Proteinexpression herunterreguliert. Der Nachweis der Reduktion der Stathmin Proteinexpression wurde mittels Western Blot und Immunfluoreszenz-Detektion erbracht. Die Anwendung im Zellkulturmodell mit *pnm*-mutierten Motoneuronen zeigte, dass eine Reduktion der Stathminexpression den gleichen Einfluss auf das Auswachsen der Axone hat, wie der Wachstumsfaktor CNTF.

5.7.2 Subzelluläre Lokalisation von Stathmin in Motoneuronen

Stathmin wird in kultivierten Motoneuronen endogen exprimiert und lässt sich mittels Immunfluoreszenz nachweisen. Die Abb. 5-26 zeigt die Lokalisation des Stathmin Proteins in sieben Tage alten kultivierten Motoneuronen im Zellsoma, im Axon und im Wachstumskegel.

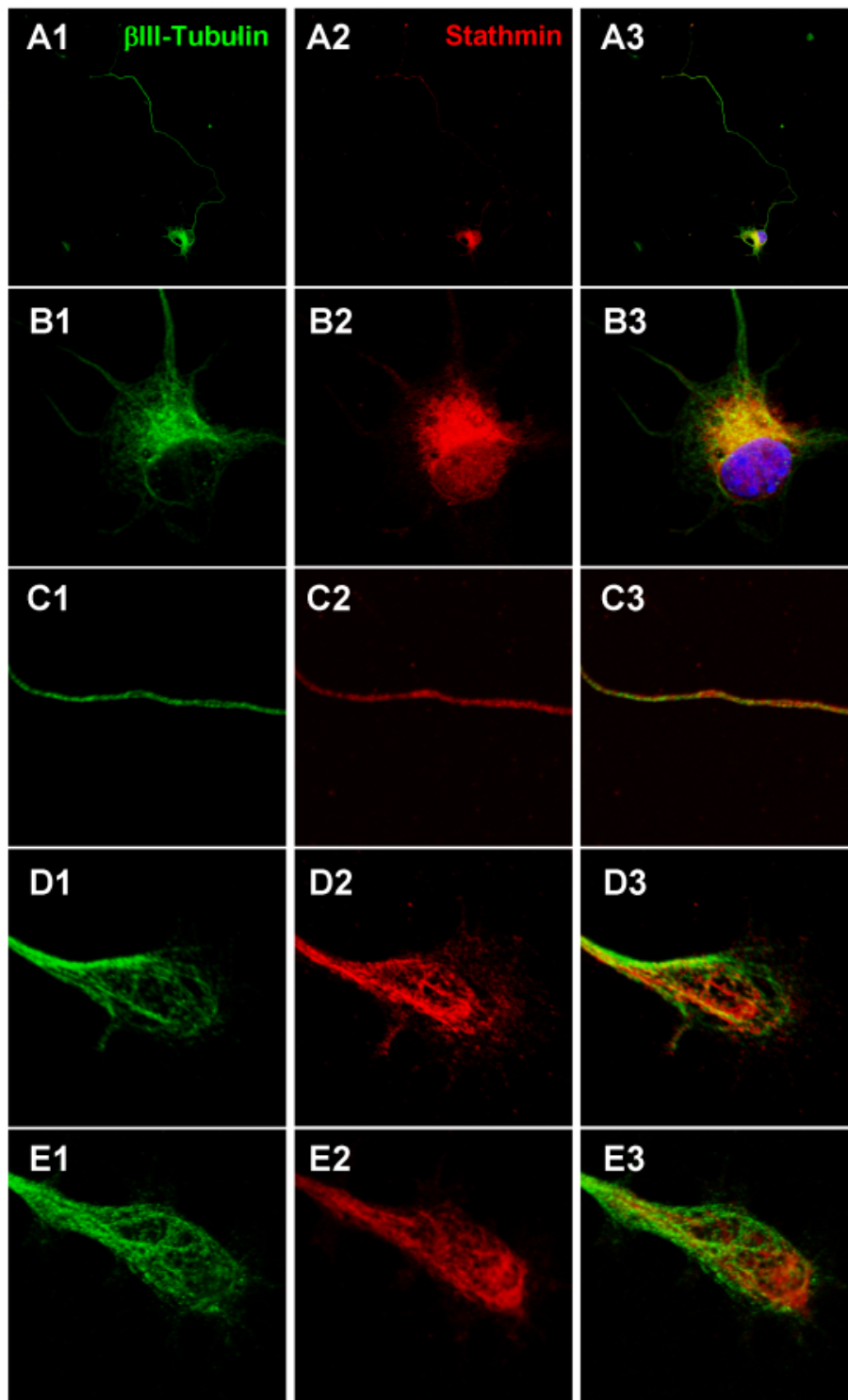


Abb. 5-26: Subzelluläre Lokalisation von Stathmin in kultivierten Motoneuronen

Darstellung von Stathmin (Alexa543, rot) und β III-Tubulin (Alexa488, grün) in kultivierten Motoneuronen (E13, 7 DIV) mittels Immunfluoreszenz. (A) Übersicht, (B) Zellsoma, (C) Axon, (D, E) Wachstumskegel.

5.7.3 Herstellung von lentiviraler shRNA zur gezielten Reduktion der Stathmin Proteinexpression

Wenn doppelsträngige RNA Moleküle (dsRNA), die größer als 19 Duplex-Nukleotide sind, in eine Säugerzelle eintreten, wird dort ein angeborener zellulärer Prozess in Gang gesetzt, der als RNA-Interferenz bezeichnet wird. Durch ihn wird nicht nur die eingedrungene dsRNA degradiert, sondern auch sequenzidentische einzelsträngige RNA-Moleküle, einschließlich der mRNA (Timmons et al., 2003). Als solches ist die Technologie der RNA-Interferenz nicht nur ein hervorragendes Werkzeug für funktionelle Genanalysen, sondern wird auch als potentielle therapeutische Methode zur gezielten Inaktivierung von Genen diskutiert.

Das System wurde ursprünglich unabhängig voneinander in verschiedenen Spezies, zuerst in *C. elegans* (Fire et al., 1998), beschrieben, ehe man die zugrundeliegenden Mechanismen auf bestimmten Ebenen der Prozesse als identisch identifizieren konnte: RNA-vermittelte Virus-Resistenz in Pflanzen (Lindbo & Dougherty, 1992), PTGS (posttranscriptional gene silencing) bei Pflanzen (Kasschau & Carrington, 1998) und RNA-Interferenz bei Eukaryonten basieren demnach auf gemeinsamen Elementen (Plasterk, 2002). Als zielerkennende dsRNA kann bei der RNA-Interferenz miRNA, siRNA oder shRNA wirken. Der Unterschied liegt in der Herkunft der kleinen RNAs. So wird miRNA in der Zelle auf eigenen pri-miRNA-Genen codiert, die siRNA hingegen entsteht aus längerer freier dsRNA, die z.B. von Transposons oder von Viren stammen. RNAi führt zur Spaltung, zur Translationsblockade der Ziel-mRNA oder zum Methylieren und Abschalten des entsprechenden Gens. Somit wird die Produktion spezifischer Proteine reduziert. Dies spielt in der Genregulation einer Zelle eine bedeutende Rolle, aber auch in der Abwehr von Viren (v.a. bei Pflanzen).

Der Einsatz von Lentiviren für die Überexpression von Genen in kultivierten Motoneuronen wurde bereits beschrieben (Bender et al., 2006). Ein ähnliches lentivirales System zum Gentransfer kann auch für die Herunterregulation einzelner Gene mittels RNA-Interferenz (RNAi) verwendet werden. Für die Regulation der Stathminexpression wurden shRNA kodierende lentivirale Plasmide generiert. Eine shRNA ist eine RNA-Sequenz, die eine feste Haarnadelstruktur bildet. Transkribiert wird die shRNA von der RNA Polymerase III.

Insgesamt wurden drei verschiedene Zielsequenzen im Stathmingen ermittelt (s. Anhang) und shRNA kodierende Lentiviren hergestellt. Dabei kam das Vektorsystem Lentilox (Lentilox pLL3.7 mit Helferplasmiden pRSV-REV, pMD.G, pMDLg/pRRE) zum Einsatz (Rubinson et al., 2003; Dull et al., 1998), bei dem sich die infizierten Zellen durch eine zusätzliche Expression von GFP nachweisen lassen. Alle drei lentiviralen Konstrukte wurden hinsichtlich ihrer Effizienz zur Reduktion der Stathminexpression in kultivierten Motoneuronen getestet. Hierbei erwies sich die Zielsequenz Nr. 3 (5'-GGTTAGAACTTAAAGTGT-3'), die im 3'UTR-Bereich des Stathmingens liegt, als besonders effizient. Die Abb. 5-27 (A) zeigt einen Western Blot mit Zellysaten von kultivierten Motoneuronen. In nicht-infizierten Motoneuronen ist eine deutliche Stathmin Proteinexpression nachweisbar. Motoneurone, die mit shRNA gegen Stathmin produzierenden Lentiviren infiziert wurden, zeigen keine Proteinexpression von Stathmin mehr. Als eine Kontrolle wurden die Motoneurone auch mit „mismatch“-shRNA produzierenden Lentiviren infiziert. Wie bei der spezifischen shRNA gegen Stathmin zeigt auch die shRNA Kontrolle eine deutliche GFP-Bande im Western Blot. Eine zu nicht-

infizierten Motoneuronen vergleichbare Stathminexpression ist auch bei der shRNA Kontrolle detektierbar.

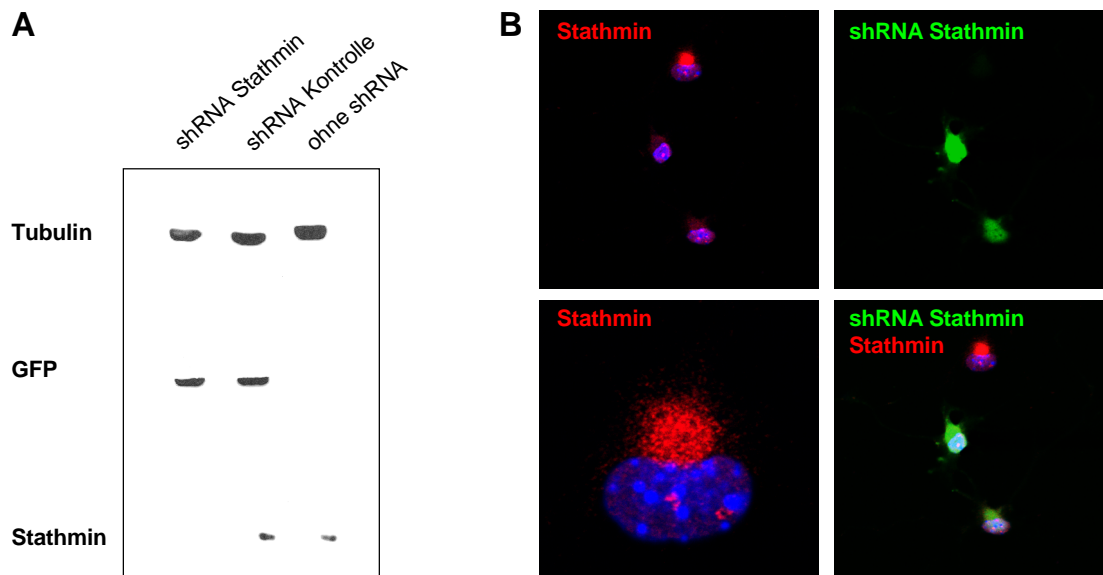


Abb. 5-27: shRNA zur Regulation der Stathmin Proteinexpression in Motoneuronen

(A) Nachweis der Herunterregulation der Stathmin-Proteinexpression mittels Western Blots. Dargestellt sind die Proteinbanden von β III-Tubulin, GFP und Stathmin. Verwendet wurden Zellysate von unbehandelten Motoneuronen (E13, 5 DIV) (ohne shRNA), sowie Motoneuronen, die shRNA exprimierten (shRNA Stathmin und shRNA mismatch Kontrolle). Der Kontrast des digitalen Bildes wurde mit Adobe Photoshop erhöht, ohne die Aussage zu verfälschen. (B) Immunfluoreszenz-Nachweis der Herunterregulation der Stathmin-Proteinexpression in Motoneuronen (E13, 7 DIV) mittels shRNA: Mit shRNA gegen Stathmin infizierte Zellen (grün), Stathmin (rot)

Die Abb. 5-27 (B) zeigt mittels Immunfluoreszenz den Nachweis der Stathminexpression (rot) in den kultivierten Motoneuronen. Motoneurone, die mit shRNA gegen Stathmin produzierenden Lentiviren infiziert wurden, sind an ihrer GFP-Expression zu erkennen (grün) und zeigen keine Immunreaktivität mehr für Stathmin.

Die hergestellten Lentiviren eignen sich daher sehr gut für den Einsatz zur Suppression der Stathminexpression in kultivierten Motoneuronen.

5.7.4 Einfluss der Stathmin Suppression auf das Axonwachstum TBCE-mutierter Motoneurone

Die getesteten Lentiviren wurden zur Suppression der Stathmin Proteinexpression in kultivierten Motoneuronen eingesetzt, um die Hypothese zu überprüfen, ob eine Reduktion von freiem Stathmin, das normalerweise zu einer Destabilisierung der Mikrotubuli führt, die axonale Pathologie der reduzierten Axonlängen in *pmn*-mutierten Motoneuronen rettet.

Die Motoneurone wurden direkt nach dem Ausplattieren infiziert und die Axonlängen nach sieben Tagen ermittelt. Wie die Auswertung in Abb. 5-28 zeigt, weisen die nicht-infizierten *pmn*-mutierten Motoneurone, die nur in Gegenwart von BDNF kultiviert wurden, die bereits beschriebenen reduzierten Axonlängen auf. Der Wachstumsfaktor CNTF führt dagegen zu einer Normalisierung des

Axonwachstums bei *pmn*-mutierten Motoneuronen. Interessanterweise wird der gleiche Effekt erreicht, wenn die *pmn*-mutierten Motoneurone in Gegenwart von BDNF kultiviert und mit shRNA gegen Stathmin produzierenden Lentiviren infiziert wurden. Die *pmn*-mutierten Motoneurone, die mit der shRNA Kontrolle behandelt wurden, weisen nach wie vor eine Reduktion der Axonlängen auf. Auf das Axonwachstum von wildtypischen Motoneuronen hat die Infektion mit shRNA gegen Stathmin produzierenden Lentiviren keinen Einfluss.

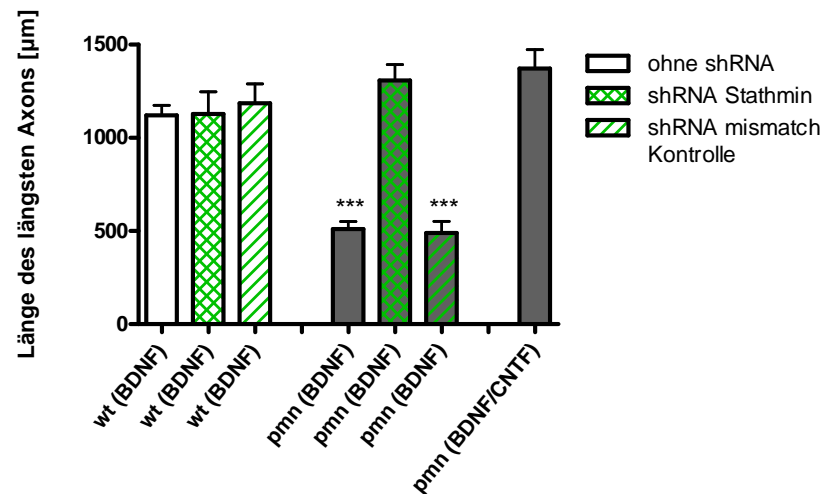


Abb. 5-28: Einfluss der Stathmin Suppression auf das Axonwachstum *pmn*-mutierter Motoneurone

Embryonale wildtypische (wt) und *pmn*-mutierte (*pmn*) Motoneurone (E13, 7 DIV) wurden in Gegenwart von BDNF (10 ng/ml) bzw. CNTF (10 ng/ml) kultiviert. Die Zellen wurden teilweise mit Lentiviren infiziert, um mittels shRNA die Stathmin-Expression zu regulieren. ANOVA-Analyse und Bonferroni post-hoc Test, *** $p < 0,001$.

6 Diskussion

6.1 Rolle von mutiertem TBCE bei der Pathogenese der *pmn*-Maus

Nach der Aufklärung des bei der *pmn*-Mausmutante zugrundeliegenden genetischen Defektes (Bommel et al., 2002; Martin et al., 2002) stellte sich die Frage, wie *pmn*-mutiertes TBCE an der Auslösung und dem Fortschreiten des Krankheitsverlaufes beteiligt ist. Im Gegensatz zu anderen Mausmodellen für Motoneuronerkrankungen, wie beispielsweise der Mausmutante mit einer humanen SOD1-Mutation, führt die Mutation im TBCE weder primär zu einer Aktivierung von Zelltodmechanismen, noch macht es die Zellen anfälliger für TNF α oder andere proapoptotische Stimuli, wie Glutamat oder p75-Aktivierung (Jablonka et al., 2004). Stattdessen ist das TBCE Protein an der Assemblierung von Mikrotubuli beteiligt (Tian et al., 1996; Tian et al., 1999). Doch warum ist die mitotische Spindel in sich teilenden Zellen nicht betroffen? Warum sind ausschließlich Motoneurone im Gegensatz zu anderen Neuronen mit ähnlich langen Neuriten von der Mutation im TBCE betroffen, obwohl TBCE ubiquitär exprimiert wird?

Es gibt Evidenzen dafür, dass das *pmn*-mutierte TBCE Protein eine geringere Stabilität als das wildtypische TBCE Protein aufweist (Martin et al., 2002). Dadurch stünde in der Zelle zu wenig TBCE Protein zur Verfügung und Zellen mit einem hohen Bedarf an Mikrotubulisyntese wären besonders stark betroffen. Eine weitere Hypothese ist, dass der durch die Mutation betroffene C-Terminus am subzellulären Transport oder der subzellulären Lokalisation des Proteins beteiligt ist. Wenn weniger TBCE in die Axone transportiert wird, dann könnte eine Situation eintreten, die eine normale Synthese von Mikrotubuli im Zellsoma, jedoch nicht in den Axonen zulässt (Jablonka et al., 2004).

6.1.1 Einfluss der *pmn*-Mutation auf die Stabilität des TBCE-Proteins

Um diese Fragen zu klären, wurde zunächst ein Antiserum gegen das TBCE-Protein generiert und charakterisiert (Abb. 5-1). Die Spezifität des Antiserums wurde durch Überexpression von HA-markiertem TBCE in HEK293T Zellen nachgewiesen. Ein Vergleich der Proteinexpressionsspiegel von TBCE im Rückenmark von vier Wochen alten Mäusen bestätigte die Hypothese von Martin et al. (2002), dass TBCE in seiner mutierten Form eine geringere Stabilität aufweist. Martin et al. zeigten dies durch Überexpression von wildtypischem und *pmn*-mutiertem FLAG-markiertem TBCE in COS-7 Zellen. Dieser Befund gibt jedoch keinen Beweis dafür, dass die reduzierten Mengen an TBCE tatsächlich für die motoneuronspezifische Erkrankung bei *pmn*-Mäusen verantwortlich sind. Ein solcher Beweis könnte nur geführt werden, wenn die Überexpression von wildtypischem TBCE den Phänotyp bei *pmn*-mutierten Motoneuronen kompensiert. Dazu ist es aber notwendig, entsprechende *in vitro* Assays zu entwickeln, mit denen diese Hypothese untersucht werden kann.

Wenn die Stabilität des *pmn*-mutierten TBCE-Proteins eine Rolle im Krankheitsverlauf bei *pmn*-Mäusen spielt und für die erstmals von Bömmel et al. (2002) beschriebenen axonalen Pathologien in isolierten Motoneuronen verantwortlich ist, müsste eine Überexpression von wildtypischem aber auch von *pmn*-mutiertem TBCE eine Rettung der axonalen Pathologien bewirken. In der Tat zeigten Experimente mit infizierten *pmn*-mutierten Motoneuronen, die wildtypisches TBCE überexprimieren,

dass dieses in der Lage ist, das reduzierte Längenwachstum der Axone zu kompensieren (Abb. 5-2). Die Überexpression von *pnm*-mutiertem TBCE in Motoneuronen aus *pnm*-Mäusen führt ebenfalls zu einer deutlichen Verlängerung der Axonlängen, diese erreichen jedoch nicht die Längen, wie sie bei Überexpression des wildtypischen TBCE-Proteins bzw. in wildtypischen Motoneuronen beobachtet werden (Abb. 5-2). Dies ist ebenfalls ein Hinweis darauf, dass die Expressionsspiegel von *pnm*-mutiertem TBCE selbst nach Überexpression nicht ausreichen, um die Motoneurone vollständig vor einem axonalen Defekt zu retten.

6.1.2 Einfluss der *pnm*-Mutation auf die Lokalisation des TBCE-Proteins

Unklar blieb bislang die Frage, ob die Mutation im TBCE-Protein zu einer anderen subzellulären Verteilung des Proteins in Motoneuronen führt. Die Immunfluoreszenz-Analysen von kultivierten embryonalen Motoneuronen zeigen, dass es keine Unterschiede in der Verteilung von TBCE gibt. Im Zellsoma der Motoneurone ist eine starke Immunreaktivität für TBCE in unmittelbarer Nähe zum Zellkern detektierbar, im Axon und Wachstumskegel ist im Gegensatz dazu eine geringere TBCE Proteinexpression nachweisbar (Abb. 5-3, Abb. 5-4). Die somatische Struktur konnte mit Co-Immunfluoreszenz-Analysen mit einem Antikörper gegen das Golgi-Matrix-Protein 130 als Golgi-Apparat identifiziert werden (Abb. 5-5), was darauf hindeutet, dass TBCE im Soma überwiegend im Golgi-Apparat lokalisiert ist. Der Golgi-Apparat spielt eine wichtige Rolle beim Sortieren der Vesikel. Veränderungen im Golgi könnten sich daher auf das Sortieren der Vesikel auswirken, sodass verschiedene Cargos in verschiedene Teile der Zellen unterschiedlich transportiert werden. Dies könnte zur Folge haben, dass Proteine oder Vesikel, die im Axon oder Wachstumskegel benötigt werden, dort nicht mehr ankommen und so einen axonalen Phänotyp auslösen könnten. Während für andere neurodegenerative Erkrankungen, wie ALS, Morbus Alzheimer, CJD und bei spinocerebellärer Ataxie Typ2, eine Fragmentierung des Golgi-Apparates beschrieben (Gonatas et al., 2006a) und auch beim Kenny-Caffey Syndrom, das durch eine Deletion im *Tbce* Gen hervorgerufen wird, Störungen im Golgi-Apparat beobachtet wurden (Chabin-Brion et al., 2001; Parvari et al., 2002), zeigen Studien zur Morphologie des Golgi-Apparates in wildtypischen und *pnm*-mutierten Motoneuronen keine Anzeichen auf eine Veränderung der Golgi-Morphologie (Abb. 5-6).

Eine starke TBCE-Immunreaktivität findet sich auch in den Centrosomen (Abb. 5-7). Die Centrosomen, auch als Mikrotubuli-organisierende Zentren (MTOC) bezeichnet, sind kleine perinukleäre Strukturen, die aus zwei Centriolen bestehen, die von einer Centrosomenmatrix umgeben werden. Diese Matrix besteht aus verschiedenen Proteinen, die beispielsweise für den Proteasom-Proteolytischen Signalweg, die Zellzykluskontrolle und die Bildung von Mikrotubuli notwendig sind (Diaz-Corrales et al., 2005). Das γ -Tubulin ist eine der Komponenten der Centrosomenmatrix und ist notwendig für die Struktur und Funktion der Centrosomen und unmittelbar an der Neubildung und Polarität von Mikrotubuli beteiligt.

Die Position des Centrosoms nach der letzten Zellteilung der Vorläuferzellen bestimmt die Position der Ausbildung neuer Axone (de Anda et al., 2005), was die Bedeutung der Centrosomen in Neuronen unterstreicht. Die Positionierung der Centrosomen selbst wird durch Cdc42 und mPar6 α moduliert (Solecki et al., 2006), wobei mPar6 α in den Centrosomen liegt und mPar6 α -vermittelte Signalwege die

Bewegung der Centrosomen steuern (Solecki et al., 2004). Neurone mit disorganisierten Centrosomen weisen eine Retraktion der Neuriten und eine Destabilisierung der Mikrotubuli auf (Diaz-Corrales et al., 2005). Ein komplettes Entfernen der Centrosomen, beschrieben als „chromophore-assisted light inactivation“ blockiert das Auswachsen von Axonen in kultivierten Neuronen von *Drosophila melanogaster* (de Anda et al., 2005; Knoblich, 2005). Allerdings bilden *Drosophila* Fliegen, die durch eine Mutation im centriolen-assoziierten DSas-4 Protein während der embryonalen Entwicklung ihre Centriolen verlieren, zwar keine Centrosomen, Zilien und Flagellen mehr aus, erscheinen sonst jedoch morphologisch unauffällig (Basto et al., 2006). Die Mutation im DAas-4 hat einerseits Auswirkungen auf die assymetrische Teilung von Neuroblasten, einer Voraussetzung für die Ausbildung der Polarität von Neuronen, das Gewebe mutierter Fliegen zeigt andererseits jedoch keine Veränderungen in der Verteilung von Neuronen, Neuroblasten und Axonen. Diese Befunde legen nahe, dass die in vivo Situation durch das Vorhandensein von externen Faktoren, wie beispielsweise der Basallamina oder durch umgebende Neurone und Gliagewebe, vielschichtiger ist, als die in vitro Situation. Ohne extrinsische Faktoren laufen nur intrinsische Mechanismen zur Polarisierung von Neuronen ab, bei denen das Centrosom eine entscheidende Rolle spielt (Zolessi et al., 2006).

Bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen finden sich Einschlusskörperchen, wie die Lewy-Körperchen bei Morbus Parkinson, mit Proteinaggregaten. Diese Einschlusskörperchen sind eng mit dem Aggresom und auch mit den Centrosomen assoziiert (Waelter et al., 2001; McNaught et al., 2002; Corcoran et al., 2004). Aggresome sind mikrotubuli-abhängige pericentriolare Einschlusskörperchen, die als allgemeine zelluläre Antwort auf eine große Menge falsch gefalteter oder aberranter Proteine angesehen werden (Johnston et al., 1998; Kopito, 2000). Diese nicht-degradierten Proteine finden sich zunächst zerstreut im Zytoplasma, werden dann retrograd entlang der Mikrotubuli zu den Centrosomen transportiert, wo sie große Einschlüsse von aggregierten, ubiquitinierten Proteinen bilden, die von Zytoskelettelementen umgeben werden (Johnston et al., 1998; Kopito, 2000; McNaught et al., 2002; Olanow et al., 2004).

6.1.3 Einfluss der *pnm*-Mutation auf das neuronale Zytoskelett

Es ist bekannt, dass neue Mikrotubuli am Centrosom gebildet und ins Soma abgegeben werden, von wo aus sie entlang bestehender, langer Mikrotubuli in die Axone transportiert werden, um das axonale Wachstum zu unterstützen (Ahmad & Baas, 1995). Da sich in den Centrosomen eine starke TBCE-Immunreaktivität findet, kann angenommen werden, dass sich eine gestörte Funktion dieses Chaperons bei der Assemblierung neuer Mikrotubuli gerade an dieser Stelle in der Zelle stark auf das axonale Zytoskelett auswirken könnte. In den letzten Jahren wurde die Theorie zum axonalen Mikrotubulitransport um die sog. „cut and run“ These von Peter W. Baas erweitert, wonach alle Mikrotubuli unabhängig von ihrer Länge transportiert werden können. Der Transport beschränkt sich jedoch auf die Kürzeren, da längere Mikrotubuli stärker mit anderen zellulären Strukturen vernetzt sind. Längere Mikrotubuli können jedoch durch Enzyme in kürzere Polymere zerlegt und somit wieder

mobilisiert werden, was eine schnelle Verfügbarkeit von Mikrotubulopolymeren beispielsweise an Orten axonalen Sproutings ermöglicht (Baas et al., 2006).

Martin et al. haben 2002 gezeigt, dass die Anzahl der Mikrotubuli im Nervus Phrenicus von erkrankten, zwei Wochen alten *pmn*-Mäusen um 20% reduziert ist. *Pmn*-Mäuse im Endstadium der Erkrankung weisen elektronenmikroskopisch keine Mikrotubuli mehr im Nervus Phrenicus auf, wobei Intermediärfilamente nach wie vor vorhanden sind. Zum gleichen Zeitpunkt der Erkrankung finden sich in 15-20% der Fasern im Nervus Ischiadicus noch Mikrotubuli, was damit erklärt wurde, dass überwiegend die motorischen Nervenfasern betroffen sind und sich daher im gemischten Nerven noch sensible Fasern mit Mikrotubuli finden. Im Nervus Phreniscus von eine Woche alten *pmn*-Mäusen finden sich noch keine Unterschiede in der Anzahl der Mikrotubuli verglichen mit Gewebe aus wildtypischen Mäusen. Um den Aufbau des axonalen Mikrotubuliskeletts in isolierten Motoneuronen zu untersuchen wurden elektronenmikroskopische Analysen angefertigt. Diese ermöglichten das Studium des axonalen Mikrotubuliskeletts zu einem extrem frühen Zeitraum, in dem noch keine Krankheitssymptome erkennbar sind. Als Ergebnis fand sich eine deutliche Reduktion der Mikrotubulianzahl im proximalen Axonabschnitt bei *pmn*-mutierten Motoneuronen verglichen mit wildtypischen Motoneuronen (Abb. 5-9), während die medialen und distalen Axonabschnitte keine Unterschiede aufweisen. Axonale Mikrotubuli weisen im Gegensatz zu dendritischen Mikrotubuli eine polare Orientierung auf, mit einem distalen Plus-Ende und einem proximalen Minus-Ende (Baas et al., 1988). Wenn nun die Polymerisation am Plus-Ende durch eine reduzierte Anzahl an Mikrotubuli-Polymeren in Folge eines *pmn*-mutierten TBCE-Proteins zeitlich beeinträchtigt ist, die Depolymerisation am Minus-Ende aber weiterhin unvermindert abläuft, entsteht ein Ungleichgewicht in der dynamischen Instabilität der Mikrotubuli, das eine proximale Reduktion der Mikrotubulidichte zur Folge hat.

Die weitere elektronenmikroskopische Analyse ergab, dass parallel zur Reduktion der proximalen Mikrotubulidichte die Anzahl an Neurofilamenten in allen Axonabschnitten deutlich erhöht ist. Derartige Kompensationsmechanismen, bzw. ein Gleichgewicht aus Mikrotubuli und Neurofilamenten in Axonen, sind bereits beschrieben worden (Julien & Kriz, 2006; Zhu et al., 1998). Neurofilamente gehören wie α -Internexin zu den Typ IV Intermediärfilamenten. Während der embryonalen Neurogenese werden die NFL- (Neurofilament light, 61 kDa) und NFM- (Neurofilament medium, 90 kDa) Untereinheiten co-exprimiert, während die Expression von NFH (Neurofilament heavy, 115 kDa) erst verzögert in der postnatalen Periode aktiviert wird (Julien, 1999). Die Neurofilament-Untereinheiten assemblieren zu 10 nm dicken Filamenten und werden axonal mit einer Geschwindigkeit von 0,2-1 mm pro Tag transportiert (Lariviere & Julien, 2004). Diese Transportrate entspricht dem langsamen axonalen Transport, im Gegensatz zur Transportrate von Organellen oder bestimmten Vesikeln, die mit einer Geschwindigkeit von 200-400 mm pro Tag transportiert werden können. Für die abnormale Akkumulation von Neurofilamenten, wie sie bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen (ALS, Demenz mit Lewy-Körperchen, Morbus Parkinson, Neuropathien) beobachtet werden, gibt es unterschiedliche Hypothesen, wie eine Deregulation der Neurofilament-Synthese, einer Störung im axonalen Transport, eine abnormale Phosphorylierung oder Proteolyse (Lariviere & Julien, 2004). Abnormale Neurofilament-Akkumulationen treten demnach nicht

nur als Folge einer neuronalen Dysfunktion auf, sondern können selbst Ursache oder Auslöser einer Neurodegeneration sein. Es ist beispielsweise bekannt, dass die Überexpression der Neurofilamente zu einer Disorganisation der neuronalen Intermediärfilamente führt, was eine Neurodegeneration auslösen kann (Lariviere & Julien, 2004). Zudem sind einige ALS-Fälle mit Mutationen in Neurofilament-Genen assoziiert (Lariviere & Julien, 2004). Studien an transgenen Mäusen zeigen darüberhinaus, dass ein Knock-out von NFL (Δ NFL) oder NFM (Δ NFM) jeweils zu einer signifikanten Reduktion des Axondurchmessers (>50%) führt und mit einer Erhöhung der Mikrotubulidichte einhergeht (Zhu et al., 1997; Elder et al., 1998a). Bei Δ NFL oder Δ NFM/NFH kommt es zu einem Verlust aller 10 nm Intermediärfilamente. Durch das Fehlen der Intermediärfilamente ist Axondurchmesser dadurch kaum betroffen (10-20% Reduktion), da im Falle eines NFH-Knock outs ein zweifacher Anstieg der Mikrotubulidichte, im Falle eines Doppelknock outs von NFM und NFH sogar ein dreifacher Anstieg der Mikrotubulidichte (>50% Reduktion der Axondurchmesser) zu verzeichnen ist (Zhu et al., 1997; Elder et al., 1998b; Elder et al., 1998a; Jacomy et al., 1999). Interessanterweise zeigt keine dieser transgenen Mäuse einen offenkundigen Phänotyp oder größere Entwicklungsdefekte, was darauf hindeutet, dass Neurofilamente nicht essentiell für die Neurogenese und das axonale Wachstum zu sein scheinen (Julien, 1999). Dennoch sind gerade die Befunde, dass Δ NFL, Δ NFH und Δ NFM/NFH zu einer Umorganisation des neuronalen Zytoskeletts mit einem Anstieg der Mikrotubuli führt, bemerkenswert. Der Anstieg der Mikrotubulidichte wird auf eine Erhöhung der β III-Tubulin mRNA-Expression und eine veränderte Mikrotubulidynamik zurückgeführt (Julien, 1999).

6.1.4 Einfluss der *pnm*-Mutation auf TBCE-Proteininteraktionen

Neben der Stabilität und der Lokalisation des Proteins könnte eine weitere Erklärung für die Effekte des *pnm*-mutierten TBCE Proteins auch eine geänderte Interaktion mit anderen Proteinen sein. TBCE ist an der Bildung eines Tubulin-Cofaktor-Superkomplexes, bestehend aus den Cofaktoren C, D und E, sowie den α - und β -Tubulin Monomeren, beteiligt. Eine GTP-Hydrolyse durch β -Tubulin in diesem Komplex führt schließlich zur Bildung der Tubulin-Heterodimere (Cowan & Lewis, 1999). Durch den Aminosäureaustausch am C-Terminus könnte daher auch primär die Funktion des Proteins eingeschränkt sein oder auch mögliche Ansatzpunkte für intrazelluläre Signale zur Aktivierung des Chaperons gestört sein. Diese Hypothese wurde in der vorliegenden Arbeit nicht näher untersucht. Durch die in den letzten Monaten in unserem Labor entwickelte Möglichkeit, aus embryonalen Stammzellen Motoneurone auszdifferenzieren, können nun große Mengen an TBCE-Protein gewonnen werden. Somit könnte man in weiteren proteinbiochemischen Experimenten den Tubulin-Cofaktor-Superkomplex aus wildtypischen Motoneuronen aufreinigen und mit dem aus *pnm*-mutierten Motoneuronen vergleichen.

6.2 Einfluss von mutiertem TBCE auf den axonalen Transport

Die vorliegende Arbeit sollte die zentrale Frage klären, ob die bei *pnm*-Mäusen gefundene Mutation im Tubulin-spezifischen Chaperon E, das an der Assemblierung der Mikrotubuli beteiligt ist, mit einer

Störung des axonalen, mikrotubuliabhängigen Transports verbunden ist. Es ist bekannt, dass eine transgene Expression des anti-apoptotischen *bcl-2* in *pmn*-Mutanten, oder eine Behandlung der *pmn*-Mäuse mit dem neurotrophen Faktor GDNF, die Motoneuronenzellkörper vor Apoptose schützt (Ferri et al., 2003; Sagot et al., 1995a). Einen Einfluss auf den Krankheitsverlauf und die Lebensdauer hat dies jedoch nicht. Dass dagegen die Aufrechterhaltung der Axone beim Krankheitsverlauf der *pmn*-Mäuse eine wichtige Rolle spielt, zeigen Experimente, bei denen *pmn*-Mäuse mit *Wlds*- („slow Wallerian degeneration“) Mutanten verkreuzt wurden (Ferri et al., 2003; Jablonka et al., 2004). Die dominante *Wlds*-Mutation verzögert bekanntlich die axonale Degeneration und den Verlust von Synapsen. Werden die *pmn*-Mutanten mit den *Wlds*-Mutanten verkreuzt, treten eine Reihe von Effekten auf: die Symptome werden deutlich gelindert, die Lebenszeit erhöht, die axonale Degeneration ist verzögert und die Motoneurone in ihrer Anzahl und Größe gerettet (Ferri et al., 2003). Zudem gibt es Hinweise darauf, dass als ein frühes Anzeichen im Krankheitsverlauf von *pmn*-Mäusen eine Störung im retrograden Transport auftritt (Sagot et al., 1998c).

Für den schnellen anterograden und retrograden Transport in Axonen sind Mikrotubuli notwendig. Ist deren Assemblierung gestört, könnte dies Defizite im axonalen Transport nach sich ziehen. Um den mikrotubuliabhängigen Transport in isolierten Motoneuronen zu untersuchen, wurden die Mitochondrien mit Rhodamin 123 angefärbt und deren axonaler Transport analysiert. Der Farbstoff Rhodamin 123 ist ein zellpermeabler, kationischer Fluoreszenzfarbstoff, der für die Motoneurone nicht toxisch ist und sich auch auf den axonalen Transport der Mitochondrien nicht auswirkt (Johnson et al., 1980; Takenaka et al., 1990). Der axonale Transport von Mitochondrien ist saltatorisch und bidirektional (Hollenbeck & Saxton, 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der stationären Mitochondrien in *pmn*-mutierten Motoneuronen, die in Gegenwart von BDNF kultiviert werden, gegenüber wildtypischen Motoneuronen signifikant erhöht ist. Dagegen ist die Anzahl stationärer Mitochondrien in *pmn*-mutierten Motoneuronen, die in Gegenwart von CNTF kultiviert wurden, vergleichbar mit der von wildtypischen Motoneuronen. Auch die Anzahl der anterograd und retrograd transportierten Mitochondrien unterscheidet sich in *pmn*-mutierten Motoneuronen, die mit BDNF kultiviert wurden, von der in wildtypischen Motoneuronen. In beiden Transportrichtungen werden deutlich weniger Mitochondrien pro Zeiteinheit transportiert. Interessanterweise ist beim anterograden Transport der Mitochondrien in *pmn*-mutierten Motoneuronen, die mit BDNF kultiviert werden, die maximale Transportgeschwindigkeit reduziert. Diese Befunde lassen sich mit einem gestörten Aufbau der axonalen Mikrotubuli in Folge einer defizitären Assemblierung der Mikrotubuli durch das mutierte TBCE erklären.

Um auszuschließen, dass die Mitochondrien selbst durch den Krankheitsverlauf betroffen sind und wegen eines gestörten mitochondrialen Membranpotentials nicht mehr ordentlich axonal transportiert werden, wurden mittels geeigneter Farbstoffe Potentialmessungen an den Mitochondrien durchgeführt. Durch den kombinierten Einsatz von zwei Mitochondrienfarbstoffen, MitoTracker Green und MitoFluor Red594, war es möglich, Mitochondrien mit einem hohen Membranpotential von Mitochondrien mit niedrigem Membranpotential zu unterscheiden und gleichzeitig den axonalen Transport zu analysieren (Abb. 5-20, Abb. 5-21). Es zeigte sich, dass das mitochondriale Membranpotential bei *pmn*-mutierten Motoneuronen keine Unterschiede zu wildtypischen Motoneuronen aufweist und nicht beeinträchtigt ist. Dies war auch nicht zu erwarten, da die Mutation

im TBCE primär keinen Einfluss auf die Mitochondrien ausüben sollte. Nun kann jedoch ausgeschlossen werden, dass mitochondriale Defekte weder als Ursache für die axonalen Pathologien und die funktionellen Störungen des axonalen Transports in Frage komme, noch dass zu diesem Zeitpunkt der Erkrankung durch diese Störungen sekundär die Mitochondrien beeinflusst werden.

6.3 Rolle von STAT3 bei der Modulation der axonalen Pathologien von *pnm*-mutierten Motoneuronen

6.3.1 Differentielle Wirkungen von CNTF im Vergleich zu BDNF und GDNF auf die pathologischen Veränderungen an *pnm*-mutierten Motoneuronen

In dieser Arbeit sollte die Frage geklärt werden, ob differentielle Wirkungen verschiedener neurotropher Faktoren, wie sie aus in vivo Experimenten bekannt sind, auch bei isolierten *pnm*-mutierten Motoneuronen nachweisbar sind. Es war bekannt, dass unterschiedliche neurotrophe Faktoren die Symptome in verschiedenen Mausmodellen für Motoneuronenerkrankungen lindern können (Sagot et al., 1997). Der neurotrophe Faktor GDNF beispielsweise zeigt nach einer Axotomie bei neugeborenen Mäusen einen hochpotenten Einfluss auf den Schutz der Motoneurone vor Zelltod (Henderson et al., 1994; Oppenheim et al., 1995; Yan et al., 1995). Die Behandlung von *pnm*-Mäusen mit dem neurotrophen Faktor GDNF führt indes nicht zu einer Verbesserung des Krankheitsbildes (Sagot et al., 1996), sondern nur zu einem verbesserten Überleben der Motoneuronenzellkörper, ohne dass dies einen Einfluss auf die Aufrechterhaltung von Axonen bzw. der Innervation der Muskulatur zeigt. In der Folge kommt es bei diesen Mäusen trotz verbesserten Überlebens der Motoneuronenzellkörper weiterhin zur Erkrankung. Dagegen verbessern die neurotrophen Faktoren CNTF und NT-3 die Überlebensrate von *pnm*-Mäusen und reduzieren den Verlust von myelinisierten Axonen im Nervus Phrenicus (Haase et al., 1997; Sagot et al., 1995b; Sendtner et al., 1992). Die in vivo Experimente legen nahe, dass es zwei intrazelluläre Signalwege geben könnte, einen, der für das Überleben der Motoneuronenzellkörper notwendig ist und einen zweiten, der die Aufrechterhaltung der Axone vermittelt (Sagot et al., 1998c). Um dies zu untersuchen, wurden isolierte Motoneurone von *pnm*-Mäusen mit den neurotrophen Faktoren CNTF, BDNF und GDNF behandelt. Diese Faktoren wurden gewählt, da sie aus drei unterschiedlichen Familien der neurotrophen Faktoren stammen:

1. Neurotrophine (Barbacid et al., 1991; Barbacid, 1994):

Zu ihnen zählen der Nervenwachstumsfaktor NGF, BDNF, NT-3 und NT-4/5. Die vier Neurotrophine haben jeweils einen spezifischen Rezeptor der Tyrosinkinase-Rezeptorfamilie (TrkA für NGF, TrkB für BDNF und NT-4/5, TrkC für NT-3), können jedoch auch mit vergleichsweise geringer Affinität an den p75 Neurotrophin Rezeptor (p75NTR), ein Rezeptor der TNF-Rezeptor Familie, binden.

2. TGF- β Superfamilie:

Die TGFs (transforming growth factors) werden in drei Superfamilien (TGF- α , TGF- β , BMP) eingeteilt. Die TGF- β -Polypeptide sind multifunktional. Sie sind fähig, die Zellproliferation, Zelldifferenzierung und

andere Funktionen in einem weiten Spektrum verschiedener Zellen zu beeinflussen. Der neurotrophe Faktor GDNF wird der TGF- β Superfamilie zugerechnet (Lindsay & Yancopoulos, 1996). Der Rezeptorkomplex für GDNF besteht aus einem Signalmolekül, der Rezeptortyrosinkinase RET und einem membrangebundenen Co-Rezeptor, dem GDNF-Familien Rezeptor α (GFR α).

3. Neurozytokine:

CNTF wird den Neurozytokinen zugerechnet (Ip & Yancopoulos, 1996), da es mit zahlreichen entfernt verwandten Zytokinen, wie LIF und Interleukin-6, Rezeptorkomponenten teilt. Diese Zytokine können die Wirkung von CNTF auf Neurone in einigen Fällen nachahmen (Holtmann et al., 2005; Ip & Yancopoulos, 1996).

Wie die Abb. 5-12 zeigt, beeinflusst CNTF differentiell die spezifischen axonalen Veränderungen an *pnn*-mutierten Motoneuronen: Im Gegensatz zu BDNF und GDNF ist bei CNTF-behandelten Kulturen das Auftreten axonaler Schwellungen reduziert und eine deutliche Kompensation des reduzierten Axonwachstums erkennbar. CNTF hat nicht nur einen Einfluss auf die Morphologie isolierter Motoneurone, sondern auch auf den axonalen Transport. Während bei BDNF-behandelten *pnn*-mutierten Motoneuronen eine Störung des axonalen Transports der Mitochondrien beobachtet werden konnte, kompensiert CNTF diese Defizite (Abb. 5-16, Abb. 5-17, Abb. 5-18). Damit konnte erstmals gezeigt werden, dass die in vivo beobachteten Effekte von CNTF bei *pnn*-Mäusen (Haase et al., 1997; Sagot et al., 1995b; Sendtner et al., 1992) auf eine direkte Wirkung des CNTF auf die Motoneurone zurückzuführen ist. Dies stützt die von Sagot et al. 1998 aufgestellte These, dass eine Störung des axonalen Transports Ursache oder zumindest eine frühe Manifestation der Motoneuronerkrankung bei *pnn*-Mäusen ist, und dass CNTF über eine Wiederherstellung bzw. Aufrechterhaltung des axonalen Transports den Krankheitsverlauf verzögert.

CNTF unterscheidet sich von anderen neurotrophen Faktoren, wie NGF, BDNF, NT-3 und GDNF, zum einen durch seine molekulare Charakteristik (CNTF ist mehr ein zytosolisches, als ein sekretorisches Molekül) und sein deutliches Spektrum an biologischer Aktivität (Sendtner et al., 1991). CNTF wird selektiv von Schwannzellen und Astrozyten im peripheren bzw. zentralen Nervensystem exprimiert, jedoch nicht vom Zielgewebe der unterschiedlichen CNTF-beeinflussbaren Neurone (Sendtner et al., 1991).

6.3.2 STAT3 vermittelt die CNTF Effekte

Der Nachweis, dass CNTF einen direkten Einfluss auf die Morphologie und den axonalen Transport von Motoneuronen hat, warf die Frage auf, welche Signalwege diese Effekte vermitteln. Die Abb. 6-1 gibt einen Überblick über die CNTF-vermittelten Signalwege. Ein trimere Rezeptorkomplex aus CNTFR α , LIFR β und gp130 ist für die Aufnahme des CNTF-Signals in die Zelle verantwortlich. Im Gegensatz zu den Rezeptoren für Neurotrophine sind diese Moleküle keine klassischen Tyrosinkinase-Rezeptoren, sondern assoziieren mit zytoplasmatischen Tyrosinkinasen der Jak/Tyk-Familie (Sleman et al., 2000).

Im Rahmen einer Promotionsarbeit, die Saskia Pasedag am Institut für Klinische Neurobiologie begonnen hat, wurde die subzelluläre Verteilung von Rezeptoren bzw. Signalmediatoren für CNTF, BDNF und GDNF verglichen. Tatsächlich finden sich signifikante Unterschiede in der Verteilung von Trk-B, Ret und gp130/STAT-3. Während insbesondere Komponenten des CNTF-Rezeptors in Axonen und Zellkörpern nachweisbar sind, ist der GDNF-Rezeptor vor allem in Zellkörpern und Dendriten, aber praktisch nicht in Axonen nachweisbar. Auch im Fall von Trk-B ist die Immunreaktivität entlang des Axons im Vergleich zum Zellkörper und Dendriten relativ gering, wenn es auch eine spezifische Akkumulation im Wachstumskegel gibt. In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Moses Chao (New York) wurden daraufhin phosphospezifische Antikörper für Trk-B entwickelt und getestet. So konnte die spezifische Aktivierung von Trk-B nach Zugabe von BDNF mit der Aktivierung von Ret (kommerzielle phospho-Ret-Antikörper) und der Aktivierung von CNTF-Rezeptorkomplexen (phospho-STAT-3-Antikörper) verglichen werden. Nach Zugabe von BDNF (kontinuierlich bzw. Puls von 10 Minuten) kommt es insbesondere zu einer Phosphorylierung von Trk-B in Axonterminalen, nach Zugabe von GDNF findet man praktisch ausschließlich eine Aktivierung in Dendriten und im Zellkörper, und nach Zugabe von CNTF findet man eine starke STAT-3-Phosphorylierung insbesondere entlang des Axons. So könnte die Verteilung der Rezeptoren bzw. Signalmediatoren in Axon, Zellkörper und Dendriten der Motoneuronen zumindest für die spezifische Wirkung von CNTF auf die Axonaufrechterhaltung bzw. die Normalisierung spezifischer axonaler Pathologien in *pnm*-mutierten Motoneuronen eine Rolle spielen.

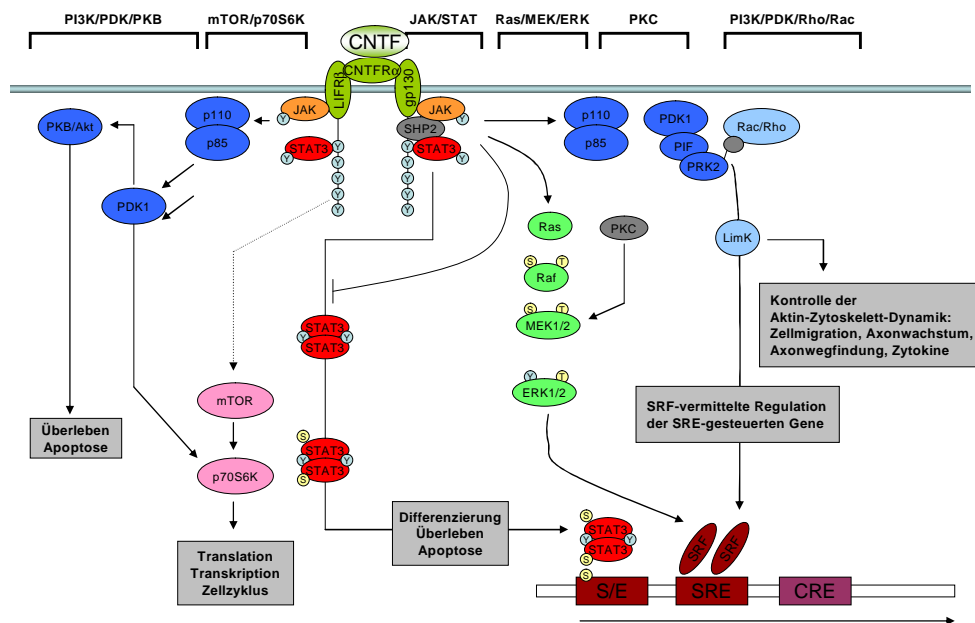


Abb. 6-1: CNTF-vermittelte Signalwege (Reeves, 2007)

Ein wesentlicher Signalweg, der selektiv von den Mitgliedern der CNTF-Familie aktiviert wird, ist der STAT3-Signalweg. Bereits früher konnte gezeigt werden, dass die Deletion von STAT3 das Überleben von Motoneuronen während der Embryonalentwicklung nicht beeinflusst (Schweizer et al., 2002). Allerdings fand sich bei den Mäusen mit motoneuronspezifischer Deletion von STAT3 postnatal eine

erheblich gesteigerte Vulnerabilität nach einer Nervenläsion (Schweizer et al., 2002). Dieser Effekt korrelierte mit einer reduzierten Hochregulation von Reg-2 und Bcl-xl. Reg-2 spielt als autokrin wirkender Faktor eine Rolle bei der Vermittlung der Überlebenswirkung von Faktoren der CNTF-Familie (Nishimune et al., 2000; Schweizer et al., 2002).

Um die Frage zu klären, ob STAT3 die CNTF-vermittelten Effekte bei *pmn*-mutierten Motoneuronen hervorruft, wurden die *pmn*-Mäuse mit einer bereits charakterisierten, motoneuronspezifischen STAT3-defizienten Mauslinie (Schweizer et al., 2002) verkreuzt. Werden die *pmn*-mutierten Motoneurone mit einer STAT3-Defizienz in Gegenwart von CNTF kultiviert, so unterscheiden sie sich nicht von *pmn*-mutierten Motoneuronen, die mit BDNF oder GDNF kultiviert werden: Das Längenwachstum der Axone ist nach sieben Tagen in Kultur deutlich reduziert (Abb. 5-25). Eine Kompensation des Längenwachstums, wie bei STAT3-exprimierenden *pmn*-mutierten Motoneuronen beobachtet, bleibt aus. Dies legt nahe, dass die Effekte von CNTF auf die Morphologie von *pmn*-mutierten Motoneuronen durch STAT3 vermittelt werden.

Interessanterweise hat die STAT3-Defizienz keinen Einfluss auf den Krankheitsverlauf der *pmn*-Mäuse (Abb. 5-24). Man hätte annehmen können, dass STAT3-defiziente *pmn*-Mäuse einen stärkeren Krankheitsverlauf zeigen, da eine CNTF-Applikation den Krankheitsverlauf von *pmn*-Mäusen verzögert (Haase et al., 1997; Sagot et al., 1995b; Sendtner et al., 1992). Allerdings wird CNTF endogen weder embryonal noch direkt nach der Geburt von Schwanzzellen exprimiert. Erst ab der zweiten postnatalen Woche lässt sich eine 30%ige Hochregulation der CNTF-Expression im Nervus Ischiadicus nachweisen (Sendtner et al., 1991; Ito et al., 2006). Offenbar hat diese späte CNTF-Expression in Schwanzzellen keinen Einfluss mehr auf den Krankheitsverlauf der *pmn*-Mäuse, oder aber die endogenen CNTF-Spiegel reichen auch dann nicht aus, um den Krankheitsverlauf zu verzögern. Um diese Frage zu klären, müsste man die 1992 an *pmn*-Mäusen durchgeführten in vivo Experimente mit den STAT3-defizienten *pmn*-Mäusen wiederholen. Wenn die Effekte der CNTF-behandelten *pmn*-Mäuse über STAT3 vermittelt werden, würde man bei CNTF-behandelten STAT3-defizienten *pmn*-Mäusen keinen positiven Einfluss von CNTF auf den Krankheitsverlauf erwarten.

6.3.3 Lokale Wirkung von STAT3 durch Interaktion mit Stathmin

Abschließend sollte geklärt werden, wie eine Aktivierung von STAT3 durch CNTF zu einer Rettung der axonalen Pathologien und einer Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung des axonalen Transports in *pmn*-mutierten Motoneuronen führt.

Neben einer transkriptionellen Aktivität im Zellkern wurde 2006 erstmals eine nicht-transkriptionelle Wirkung von STAT3 im Zytoplasma gezeigt. Die Ergebnisse von Ng et al. legen nahe, dass STAT3 durch eine direkte, funktionelle Interaktion mit dem Phosphoprotein Stathmin die Mikrotubulidynamik im Zytoplasma modulieren kann. Für Stathmin selbst war die Beeinflussung der Mikrotubulidynamik bekannt (Curmi et al., 1999): Stathmin interagiert direkt mit löslichem Tubulin, was zur Formation von Tubulin-Stathmin Komplexen führt, bei denen jeweils zwei Tubulin Monomere bzw. ein Tubulindimer an ein Stathmin Molekül gebunden vorliegen. Die Bindung von freiem Tubulin verhindert so die Formation neuer Mikrotubuli. Ng et al. zeigen, dass die durch eine Bindung von STAT3 an Stathmin dessen Fähigkeit Tubulin zu binden reduziert wird. Steht mehr Tubulin zur Polymerisation zur

Verfügung, können auch mehr Mikrotubuli assembliert werden. Mikrotubuli sind auch einer Depolymerisation unterworfen. In regelmäßigen Abständen kommt es zur sog. „Katastrophe“, d.h. die Depolymerisationsreaktion wird schneller als die Polymerisationsreaktion und die Mikrotubuli fallen in sich zusammen. Es wird angenommen, dass Stathmin auch die „Katastrophe-Rate“ am Plus-Ende der Mikrotubuli erhöht (Belmont & Mitchison, 1996). Über seinen Einfluss auf die dynamische Instabilität der Mikrotubuli ist Stathmin an Differenzierungsprozessen beteiligt. So ist die Expression von Stathmin beispielsweise essentiell für die NGF-stimulierte Differenzierung von PC12 Zellen (Di Paolo et al., 1996).

Bei *pnm*-Mäusen wird durch die Mutation im Tubulin-spezifischen Chaperon E eine Störung der Assemblierung der Mikrotubuli angenommen. Das Gleichgewicht der dynamischen Instabilität ist vermutlich zu Gunsten der Depolymerisation der Mikrotubuli verschoben. Würde man die Menge an freiem Tubulin erhöhen, bzw. die „Katastrophe-Rate“ senken, könnte man das Gleichgewicht in Richtung Polymerisation verschieben und so die Defizite in der Assemblierung der Mikrotubuli ausgleichen. Dies könnte dadurch erreicht werden, dass nach Interaktion von STAT3 mit Stathmin weniger freies Stathmin für die Bindung von Tubulin zur Verfügung steht, da STAT3 am C-Terminus von Stathmin bindet, der auch als Bindestelle für Tubulin angenommen wird (Ng et al., 2006). Embryonische Δ STAT3-Fibroblasten weisen ein zerrissenes Mikrotubuli-Netzwerk mit einem niedrigeren Spiegel an polymerisiertem und azetyliertem Tubulin auf. Durch Expression von STAT3 in diesen Zellen wird ein normales Mikrotubuli-Netzwerk ausgebildet (Ng et al., 2006). Interessanterweise ist das Mikrotubuli-Zytoskelett in Δ STAT3-Zellen verändert, ohne dass dadurch die mitotischen Mikrotubuli gestört sind. Die Formation der mitotischen Spindel und der Ablauf der Zellteilung in Δ STAT3-Zellen sind nicht beeinflusst (Ng et al., 2006).

Offen bleibt jedoch die Frage, ob die Interaktion von STAT3 mit Stathmin durch die Phosphorylierung von STAT3 moduliert werden könnte. Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen die Hypothese zu, dass STAT3 nach einer Phosphorylierung durch CNTF Stimulation der Motoneurone stärker mit Stathmin interagiert. Dadurch wird die „Katastrophe-Rate“ der Mikrotubuli am Plus-Ende reduziert und somit die Defizite der Assemblierung von Tubulin-Dimeren durch das mutierte TBCE ausgeglichen.

Durch eine Reduktion des in den Motoneuronen exprimierten Stathmins sollte man daher die gleichen, unter CNTF-Applikation beobachteten Effekte bei *pnm*-mutierten Motoneuronen erwarten, wenn diese nur in Gegenwart von BDNF kultiviert werden.

Es wurden shRNA-produzierende Lentiviren hergestellt, die spezifisch die Stathmin Expression herunterregulieren konnten. Mittels Western Blots (Abb. 5-27) und Immunfluoreszenz-Nachweises (Abb. 5-27) wurde die Stathmin Proteinexpression in Motoneuronen nach Infektion mit den Lentiviren überprüft. In *pnm*-mutierten Motoneuronen, die nur in Gegenwart von BDNF kultiviert wurden, hat die Reduktion der Stathmin-Expression die gleichen Effekte auf das Längenwachstum der Axone, wie sie bei *pnm*-mutierten Motoneuronen beobachtet wurden, die in Gegenwart von CNTF kultiviert wurden (Abb. 5-28).

CNTF rettet die axonalen Pathologien und führt zu einer Wiederherstellung bzw. Aufrechterhaltung des axonalen Transports in *pnm*-mutierten Motoneuronen. Diese Effekte sind STAT3 vermittelt. Da

STAT3 mit Stathmin direkt interagieren und so Einfluss auf die Mikrotubulidynamik nehmen kann und eine Reduktion der Stathmin-Expression bei *pnm*-mutierten Motoneuronen die gleichen Effekte hervorruft, wie die Gabe von CNTF, kann angenommen werden, dass STAT3 unabhängig von einer transkriptionellen Wirkung im Zellkern eine lokale Wirkung im axonalen Kompartiment hervorruft.

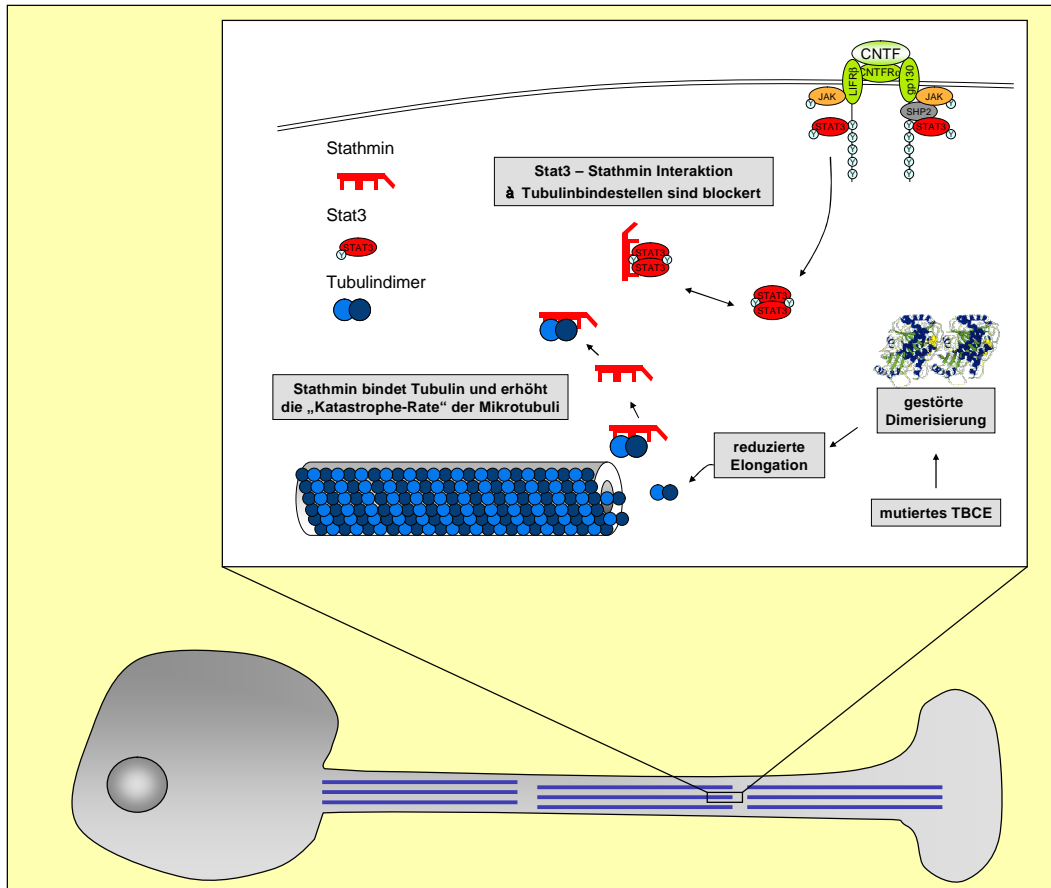


Abb. 6-2: Lokale Wirkung von STAT3 in Axonen durch eine STAT3-Stathmin Interaktion

Nachdem es in unserem Labor gelungen ist, wildtypische Motoneurone in großer Zahl aus embryonalen Stammzellen zu differenzieren, kann in weiteren Experimenten, beispielsweise durch Coimmunpräzitationen, untersucht werden, wie der Phosphorylierungsstatus von STAT3 dessen Bindung an Stathmin beeinflusst um so die Evidenz für eine lokale Wirkung von STAT3 in Axonen zu verstärken.

7 Anhang

7.1 Tbce cDNA

NCBI Accession Number: NM_178337

1575 bp

```

1 atgagtgaca ttttgccatt agatgtcatt ggtagaagag ttgaagttaa tggagaatat
61 gcaacagtg cgttttggg tgctgttcc cctgtggcag gactctgggt aggagttgag
121 tgggacaatc ctgagagagg aaagcatgac gggagccacg aaggactat gtattttaa
181 tgcaggcacc caacaggagg ctcttttgg cgtccaagca aagttaattt cggagatgac
241 ttccttactg cccttaagaa gcgctatgtg ctccaagatg gacctgatga tgatgaaaat
301 tcgtgttcc taaaagttgg aagtaaaca gtgcaacta ttggttttg acatattaca
361 aagaagcaga gtcagctgag agcactgcag gacatttcc tctggaactg tgccgtgagc
421 catgctggtg aacaaggaag aattgctgaa gcctgcccc atattcgagt tgtaaattta
481 tccaaaaact tgttgtcaac ttgggatgaa gtggttctta ttgcagagca gctcaaagac
541 ctggaggctc ttgatctcag tgaaaataaa ctgcagttc cctctgact accaactcta
601 actagaacat tttctactct gaagacttta gtcctaaaca aaacaggaat aacgtggact
661 gaggtgctgc actgtgctcc ttcattggc gtcctcgagg aactttacct caagtctaac
721 aatatttcca tttctgaaag gccagtgaat gtcctgcaga aaatgagggt actagacctt
781 tcctccaacc catcaattga tgaaagccag ctgagcctta tagcagatct tccaagatta
841 gaacacctag tcctttctga cattggactt tcttctatac attttccaga tgctgaaatt
901 ggatgcaaaa catccatggt cccggccttg aagtacctca tagtcaatga caaccagata
961 tcagaatggt catttatcaa cgagctggat aaactgcaga gcctgcaggc cctgtcctgc
1021 actagaaacc ctttgagcaa agcggacaaa gcagaggaga tcattatcgc caagattgct
1081 cagctgagga ccctgaacag gtgccagatt cttccagagg aaaggcgtgg agctgagcta
1141 gattatcgaa aagcctttgg aatgaatgg agaaaggctg gtggacaccc agatccagac
1201 aaaaacaggc caaatgcagc gtttctctca gcccatccta gataccagct tctctgctgc
1261 aatatgggtg cacctgaaga tgaggagctc aaaacacagc agccattcat gctaaaaaaaa
1321 cagctactaa ccctgaagat aaaatgctca aatcaacctg aacggcaaat attagaaaag
1381 cagttgccag actccatgac agttcaaaa gttaaaggac tgttgtcacg tcttctcaaa
1441 gttcctgtgt cagaacttct gttgtcctac gaaagttcca agatgccggg cagagaaatt
1501 gaactagaaa atgacctaca gccattacag ttttattctg tggaaaatgg agattgccta
1561 ctagtgcgat ggttaa

```

7.2 TBCE Aminosäuresequenz

NCBI Accession Number: NP_848027

524 aa

```

1 msdilpldvi grrvevngey atvrfgavp pvaglwlgve wdnpergkhd gshegtmyfk
61 crhptggsfv rpskvnfgdd fltalkkryv ledgpdden scslkvgsqk vqtigfehit
121 kkqsqlralq dislwncavs hageggriae acpnirvvn sknllstwde vvliaeqlkd
181 lealdlsenk lqfpsdsptl trtfstlktl vlnktgitwt evlhcapswp vleelylksn
241 nisiserpvn vlqkmrllldl ssnpsidesq lsliadlprl ehlvlsdigl ssihfpdae
301 gcktsmfpal kylivndnqi sewsfineld klqslqalsc trnplskadk aeiiiaakia
361 qlrtlnrcqi lpeerrgaei dyrkafgnw rkagghpdpd knrpnaafls ahpryqlcc
421 kygapedeel ktqqpfmlkk qltlkikcs nqperqilek qlpdsmtvqk vkgllsrllk
481 vpvselllsy esskmpgrei elendlqplq fysvengdcl lvrw

```


7.3 Verwendete Peptide zur Immunisierung

Kaninchen #5	TBCE-1	C-QILPEERRGAELDYRKAF-NH ₂	C-Terminus
Kaninchen #6	TBCE-1	C-QILPEERRGAELDYRKAF-NH ₂	C-Terminus
Kaninchen #7	TBCE-2	C-VEWDNPERGKHDGSHEGTM-NH ₂	Cap-Gly-Domäne
Kaninchen #8	TBCE-2	C-VEWDNPERGKHDGSHEGTM-NH ₂	Cap-Gly-Domäne
Kaninchen #9	TBCE-3	C-KRYVLEDGPDDDENSCSL-NH ₂	N-Terminus
Kaninchen #10	TBCE-3	C-KRYVLEDGPDDDENSCSL-NH ₂	N-Terminus

TBCE:

MSDILPLDVI GRRVEVN GEYATVRF CGAVPPVAGLWLG **VEWDNPERGKHDGSHEGTM** YFKCRHPTGGSFV
RPSKVNFGDDFLTALK **KRYVLEDGPDDDENSCSL** KVGSKQVQTIGFEHITKKQSQLRALQDISLWNCVAVS
HAGEQGRIAEACPNIRVVNLSKNLLSTWDEVVLI AEQLKDLEALDLS ENKLQFPSPDSPTLTRTFSTLKT
VLNKTGITWTEVLHCAPSWPVLEELYLKSNNISISERP VNVLQKMRLDLSSNPSIDESQLSLIADL PRL
EHLVLSDIGLSSIHFPDAEIGCKTSMFPALKYLIVNDNQISEWSFINELDKLQSLQALSCTRNP LSKADK
AEEIIIAKIAQLRTLNR C**QILPEERRGAELDYRKAF** GNEWRKAGGHPDPDKNRPNAAFLSAHPRYQLLCC
KYGAPEDDEELKTQQPFMLKKQLLTLKIKCSNQP ERQILEKQLPDSMTVQKVKGLLSRLLKVPVSELLLSY
ESSKMPGREIELENDLQPLQFY SVENGDCLLVRW

7.4 Plasmidkarten

7.4.1 Plasmide für die Herstellung von Lentiviren zur Überexpression

Für die Herstellung der lentiviralen Konstrukte wurden zwei Plasmide aus dem Institut für Virologie (Würzburg) verwendet (Jarmy et al., 2001). In beide Plasmide, pGJ3 bzw. pGJ3(SFFVp), wurde jeweils zunächst in eine Esp3I Schnittstelle eine Polylinkerseite kloniert. Über die Schnittstellen dieser Polylinkerseite wurden später EGFP, CMVp-EGFP und HA-markiertes Tbce kloniert.

7.4.1.1 pGJ3 à pGJ3 polylinker

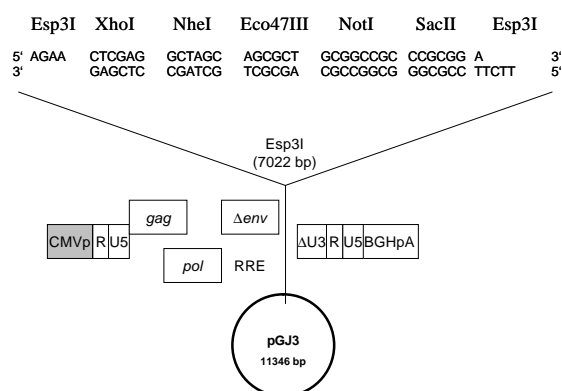


Abb. 7-1: Plasmidkarten pGJ3 / pGJ3 polylinker

7.4.1.2 pGJ3(SFFVp) à pGJ3(SFFVp) polylinker

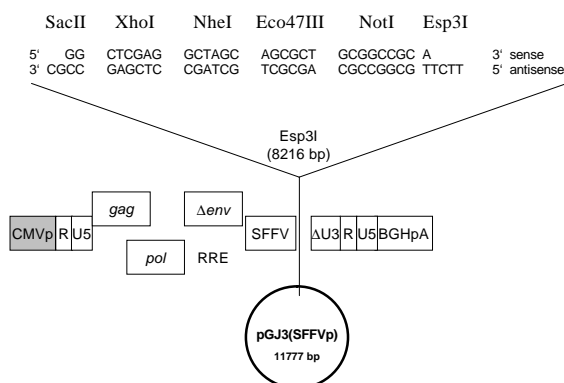


Abb. 7-2: Plasmidkarten pGJ3(SFFVp) / pGJ3(SFFVp)polylinker

7.4.1.3 pGJ3 Varianten

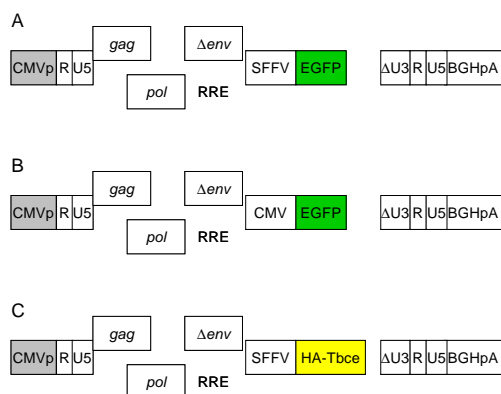


Abb. 7-3: pGJ3 Varianten

7.4.2 Lentivirales System für RNAi

7.4.2.1 Lentilox pLL3.7

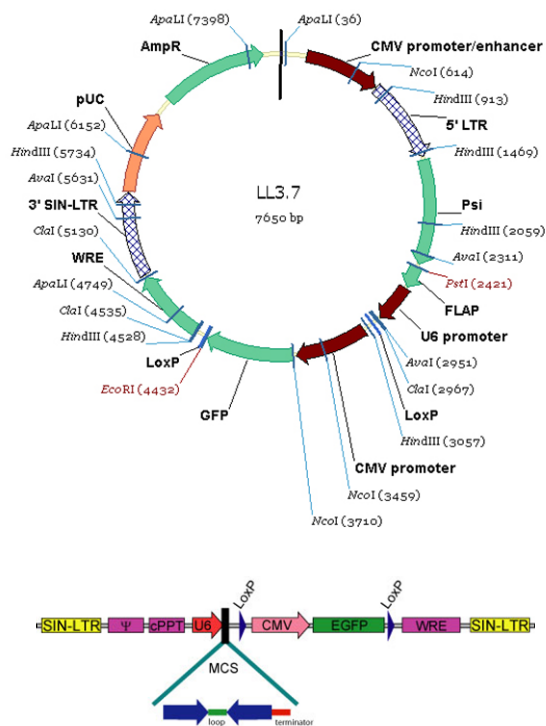


Abb. 7-4: Plasmidkarte Lentilox 3.7
(Rubinson et al., 2003)

pLL3.7 Stathmin Oligo 1

Zielsequenz: GCG CGC TTC AGG CCA GGC T

Oligo zum Klonieren: tcgagaaaaa **gcgcgcttcaggccaggct**tctcttgaa **agcctggcctgaagcgcg**cA**pLL3.7 Stathmin Oligo 2**

Zielsequenz: GTC TCA TGA GGC GGA AGT C

Oligo zum Klonieren: tcgagaaaaa **gtctcatgaggcggaagtc**tctcttgaa **gactccgcctcatgagac**A**pLL3.7 Stathmin Oligo 3**

Zielsequenz: GGG GAG AAA CTG AAA GTG T

Oligo zum Klonieren: tcgagaaaaa **ggggagaaactgaaagtg**tctcttgaa **acactttcagtttctcccc**A**pLL3.7 Stathmin Kontrolle (mismatch)**Zielsequenz: GG **T** TAG AAA CT **T** AAA GTG TOligo zum Klonieren: gaaaaa **ggtagaaactaaagtg**tctcttgaa **acactttaagtttctaacc**A

7.4.2.2 Hilfsplasmide für Lentilox 3.7

7.4.2.2.1 pRSV-REV

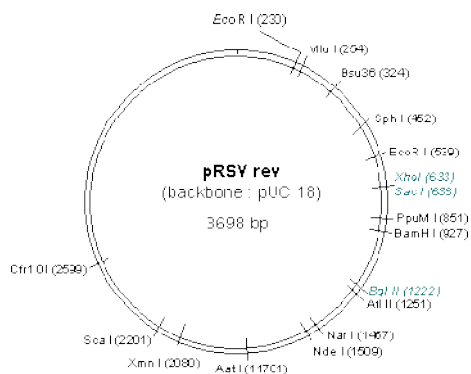


Abb. 7-5: Plasmidkarte pRSV-REV (Dull et al., 1998)

7.4.2.2.2 pMD.G

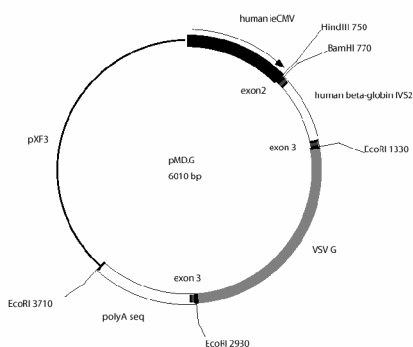


Abb. 7-6: Plasmidkarte pMD.G (Dull et al., 1998)

7.4.2.2.3 pMDLg/pRRE

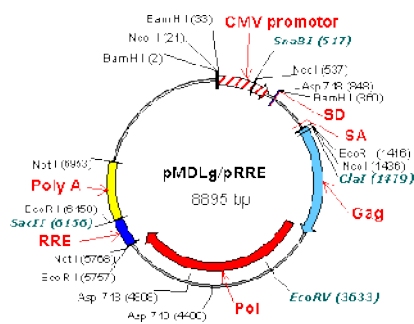


Abb. 7-7: Plasmidkarte pMDLg/pRRE (Dull et al., 1998)

8 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
ATP	Adenosintriphosphat
BAC	engl. bacterial artificial chromosome
BDNF	engl. brain derived neurotrophic factor
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
C	Cytosin
CCT	engl. cytosolic chaperonin
cDNA	engl. copy DNA
CJD	engl. Creutzfeldt-Jakob disease
CNTF	engl. ciliary neurotrophic factor
CT-1	Cardiotrophin-1
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DIV	engl. days in vitro
DNA	engl. desoxyribonucleid acid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
ds	doppelsträngig
dT	Desoxythymidin
E	Embryonaltag
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM	Elektronenmikroskopie
engl.	englisch
fALF	familiäre Form der Amyotrophe Lateralsklerose
FCCP	engl. carbonylcyanide-p-trifluoromethoxyphenylhydrazone
FCS	engl. fetal calf serum
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
G	Guanin
GDNF	engl. glial cell derived neurotrophic factor
GM130	Golgi-Matrix-Protein 130
HEK293T	engl. human embryonic kidney cells 293T
IF	Immunfluoreszenz
JC-1	5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine-iodide/chloride
kb	Kilo-Basen
kD	Kilo-Dalton
MAPs	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
max.	maximal

mRNA	engl. messenger RNA
MTOC	engl. microtubule organizing center
mut	mutiert, Mutante
NFH	Neurofilament H
NFL	Neurofilament L
NFM	Neurofilament M
NGF	engl. nerve growth factor, Nervenwachstumsfaktor
NT-3	Neurotrophin-3
Op18	Onkoprotein 18, Stathmin
PC12	Phäochromozytomzellen 12
PCR	engl. polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
<i>pmn</i>	<i>progressive motoneuronopathy</i>
PTGS	engl. posttranslational gene silencing
rel.	relative
RFLP	Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus
RNA	engl. ribonucleid acid
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	engl. reverse transcription PCR
sALS	sporadische Form der Amyotrophe Lateralsklerose
SDS	engl. sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	engl. sodium-dodecylsulfate-polyacryl-amid-gel-elektrophoresis
SEM	engl. standard error of mean
shRNA	engl. short hairpin RNA
SMA	Spinale Muskelatrophie
SMN	engl. survival of motoneurons
SNP	engl. Single nucleotide polymorphism
SOD1	Superoxid-Dismutase 1
STAT3	engl. signal transducer and activator of transcription 3
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBCE	Tubulin-spezifisches Chaperon E, Cofaktor E
U	engl. unit
U	Uracil
UTR	engl. untranslated region
WB	Western Blot
wt	wildtypisch, Wildtyp
ZK	Zellkultur

9 Literaturverzeichnis

1. Ahmad FJ, Baas PW (1995) Microtubules released from the neuronal centrosome are transported into the axon. *J Cell Sci* 108 (Pt 8): 2761-2769.
2. Andersen PM, Sims KB, Xin WW, Kiely R, O'Neill G, Ravits J, Piro E, Harati Y, Brower RD, Levine JS, Heinicke HU, Seltzer W, Boss M, Brown RH, Jr. (2003) Sixteen novel mutations in the Cu/Zn superoxide dismutase gene in amyotrophic lateral sclerosis: a decade of discoveries, defects and disputes. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 4: 62-73.
3. Baas PW, Deitch JS, Black MM, Banker GA (1988) Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 8335-8339.
4. Baas PW, Vidya NC, Myers KA (2006) Axonal transport of microtubules: the long and short of it. *Traffic* 7: 490-498.
5. Baldassarre G, Belletti B, Nicoloso MS, Schiappacassi M, Vecchione A, Spessotto P, Morrione A, Canzonieri V, Colombatti A (2005) p27(Kip1)-stathmin interaction influences sarcoma cell migration and invasion. *Cancer Cell* 7: 51-63.
6. Barbacid M (1994) The Trk family of neurotrophin receptors. *J Neurobiol* 25: 1386-1403.
7. Barbacid M, Lamballe F, Pulido D, Klein R (1991) The *trk* family of tyrosine protein kinase receptors. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1072: 115-127.
8. Basto R, Lau J, Vinogradova T, Gardiol A, Woods CG, Khodjakov A, Raff JW (2006) Flies without centrioles. *Cell* 125: 1375-1386.
9. Baumann O, Murphy DB (1995) Microtubule-associated movement of mitochondria and small particles in *Acanthamoeba castellanii*. *Cell Motil Cytoskeleton* 32: 305-317.
10. Beal MF (1995) Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Ann Neurol* 38: 357-366.
11. Belmont LD, Mitchison TJ (1996) Identification of a protein that interacts with tubulin dimers and increases the catastrophe rate of microtubules. *Cell* 84: 623-631.
12. Bender FL, Fischer M, Funk N, Orel N, Rethwilm A, Sendtner M (2006) High-efficiency gene transfer into cultured embryonic motoneurons using recombinant lentiviruses. *Histochem Cell Biol*.
13. Berger MM, Kopp N, Vital C, Redl B, Aymard M, Lina B (2000) Detection and cellular localization of enterovirus RNA sequences in spinal cord of patients with ALS. *Neurology* 54: 20-25.
14. Bogan N, Cabot JB (1991) Light and electron microscopic analyses of intraspinal axon collaterals of sympathetic preganglionic neurons. *Brain Res* 541: 241-251.
15. Bollag D.M., Rozycki M.D., Edelstein S.J. (1996) *Protein Methods*. New York: Wiley-Liss.
16. Bommel H, Xie G, Rossoll W, Wiese S, Jablonka S, Boehm T, Sendtner M (2002) Missense mutation in the tubulin-specific chaperone E (Tbce) gene in the mouse mutant progressive motor neuronopathy, a model of human motoneuron disease. *J Cell Biol* 159: 563-569.

17. Bordet T, Schmalbruch H, Pettmann B, Hagege A, Castelnau-Ptakhine L, Kahn A, Haase G (1999) Adenoviral cardiotrophin-1 gene transfer protects pmn mice from progressive motor neuronopathy. *J Clin Invest* 104: 1077-1085.
18. Bridgman PC (2004) Myosin-dependent transport in neurons. *J Neurobiol* 58: 164-174.
19. Bromberg J (2002) Stat proteins and oncogenesis. *J Clin Invest* 109: 1139-1142.
20. Bromberg J, Chen X (2001) STAT proteins: signal transducers and activators of transcription. *Methods Enzymol* 333: 138-151.
21. Bromberg J, Darnell JE, Jr. (2000) The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function. *Oncogene* 19: 2468-2473.
22. Bromberg JF, Wrzeszczynska MH, Devgan G, Zhao Y, Pestell RG, Albanese C, Darnell JE, Jr. (1999) Stat3 as an oncogene. *Cell* 98: 295-303.
23. Chabin-Brion K, Marceiller J, Perez F, Settegrana C, Drechou A, Durand G, Pous C (2001) The Golgi complex is a microtubule-organizing organelle. *Mol Biol Cell* 12: 2047-2060.
24. Chapman RS, Lourenco P, Tonner E, Flint D, Selbert S, Takeda K, Akira S, Clarke AR, Watson CJ (2000) The role of Stat3 in apoptosis and mammary gland involution. Conditional deletion of Stat3. *Adv Exp Med Biol* 480: 129-138.
25. Charbaut E, Curmi PA, Ozon S, Lachkar S, Redeker V, Sobel A (2001) Stathmin family proteins display specific molecular and tubulin binding properties. *J Biol Chem* 276: 16146-16154.
26. Chou SM (1992) Pathology-Light microscopy of Amyotrophic lateral sclerosis. In: *Handbook of Amyotrophic Lateral sclerosis* (Smith RA, ed), pp 133-182. New York: Marcel Dekker, Inc.
27. Corcoran LJ, Mitchison TJ, Liu Q (2004) A novel action of histone deacetylase inhibitors in a protein aggresome disease model. *Curr Biol* 14: 488-492.
28. Cossarizza A, Baccarani-Contri M, Kalashnikova G, Franceschi C (1993) A new method for the cytofluorimetric analysis of mitochondrial membrane potential using the J-aggregate forming lipophilic cation 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide (JC-1). *Biochem Biophys Res Commun* 197: 40-45.
29. Cowan NJ, Lewis SA (1999) A chaperone with a hydrophilic surface. *Nat Struct Biol* 6: 990-991.
30. Curmi PA, Gavet O, Charbaut E, Ozon S, Lachkar-Colmerauer S, Manceau V, Siavoshian S, Maucuer A, Sobel A (1999) Stathmin and its phosphoprotein family: general properties, biochemical and functional interaction with tubulin. *Cell Struct Funct* 24: 345-357.
31. de Anda FC, Pollarolo G, Da Silva JS, Camoletto PG, Feiguin F, Dotti CG (2005) Centrosome localization determines neuronal polarity. *Nature* 436: 704-708.
32. Di Paolo G, Pellier V, Catsicas M, Antonsson B, Catsicas S, Grenningloh G (1996) The phosphoprotein stathmin is essential for nerve growth factor-stimulated differentiation. *J Cell Biol* 133: 1383-1390.
33. Diaz-Corrales FJ, Asanuma M, Miyazaki I, Miyoshi K, Ogawa N (2005) Rotenone induces aggregation of gamma-tubulin protein and subsequent disorganization of the centrosome: relevance to formation of inclusion bodies and neurodegeneration. *Neuroscience* 133: 117-135.
34. DuBridge RB, Tang P, Hsia HC, Leong PM, Miller JH, Calos MP (1987) Analysis of mutation in human cells by using an Epstein-Barr virus shuttle system. *Mol Cell Biol* 7: 379-387.

35. Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L (1998) A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 72: 8463-8471.
36. Elder GA, Friedrich VL, Jr., Bosco P, Kang C, Gourov A, Tu PH, Lee VM, Lazzarini RA (1998a) Absence of the mid-sized neurofilament subunit decreases axonal calibers, levels of light neurofilament (NF-L), and neurofilament content. *J Cell Biol* 141: 727-739.
37. Elder GA, Friedrich VL, Jr., Kang C, Bosco P, Gourov A, Tu PH, Zhang B, Lee VM, Lazzarini RA (1998b) Requirement of heavy neurofilament subunit in the development of axons with large calibers. *J Cell Biol* 143: 195-205.
38. Fabricius C, Berthold CH, Rydmark M (1993) Axoplasmic organelles at nodes of Ranvier. II. Occurrence and distribution in large myelinated spinal cord axons of the adult cat. *J Neurocytol* 22: 941-954.
39. Ferri A, Sanes JR, Coleman MP, Cunningham JM, Kato AC (2003) Inhibiting axon degeneration and synapse loss attenuates apoptosis and disease progression in a mouse model of motoneuron disease. *Curr Biol* 13: 669-673.
40. Figlewicz DA, Krizus A, Martinoli MG, Meininger V, Dib M, Rouleau GA, Julien J-P (1994) Variants of the heavy neurofilament subunit are associated with the development of amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 3: 1757-1761.
41. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
42. Fleming JA, Vega LR, Solomon F (2000) Function of tubulin binding proteins in vivo. *Genetics* 156: 69-80.
43. Funk, Natalja. Das Sap47-Gen aus *Drosophila melanogaster*: Gezielte Mutagenisierung und Suche nach Interaktionspartnern. 2003. Bayerische Julius-Maximilians Universität Würzburg.
44. Gavet O, Ozon S, Manceau V, Lawler S, Curmi P, Sobel A (1998) The stathmin phosphoprotein family: intracellular localization and effects on the microtubule network. *J Cell Sci* 111 (Pt 22): 3333-3346.
45. Giampietro C, Luzzati F, Gambarotta G, Giacobini P, Boda E, Fasolo A, Perroteau I (2005) Stathmin expression modulates migratory properties of GN-11 neurons in vitro. *Endocrinology* 146: 1825-1834.
46. Gonatas NK, Stieber A, Gonatas JO (2006a) Fragmentation of the Golgi apparatus in neurodegenerative diseases and cell death. *J Neurol Sci* 246: 21-30.
47. Gonatas NK, Stieber A, Gonatas JO (2006b) Fragmentation of the Golgi apparatus in neurodegenerative diseases and cell death. *J Neurol Sci* 246: 21-30.
48. Gotow T, Miyaguchi K, Hashimoto PH (1991) Cytoplasmic architecture of the axon terminal: filamentous strands specifically associated with synaptic vesicles. *Neuroscience* 40: 587-598.
49. Grafstein B, Forman DS (1980) Intracellular transport in neurons. *Physiol Rev* 60: 1167-1283.
50. Greene LA, Tischler AS (1976) Establishment of a noradrenergic clonal cell line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 2424-2428.
51. Grouselle M, Tueux O, Dabadie P, Georgescaud D, Mazat JP (1990) Effect of local anaesthetics on mitochondrial membrane potential in living cells. *Biochem J* 271: 269-272.
52. Gubbay SS, Kahana E, Zilber N, Cooper G, Pintov S, Leibowitz Y (1985) Amyotrophic lateral sclerosis. A study of its presentation and prognosis. *J Neurol* 232: 295-300.

53. Haase G, Kennel P, Pettmann B, Vigne E, Akli S, Revah F, Schmalbruch H, Kahn A (1997) Gene therapy of murine motor neuron disease using adenoviral vectors for neurotrophic factors. *Nature Medicine* 3: 429-436.
54. Haase G, Pettmann B, Vigne E, Castelnuovo-Ptakhine L, Schmalbruch H, Kahn A (1998) Adenovirus-mediated transfer of the neurotrophin-3 gene into skeletal muscle of pmn mice: therapeutic effects and mechanisms of action. *J Neurol Sci* 160 Suppl 1: S97-105.
55. Hafezparast M, Klocke R, Ruhrberg C, Marquardt A, Ahmad-Annur A, Bowen S, Lalli G, Witherden AS, Hummerich H, Nicholson S, Morgan PJ, Oozageer R, Priestley JV, Averill S, King VR, Ball S, Peters J, Toda T, Yamamoto A, Hiraoka Y, Augustin M, Korthaus D, Wattler S, Wabnitz P, Dickneite C, Lampel S, Boehme F, Peraus G, Popp A, Rudelius M, Schlegel J, Fuchs H, Hrabe dA, Schiavo G, Shima DT, Russ AP, Stumm G, Martin JE, Fisher EM (2003) Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *SCI* 300: 808-812.
56. Hamprecht, A. Genetische Polymorphismen in Toll-like-Rezeptoren, rheumatoide Arthritis und Höhe von Rheumafaktor im Serum. 2005. Medizinischen Fakultät der Charité.
57. Henderson CE, Phillips HS, Pollock RA, Davies AM, Lemeulle C, Armanini M, Simpson LC, Moffet B, Vandlen RA, Koliatsos VE, Et al (1994) GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *SCI* 266: 1062-1064.
58. Higgins CM, Jung C, Ding H, Xu Z (2002) Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motoneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *J Neurosci* 22: RC215.
59. Hirano A, Nakano I, Kurland LT, Mulder DW, Holley PW, Saccomanno G (1984) Fine structural study of neurofibrillary changes in a family with amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 43: 471-480.
60. Hirokawa N (1994) Microtubule organization and dynamics dependent on microtubule-associated proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6: 74-81.
61. Hollenbeck PJ (1996) The pattern and mechanism of mitochondrial transport in axons. *Front Biosci* 1: d91-102.
62. Hollenbeck PJ, Saxton WM (2005) The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 118: 5411-5419.
63. Holtmann B, Wiese S, Samsam M, Grohmann K, Pennica D, Martini R, Sendtner M (2005) Triple knock-out of CNTF, LIF, and CT-1 defines cooperative and distinct roles of these neurotrophic factors for motoneuron maintenance and function. *J Neurosci* 25: 1778-1787.
64. Hoyt MA, Macke JP, Roberts BT, Geiser JR (1997) *Saccharomyces cerevisiae* PAC2 functions with CIN1, 2 and 4 in a pathway leading to normal microtubule stability. *Genetics* 146: 849-857.
65. Hunter AW, Wordeman L (2000) How motor proteins influence microtubule polymerization dynamics. *J Cell Sci* 113 Pt 24: 4379-4389.
66. Iancu C, Mistry SJ, Arkin S, Wallenstein S, Atweh GF (2001) Effects of stathmin inhibition on the mitotic spindle. *J Cell Sci* 114: 909-916.
67. Ip NY, Yancopoulos GD (1996) The neurotrophins and CNTF: two families of collaborative neurotrophic factors. *Annu Rev Neurosci* 19: 491-515.
68. Ito Y, Wiese S, Funk N, Chittka A, Rossoll W, Bommel H, Watabe K, Wegner M, Sendtner M (2006) Sox10 regulates ciliary neurotrophic factor gene expression in Schwann cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 7871-7876.

69. Jablonka S, Karle K, Sandner B, Andreassi C, von Au K, Sendtner M (2006) Distinct and Overlapping Alterations in Motor and Sensory Neurons in a Mouse Model of Spinal Muscular Atrophy (SMA). *Hum Mol Genet*.
70. Jablonka S, Rossoll W, Schrank B, Sendtner M (2000) The role of SMN in spinal muscular atrophy. *J Neurol* 247 Suppl 1: I37-I42.
72. Jablonka S, Schrank B, Kralewski M, Rossoll W, Sendtner M (2000c) Reduced survival motor neuron (Smn) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III. *Hum Mol Genet* 9: 341-346.
73. Jablonka S, Wiese S, Sendtner M (2004) Axonal defects in mouse models of motoneuron disease. *J Neurobiol* 58: 272-286.
74. Jacomy H, Zhu Q, Couillard-Despres S, Beaulieu JM, Julien JP (1999) Disruption of type IV intermediate filament network in mice lacking the neurofilament medium and heavy subunits. *J Neurochem* 73: 972-984.
75. Jarmy G, Heinkelein M, Weissbrich B, Jassoy C, Rethwilm A (2001) Phenotypic analysis of the sensitivity of HIV-1 to inhibitors of the reverse transcriptase, protease, and integrase using a self-inactivating virus vector system. *J Med Virol* 64: 223-231.
76. Johnson LV, Walsh ML, Chen LB (1980) Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. *Proc Natl Acad Sci U S A* 77: 990-994.
77. Johnston JA, Ward CL, Kopito RR (1998) Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* 143: 1883-1898.
78. Julien JP (1999) Neurofilament functions in health and disease. *Curr Opin Neurobiol* 9: 554-560.
79. Julien JP, Kriz J (2006) Transgenic mouse models of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 1762: 1013-1024.
80. Julien JP, Mushynski WE (1998) Neurofilaments in health and disease. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 61: 1-23.
81. Kasschau KD, Carrington JC (1998) A counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95: 461-470.
82. Kaya, Ali Murat. Molekulare Mechanismen des Axonwachstums: Charakterisierung der Rolle vom Tubulin spezifischen Chaperon E , *Tbce*. 2004. Institut für Klinische Neurobiologie der Universität Würzburg.
83. Knoblich JA (2005) Neurobiology: getting axons going. *Nature* 436: 632-633.
84. Kopito RR (2000) Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation. *Trends Cell Biol* 10: 524-530.
85. Kuznetsov SA, Langford GM, Weiss DG (1992) Actin-dependent organelle movement in squid axoplasm. *Nature* 356: 722-725.
86. Kyhse-Anderson J (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Meth* 10: 203-209.
87. LaMonte BH, Wallace KE, Holloway BA, Shelly SS, Ascano J, Tokito M, Van Winkle T, Howland DS, Holzbaur EL (2002) Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron* 34: 715-727.

88. Langford GM (2002) Myosin-V, a versatile motor for short-range vesicle transport. *Traffic* 3: 859-865.
89. Lariviere RC, Julien JP (2004) Functions of intermediate filaments in neuronal development and disease. *J Neurobiol* 58: 131-148.
90. Lee MK, Marszalek JR, Cleveland DW (1994) A mutant neurofilament subunit causes massive, selective motor neuron death: Implications for the pathogenesis of human motor neuron disease. *Neuron* 13: 975-988.
91. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy- determining gene [see comments]. *Cell* 80: 155-165.
92. Levi-Montalcini R (1976) The nerve growth factor: its role in growth differentiation and function of the sympathetic adrenergic neuron. *Progress in Brain Res* 45: 235-258.
93. Levi-Montalcini R, Meyer H, Hamburger V (1954) In vitro experiments on the effects of mouse sarcomas 180 and 37 on the spinal and sympathetic ganglia of the chick embryo. *Cancer Res* 14: 49-57.
94. Levy DE, Lee CK (2002) What does Stat3 do? *J Clin Invest* 109: 1143-1148.
95. Li YC, Zhai XY, Ohsato K, Futamata H, Shimada O, Atsumi S (2004) Mitochondrial accumulation in the distal part of the initial segment of chicken spinal motoneurons. *Brain Res* 1026: 235-243.
96. Ligon LA, Steward O (2000) Role of microtubules and actin filaments in the movement of mitochondria in the axons and dendrites of cultured hippocampal neurons. *J Comp Neurol* 427: 351-361.
97. Lindbo JA, Dougherty WG (1992) Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* 189: 725-733.
98. Lindsay RM, Yancopoulos GD (1996) GDNF in a bind with known orphan: accessory implicated in new twist. *Neuron* 17: 571-574.
99. Ludolph AC, Schwarz J (2001) *Grundlagen der klinischen Neuroprotektion*. Bremen, London, Boston: UNI-MED.
100. Marklund U, Osterman O, Melander H, Bergh A, Gullberg M (1994) The phenotype of a "Cdc2 kinase target site-deficient" mutant of oncoprotein 18 reveals a role of this protein in cell cycle control. *J Biol Chem* 269: 30626-30635.
101. Martin N, Jaubert J, Gounon P, Salido E, Haase G, Szatanik M, Guenet JL (2002) A missense mutation in *Tbce* causes progressive motor neuronopathy in mice. *Nat Genet* 32: 443-447.
102. Martin R, Vaida B, Bleher R, Crispino M, Giuditta A (1998) Protein synthesizing units in presynaptic and postsynaptic domains of squid neurons. *J Cell Sci* 111 (Pt 21): 3157-3166.
103. Mattiazzi M, D'Aurelio M, Gajewski CD, Martushova K, Kiaei M, Beal MF, Manfredi G (2002) Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *J Biol Chem* 277: 29626-29633.
104. McNaught KS, Shashidharan P, Perl DP, Jenner P, Olanow CW (2002) Aggresome-related biogenesis of Lewy bodies. *Eur J Neurosci* 16: 2136-2148.
105. Mersiyanova IV, Perepelov AV, Polyakov AV, Sitnikov VF, Dadali EL, Oparin RB, Petrin AN, Evgrafov OV (2000) A new variant of Charcot-Marie-Tooth disease type 2 is probably the result of a mutation in the neurofilament-light gene. *Am J Hum Genet* 67: 37-46.

106. Meyer T, Alber B, Roemer K, Martin T, Kalscheuer VM, Gottert E, Zang KD, Ludolph AC, Ropers HH, Prudlo J (2003) High rate of constitutional chromosomal rearrangements in apparently sporadic ALS. *Neurology* 60: 1348-1350.
107. Morris RL, Hollenbeck PJ (1993) The regulation of bidirectional mitochondrial transport is coordinated with axonal outgrowth. *J Cell Sci* 104 (Pt 3): 917-927.
108. Morris RL, Hollenbeck PJ (1995) Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J Cell Biol* 131: 1315-1326.
109. Ng DC, Lin BH, Lim CP, Huang G, Zhang T, Poli V, Cao X (2006) Stat3 regulates microtubules by antagonizing the depolymerization activity of stathmin. *J Cell Biol* 172: 245-257.
110. Nishimune H, Vasseur S, Wiese S, Birling MC, Holtmann B, Sendtner M, Iovanna JL, Henderson CE (2000) Reg-2 is a motoneuron neurotrophic factor and a signalling intermediate in the CNTF survival pathway. *Nat Cell Biol* 2: 906-914.
111. Okado-Matsumoto A, Fridovich I (2002) Amyotrophic lateral sclerosis: a proposed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 9010-9014.
112. Olanow CW, Perl DP, DeMartino GN, McNaught KS (2004) Lewy-body formation is an aggresome-related process: a hypothesis. *Lancet Neurol* 3: 496-503.
113. Oppenheim RW, Houenou LJ, Johnson JE, Lin LF, Li L, Lo AC, Newsome AL, Prevetie DM, Wang S (1995) Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature* 373: 344-346.
114. Palay SL (1956) Synapses in the central nervous system. *J Biophys Biochem Cytol* 2: 193-202.
115. Parvari R, Hershkovitz E, Grossman N, Gorodischer R, Loeys B, Zecic A, Mortier G, Gregory S, Sharony R, Kambouris M, Sakati N, Meyer BF, Al Aqeel AI, Al Humaidan AK, Al Zahrani F, Al Swaid A, Al Othman J, Diaz GA, Weiner R, Khan KT, Gordon R, Gelb BD (2002) Mutation of TBCE causes hypoparathyroidism-retardation-dysmorphism and autosomal recessive Kenny-Caffey syndrome. *Nat Genet* 32: 448-452.
116. Pasinelli P, Brown RH (2006) Molecular biology of amyotrophic lateral sclerosis: insights from genetics. *Nat Rev Neurosci* 7: 710-723.
117. Pietschmann T, Heinkelein M, Heldmann M, Zentgraf H, Rethwilm A, Lindemann D (1999) Foamy virus capsids require the cognate envelope protein for particle export. *J Virol* 73: 2613-2621.
118. Plasterk RH (2002) RNA silencing: the genome's immune system. *SCI* 296: 1263-1265.
119. Povlishock JT (1976) The fine structure of the axons and growth cones of the human fetal cerebral cortex. *Brain Res* 114: 379-39i.
120. Puls I, Jonnakuty C, LaMonte BH, Holzbaur EL, Tokito M, Mann E, Floeter MK, Bidus K, Drayna D, Oh SJ, Brown RH, Jr., Ludlow CL, Fischbeck KH (2003) Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nat Genet* 33: 455-456.
121. Reeves, Steven. <http://adams.mgh.harvard.edu/Reeves/workingresearch2.htm>. 2007.
122. Reid E, Kloos M, Ashley-Koch A, Hughes L, Bevan S, Svenson IK, Graham FL, Gaskell PC, Dearlove A, Pericak-Vance MA, Rubinsztein DC, Marchuk DA (2002) A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *Am J Hum Genet* 71: 1189-1194.
123. REYNOLDS ES (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Biol* 17: 208-212.

124. Rizzardini M, Lupi M, Mangolini A, Babetto E, Ubezio P, Cantoni L (2006) Neurodegeneration induced by complex I inhibition in a cellular model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *Brain Res Bull* 69: 465-474.
125. Rizzardini M, Mangolini A, Lupi M, Ubezio P, Bendotti C, Cantoni L (2005) Low levels of ALS-linked Cu/Zn superoxide dismutase increase the production of reactive oxygen species and cause mitochondrial damage and death in motor neuron-like cells. *J Neurol Sci* 232: 95-103.
126. Roche (1998) The LightCycler - the smartest innovation for more efficient PCR. *Biochemica* 4-7.
127. Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng H-X, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston SM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Herzfeldt B, Van den Berg R, Hung W-Y, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-Vance MA, Haines J, Rouleau GA, Gusella JS, Horvitz HR, Brown Jr. RH (1993) Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-62.
128. Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kroning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M (2003a) Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol* 163: 801-812.
129. Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kroning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M (2003b) Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol* 163: 801-812.
130. Rubinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, Sievers C, Yang L, Kopinja J, Rooney DL, Ihrig MM, McManus MT, Gertler FB, Scott ML, Van Parijs L (2003) A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet* 33: 401-406.
131. Ruthel G, Hollenbeck PJ (2003) Response of mitochondrial traffic to axon determination and differential branch growth. *J Neurosci* 23: 8618-8624.
132. Sagot Y, Dubois Dauphin M, Tan SA, De Bilbao F, Aebischer P, Martinou J, Kato AC (1995a) Bcl-2 overexpression prevents motoneuron cell body loss but not axonal degeneration in a mouse model of a neurodegenerative disease. *J Neurosci* 15: 7727-7733.
133. Sagot Y, Rosse T, Vejsada R, Perrelet D, Kato AC (1998a) Differential effects of neurotrophic factors on motoneuron retrograde labeling in a murine model of motoneuron disease. *J Neurosci* 18: 1132-1141.
134. Sagot Y, Rosse T, Vejsada R, Perrelet D, Kato AC (1998c) Differential effects of neurotrophic factors on motoneuron retrograde labeling in a murine model of motoneuron disease. *J Neurosci* 18: 1132-1141.
135. Sagot Y, Rosse T, Vejsada R, Perrelet D, Kato AC (1998b) Differential effects of neurotrophic factors on motoneuron retrograde labeling in a murine model of motoneuron disease. *J Neurosci* 18: 1132-1141.
136. Sagot Y, Tan SA, Baetge E, Schmalbruch H, Kato AC, Aebischer P (1995b) Polymer encapsulated cell lines genetically engineered to release ciliary neurotrophic factor can slow down progressive motor neuronopathy in the mouse. *Eur J Neurosci* 7: 1313-1322.
137. Sagot Y, Tan SA, Hammang JP, Aebischer P, Kato AC (1996) GDNF slows loss of motoneurons but not axonal degeneration or premature death of pmn/pmn mice. *J Neurosci* 16: 2335-2341.
138. Sagot Y, Vejsada R, Kato AC (1997) Clinical and molecular aspects of motoneurone diseases: animal models, neurotrophic factors and Bcl-2 oncoprotein. *Trends Pharmacol Sci* 18: 330-337.

139. Salvioli S, Ardizzoni A, Franceschi C, Cossarizza A (1997) JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess delta psi changes in intact cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett* 411: 77-82.
140. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74: 5463-5467.
141. Sano S, Itami S, Takeda K, Tarutani M, Yamaguchi Y, Miura H, Yoshikawa K, Akira S, Takeda J (1999) Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO J* 18: 4657-4668.
142. Schmalbruch H, Jensen HJS, Bjaerg M, Kamieniecka Z, Kurland L (1991) A new mouse mutant with progressive motor neuronopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 50: 192-204.
143. Schweizer U, Gunnarsen J, Karch C, Wiese S, Holtmann B, Takeda K, Akira S, Sendtner M (2002) Conditional gene ablation of Stat3 reveals differential signaling requirements for survival of motoneurons during development and after nerve injury in the adult. *J Cell Biol* 156: 287-297.
144. Sendtner M, Arakawa Y, Stöckli KA, Kreutzberg GW, Thoenen H (1991) Effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on motoneuron survival. *J Cell Sci Suppl* 15: 103-109.
145. Sendtner M, Schmalbruch H, Stöckli KA, Carroll P, Kreutzberg GW, Thoenen H (1992) Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. *Nature* 358: 502-504.
146. Shaw PJ (2005) Molecular and cellular pathways of neurodegeneration in motor neurone disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76: 1046-1057.
147. Silver DL, Naora H, Liu J, Cheng W, Montell DJ (2004) Activated signal transducer and activator of transcription (STAT) 3: localization in focal adhesions and function in ovarian cancer cell motility. *Cancer Res* 64: 3550-3558.
148. Sleeman MW, Anderson KD, Lambert PD, Yancopoulos GD, Wiegand SJ (2000) The ciliary neurotrophic factor and its receptor, CNTFR alpha. *Pharm Acta Helv* 74: 265-272.
149. Smiley ST, Reers M, Mottola-Hartshorn C, Lin M, Chen A, Smith TW, Steele GD, Jr., Chen LB (1991) Intracellular heterogeneity in mitochondrial membrane potentials revealed by a J-aggregate-forming lipophilic cation JC-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 3671-3675.
150. Sobel A, Bouterin MC, Beretta L, Chneiweiss H, Doye V, Peyro-Saint-Paul H (1989) Intracellular substrates for extracellular signaling. Characterization of a ubiquitous, neuron-enriched phosphoprotein (stathmin). *J Biol Chem* 264: 3765-3772.
151. Solecki DJ, Govek EE, Hatten ME (2006) mPar6 alpha controls neuronal migration. *J Neurosci* 26: 10624-10625.
152. Solecki DJ, Model L, Gaetz J, Kapoor TM, Hatten ME (2004) Par6alpha signaling controls glial-guided neuronal migration. *Nat Neurosci* 7: 1195-1203.
153. Takeda K, Kaisho T, Yoshida N, Takeda J, Kishimoto T, Akira S (1998) Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J Immunol* 161: 4652-4660.
154. Takeda K, Noguchi K, Shi W, Tanaka T, Matsumoto M, Yoshida N, Kishimoto T, Akira S (1997) Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 3801-3804.
155. Takenaka T, Kawakami T, Hikawa N, Gotoh H (1990) Axoplasmic transport of mitochondria in cultured dorsal root ganglion cells. *Brain Res* 528: 285-290.

156. Tian G, Bhamidipati A, Cowan NJ, Lewis SA (1999) Tubulin folding cofactors as GTPase-activating proteins. GTP hydrolysis and the assembly of the alpha/beta-tubulin heterodimer. *J Biol Chem* 274: 24054-24058.
157. Tian G, Huang Y, Rommelaere H, Vandekerckhove J, Ampe C, Cowan NJ (1996) Pathway leading to correctly folded beta-tubulin. *Cell* 86: 287-296.
158. Tian G, Lewis SA, Feierbach B, Stearns T, Rommelaere H, Ampe C, Cowan NJ (1997) Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors. *J Cell Biol* 138: 821-832.
159. Timmons L, Tabara H, Mello CC, Fire AZ (2003) Inducible systemic RNA silencing in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 14: 2972-2983.
160. Tomkins J, Usher P, Slade JY, Ince PG, Curtis A, Bushby K, Shaw PJ (1998) Novel insertion in the KSP region of the neurofilament heavy gene in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Neuroreport* 9: 3967-3970.
161. Treeck HH, Pirsig W (1979) Differentiation of nerve endings in the cochlear nucleus on morphological and experimental basis. *Acta Otolaryngol* 87: 47-60.
162. Tu PH, Raju P, Robinson KA, Gurney ME, Trojanowski JQ, Lee VM (1996) Transgenic mice carrying a human mutant superoxide dismutase transgene develop neuronal cytoskeletal pathology resembling human amyotrophic lateral sclerosis lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3155-3160.
163. Turkson J, Jove R (2000) STAT proteins: novel molecular targets for cancer drug discovery. *Oncogene* 19: 6613-6626.
164. Vallee RB, Bloom GS (1991) Mechanisms of fast and slow axonal transport. *Annu Rev Neurosci* 14: 59-92.
165. Waelter S, Boeddrich A, Lurz R, Scherzinger E, Lueder G, Lehrach H, Wanker EE (2001) Accumulation of mutant huntingtin fragments in aggresome-like inclusion bodies as a result of insufficient protein degradation. *Mol Biol Cell* 12: 1393-1407.
166. Wallesch C-W (2005) *Neurologie. Diagnostik und Therapie in Klinik und Praxis*. München: Elsevier GmbH.
167. White RJ, Reynolds IJ (1996) Mitochondrial depolarization in glutamate-stimulated neurons: an early signal specific to excitotoxin exposure. *J Neurosci* 16: 5688-5697.
168. Williamson TL, Cleveland DW (1999) Slowing of axonal transport is a very early event in the toxicity of ALS-linked SOD1 mutants to motor neurons. *Nat Neurosci* 2: 50-56.
169. Winkler C, Eggert C, Gradl D, Meister G, Giegerich M, Wedlich D, Lagerbauer B, Fischer U (2005) Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy. *Genes Dev* 19: 2320-2330.
170. Wittwer CT, Herrmann MG, Moss AA, Rasmussen RP (1997a) Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification. *BioTechniques* 22: 130-138.
171. Wittwer CT, Ririe KM, Andrew RV, David DA, Gundry RA, Balis UJ (1997b) The LightCycler: a microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. *BioTechniques* 22: 176-181.
172. Xu Z, Cork LC, Griffin JW, Cleveland DW (1993) Increased expression of neurofilament subunit-L produces morphological alterations that resemble the pathology of human motor neuron disease. *Cell* 73: 23-33.

173. Yamada K, Andrews C, Chan WM, McKeown CA, Magli A, de Berardinis T, Loewenstein A, Lazar M, O'Keefe M, Letson R, London A, Ruttum M, Matsumoto N, Saito N, Morris L, Del Monte M, Johnson RH, Uyama E, Houtman WA, de Vries B, Carlow TJ, Hart BL, Krawiecki N, Shoffner J, Vogel MC, Katowitz J, Goldstein SM, Levin AV, Sener EC, Ozturk BT, Akarsu AN, Brodsky MC, Hanisch F, Cruse RP, Zubcov AA, Robb RM, Roggenkaemper P, Gottlob I, Kowal L, Battu R, Traboulsi EI, Franceschini P, Newlin A, Demer JL, Engle EC (2003) Heterozygous mutations of the kinesin KIF21A in congenital fibrosis of the extraocular muscles type 1 (CFEOM1). *Nat Genet* 35: 318-321.
174. Yan Q, Matheson C, Lopez OT (1995) In vivo neurotrophic effects of GDNF on neonatal and adult facial motor neurons. *Nature* 373: 341-344.
175. Zhang B, Tu P, Abtahian F, Trojanowski JQ, Lee VM (1997) Neurofilaments and orthograde transport are reduced in ventral root axons of transgenic mice that express human SOD1 with a G93A mutation. *J Cell Biol* 139: 1307-1315.
176. Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T, Takeda S, Yang HW, Terada S, Nakata T, Takei Y, Saito M, Tsuji S, Hayashi Y, Hirokawa N (2001) Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* 105: 587-597.
177. Zhu Q, Couillard-Despres S, Julien JP (1997) Delayed maturation of regenerating myelinated axons in mice lacking neurofilaments. *Exp Neurol* 148: 299-316.
178. Zhu Q, Lindenbaum M, Levavasseur F, Jacomy H, Julien JP (1998) Disruption of the NF-H gene increases axonal microtubule content and velocity of neurofilament transport: relief of axonopathy resulting from the toxin beta,beta'-iminodipropionitrile. *J Cell Biol* 143: 183-193.
179. Zolessi FR, Poggi L, Wilkinson CJ, Chien CB, Harris WA (2006) Polarization and orientation of retinal ganglion cells in vivo. *Neural Develop* 1: 2.

10 Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre zudem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, 14. März 2007

Florian Bender

11 Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei allen Personen, die mich bei dieser Arbeit und während meiner Zeit am Institut für Klinische Neurobiologie unterstützt haben.

Allen voran gilt der Dank natürlich dem Doktorvater dieser Arbeit, Prof. Dr. Michael Sendtner, der nicht nur durch zahlreiche fachliche Anregungen bis in die Endphase hinein die Gestaltung dieser Arbeit wesentlich beeinflusst hat, sondern der auch für eine mehr als großzügig ausgestattete Arbeitsumgebung verantwortlich zeichnet.

Von meinen Kollegen möchte ich drei herausgreifen, denen ich in besonderer Weise zu Dank verpflichtet bin:

Dr. Natalja Funk, die mir besonders bei molekularbiologischen und biochemischen Problemen zur Seite stand und mich bei meiner Arbeit stets unterstützt hat. Großes Dankeschön!

Katrin Kübert, die mit viel Energie und Ausdauer das Genotypisieren der von mir verwendeten Mauslinien übernommen hat. Sie behielt den Durchblick und bot darüber hinaus immer wieder ihre Unterstützung beim Klonieren, Sequenzieren etc. an.

Dr. Bettina Holtmann, die mir bei der Betreuung der verschiedenen Mauslinien geholfen hat und die maßgeblich an der Herstellung einer TBCE-transgenen Maus beteiligt war.

Meinen Vorgängern und Mitstreitern im TBCE-Projekt: Dr. Heike Bömmel, Diana Raffelsbauer, Sabrina Fritze, Ali Kaya Murat und Saskia Pasedag.

Frau Prof. Dr. Esther Asan und ihren engagierten Mitarbeiterinnen danke ich für die unter sehr großem Zeitaufwand entstandenen, wunderbaren elektronenmikroskopischen Einblicke in die Ultrastruktur von isolierten Motoneuronen.

Ich danke allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts:

Dr. Catja Andreassi, Dr. Katja von Au, Martina Döhler, Dr. Carsten Drepper, Dr. Martin Eppart, Dr. Matthias Fischer, Karin Frebel, Michael Glinka, Judita Grimm, Susanna Heck, Dr. Thomas Herrmann, PD. Dr. Sibylle Jablonka, Katharina Kalus, Elisabeth Karl, Susanne Knorr, Sabrina Loos, Dr. Christine Mais, Elisabeth Martin, Urveen Oberoi-Lehrider, Dr. Wilfried Rossoll, Dr. Christian Porsche, Michaela Pfister, Dirk Pühringer, Jennifer Rath, Yvonne Schleeuber, Christine Schneider, Narayan Subramanian, Prof. Dr. Stefan Wiese.

Ich danke auch ganz herzlich dem zweiten Begutachter meiner Arbeit Prof. Dr. Erich Buchner.

Der DFG, die im Rahmen des SFB 581 diese Arbeit finanziell unterstützt hat.

Mein letzter Dank gilt jenen, denen ich am meisten zu verdanken habe: Thomas und meiner Familie.

12 Lebenslauf

Florian Lothar Paul Bender

Persönliche Daten

geboren am	14.09.1978 in Schweinfurt
Staatsangehörigkeit	deutsch
Familienstand	ledig

Ausbildung

1998 - 2003	Diplomstudiengang Humanbiologie in Marburg Hauptfach Neurobiologie (Neurobiologie, Neurophysiologie, Pharmakologie) Nebenfächer Molekularbiologie und Biologische Psychologie Diplomarbeit: „Funktionelle Charakterisierung der vesikulären Glutamat-Transporter mittels RNA-Interferenz Strategien“
1989 - 1998	Franken – Landschulheim Schloss Gaibach, Gymnasium in Gaibach, Bayern mathematisch-naturwissenschaftlicher Zweig
1985 - 1989	Grundschule Zeilitzheim

Praktische Tätigkeiten

01.10.2003 – 30.04.2007	Wissenschaftlicher Mitarbeiter Institut für Klinische Neurobiologie Julius-Maximilians-Universität Würzburg
2001 -2003	Diverse Anstellungen als studentische Hilfskraft Institut für Anatomie und Zellbiologie Philipps-Universität Marburg

Mitwirkung an Lehrveranstaltungen

2002 - 2003	Anatomisches Institut der Philipps-Universität Marburg - Betreuung von Praktikanten im Institut für Anatomie und Zellbiologie in Marburg - Grundfachpraktikum Neurobiologie für Studierende der Humanbiologie im 6. Semester - Kurs Neuroanatomie für Studierende der Humanbiologie im 4. Semester
-------------	---

- Seminar Neurobiologie für Studierende der Humanbiologie im 3. Semester

Auszeichnungen und Stipendien

- | | |
|-------------------------|---|
| Juni 2001 | Stipendium der Medizinstiftung der Philipps-Universität Marburg zur Durchführung eines studentischen Forschungsprojektes am Department of Academic Anaesthetics, Imperial College London |
| seit August 2000 | e-fellows.net Online Stipendium
Hochschulinitiative der Verlagsgruppe Georg von Holtzbrinck, von McKinsey & Company und der Deutschen Telekom AG |
| Juni 1998 | Preis der Firma Wolf-Agrarhandel für die Facharbeit im Leistungskurs Biologie

Karl - von - Frisch - Preis
verliehen vom Verband Deutscher Biologen e. V.
für „hervorragende Leistungen im Fach Biologie“ |
| Würzburg, 14. März 2007 | Florian Bender |

13 Publikationen

Originalarbeiten

Bender FLP, Funk N, Fischer M, Orel N, Rethwilm A, Sendtner, M:
High-efficiency gene transfer into cultured embryonic motoneurons using a self-inactivating viral vector system.
Histochem Cell Biol 2007; 127(4):439-48

Bender FLP, Mederos y Schnitzler M, Li Y, Ji A, Weihe E, Gudermann T, Schäfer MK-H:
The Temperature-Sensitive Ion Channel TRPV2 is Endogenously Expressed and Functional in the Primary Sensory Cell Line F-11.
Cell Physiol Biochem 2005; 15:183-194

Patent

DE 102004011687 A1
VGLUT-spezifische dsRNA-Verbindungen
Anmelder: Grünenthal GmbH, 52078 Aachen, DE
Erfinder: Gillen C, Bahrenberg G, Christoph T, Weihe E, Schäfer MK-H, Bender F

Entstanden aus meiner Diplomarbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie, Abt. Molekulare Neurowissenschaften, der Philipps-Universität Marburg