

**Aus dem Institut für klinische Neurobiologie der Universität Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Michael Sendtner**

**Differentielle Wirkungen neurotropher Faktoren auf das
Axon - und Dendritenwachstum von Motoneuronen**

Inaugural - Dissertation

**zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der**

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

**vorgelegt von
Saskia Maria Pasedag
aus Bocholt**

Würzburg, Juni 2008

Referent: Prof. Dr. med. Michael Sendtner

Koreferent: Prof. Dr. med. Tiemo Grimm

Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 28.10.2008

Die Promovendin ist Ärztin.

Die kleinen Dinge

Die meisten Menschen
wissen gar nicht, wie schön die Welt ist
und wie viel Pracht in den kleinsten Dingen,
in irgendeiner Blume, einem Stein
einer Baumrinde oder
einem Birkenblatt sich offenbart.

Die erwachsenen Menschen
die Geschäfte und Sorgen haben
und sich mit lauter Kleinigkeiten quälen,
verlieren allmählich den Blick
für diese Reichtümer,
welche die Kinder,
wenn sie aufmerksam und gut sind
bald bemerken und mit
dem ganzen Herzen lieben.

Rainer Maria Rilke

**Meinen Eltern, meiner Schwester Marijke und meiner Nichte Emily, die mir
stets die Augen für die großen und kleinen Wunder der Welt geöffnet
haben**

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Akt	v-Akt Murine Thymoma Viral Oncogen Homolog 1
ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
AMPA	α -Amino-3-Hydroxy-5-Methyl-4-Isoxazolepropionic Acid
BDNF	Brain Derived Neurotrophic Factor
BSA	Bovines Serum Albumin
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
CaMKII	Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CLC	Cardiotrophin Like Cytokine
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CNTRF	Ciliary Neurotrophic Factor Rezeptor
CT-1	Cardiotrophin 1
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
(E)13,5	Tag 13,5 der Embryonalentwicklung der Maus
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
FAK	Fokale Adhäsion Kinase
FRS2	Fibroblast Growth Factor Substrate 2
FYN	Fyn Tyrosinkinase Protoonkogen (Syn)
GDNF	Glial Cell Derived Neurotrophic Factor
GFR α	GDNF Factor Receptor α
GluR2	Glutamat Rezeptor 2
Grb	Growth Factor Receptor Bound Protein
gp	Glykoprotein
GPI	Glykosyl-phosphatidyl-Inositol
Hsp90	Heat shock protein 90
JAK 1	Janus Kinase 1
K _D	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
k.o.	knock out
l	Liter

Abkürzungsverzeichnis

LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LIFR β	Leukemia Inhibitory Factor Receptor β
LYN	V-Yes-1 Yamaguchi Sarcoma Viral Related Oncogen Homolog
MAPK	Mitogen Activating Protein Kinase
Met	Met Oncogen / Hepatocyte Growth Factor Receptor
Min	Minuten
ml	Milliliter
Mm.	Musculi
N.	Nervus
Nn.	Nervi
NBQX	2,3-Dihydroxy-6-Nitro-7-Sulfamoyl-Benzo[f]Quinoxalin
NCAM	Neuronal Cell Adhesion Molecule
NGF	Neuronal Growth Factor
NMRI	Naval Medical Research Institute
NT-3	Neurotrophin 3
NT-4/5	Neurotrophin 4/5
p75 NTR	p75 Neurotrophin Rezeptor
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PI-3	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
pmn	Progressive Motoneuronopathie
p-Ret	phosphoryliertes Ret
p-Stat3	phosphoryliertes Stat3
p-TrkB	phosphoryliertes TrkB
Rab 5	Ras assoziiertes Protein 5
Ret	Rezeptor Tyrosin Kinase
RT	Raumtemperatur
SEM	Standard Error of the Mean
Shc	Src Homologous and Collagen Like Protein
SMA	Spinale Muskelatrophie

Sos	Son Of Sevenless
Stat3	Signal Transducer and Activator of Transkription 3
T _a	Annealing Temperatur
TBCE	Tubulin spezifischer Chaperone E
TGFβ	Transforming Growth Factor-β
TrkB	Tropomyosin related kinase B
Tau	Tubulin associated Unit
WGA	Weizenkeim Agglutinin (Lektin)
Wt	Wildtyp

INHALTSVERZEICHNIS

1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Neurodegenerative Erkrankungen des Motoneurons	1
1.1.1 Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)	1
1.1.2 Spinale Muskelatrophie (SMA)	4
1.2 Die <i>pmn</i> Maus als Modell für degenerative Motoneuronenerkrankungen 5	5
1.2.1 Genetik und Pathophysiologie der <i>pmn</i> Maus	6
1.2.2 <i>pmn</i> Motoneurone <i>in vitro</i>	8
1.3 Neurotrophe Faktoren.....	8
1.3.1 BDNF	9
1.3.2 CNTF	12
1.3.3 GDNF.....	14
1.4 Therapieansätze mit neurotrophen Faktoren am <i>pmn</i> Mausmodell	17
1.5 Fragestellung der Arbeit	19
2 MATERIAL UND METHODIK.....	22
2.1 Material.....	22
2.1.1 Verbrauchsmaterialien	22
2.1.2 Chemikalien	22
2.1.3 Reagenzien für Zellkultur und Immunfluoreszenz	25
2.1.4 Enzyme, Primer und Antikörper	26
2.1.5 Kits.....	27
2.1.6 Mausstämme und genetisch veränderte Mauslinien.....	27
2.2 Methodik.....	28
2.2.1 Calciumphosphat-vermittelte Transfektion von HEK 293T mit TrkB	28

2.2.2 Zellkultur primärer embryonaler Motoneuronen	29
2.2.2.1 Isolation embryonaler Motoneuronen einer Maus.....	29
2.2.2.2 Isolierung der Motoneurone durch Panning mit Lektin.....	29
2.2.2.3 Zellkultur primärer Motoneurone	30
2.2.2.4 Fixierung der Zellkultur	31
2.2.2.5 Indirekte Immunfluoreszenz der primären Motoneuronzellkultur	31
2.2.3 Herstellung und indirekte Immunfluoreszenz der Gefrierschnitte.....	32
2.2.4 Herstellung und indirekte Immunfluoreszenz von gezupften Muskelfasern.....	32
2.2.5 Genotypisierung der <i>pmn</i> Maus.....	33
2.2.5.1 DNA-Isolierung	33
2.2.5.2 <i>Tbce</i> PCR	34
2.2.5.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese	34
2.2.5.4 <i>Tbce</i> Sequenzierung.....	35
2.2.6 Mikroskopie und statistische Auswertung	35
3 ERGEBNISSE.....	37
3.1 Lokalisation des BDNF, CNTF und GDNF Rezeptors auf Axonen und Dendriten von primären Motoneuronen	37
3.1.1 Charakterisierung und Spezifitätsbestimmung des p-TrkB Antikörpers	38
3.1.2 Subzelluläre Lokalisation von TrkB und p-TrkB auf kultivierten Motoneuronen.....	40
3.1.2.1 TrkB ist im Perikaryon, auf Dendriten und im Wachstumskegel in hoher Intensität und im Axon in geringerer Intensität lokalisiert.....	41
3.1.2.2 p-TrkB ist in vesikulären Strukturen im Perikaryon, auf Dendriten und im Axon in hoher Intensität lokalisiert.....	42
3.1.3 Subzelluläre Lokalisation von gp130 und Stat3 auf kultivierten Motoneuronen.....	45
3.1.3.1 Gp 130 ist im Perikaryon, auf Dendriten und im Wachstumsskegel in höherer Intensität als im Axon von Motoneuronen lokalisiert.....	45
3.1.3.2 p-Stat3 ist in hoher Intensität im Perikaryon, auf Dendriten und im Axon lokalisiert.....	46

3.1.4 Subzelluläre Lokalisation von c-Ret und p-Ret auf kultivierten Motoneuronen.....	49
3.1.4.1 c-Ret ist an der Oberfläche des Perikaryons, im Wachstumskegel und besonders stark auf den Dendriten lokalisiert	49
3.1.4.2 p-Ret ist im Perikaryon, im Wachstumskegel und besonders stark auf den Dendriten lokalisiert	50
3.2 Lokalisation der Rezeptoren neurotropher Faktoren <i>in vivo</i>.....	53
3.2.1 <i>In vivo</i> Lokalisation der Rezeptoren für neurotrophe Faktoren im lumbalen Rückenmark	53
3.2.2 <i>In vivo</i> Lokalisation der Rezeptoren für neurotrophe Faktoren an der Axonterminale motorischer Endplatten	57
3.2.3 <i>In vivo</i> Lokalisation der Rezeptoren für neurotrophe Faktoren in peripheren Nerven	60
3.3 Differentielle Effekte von BDNF, CNTF und GDNF auf das Neuritenwachstum embryonaler Motoneurone	67
3.3.1 GDNF stimuliert das Dendritenwachstum bei isolierten Motoneuronen stärker als BDNF und CNTF	67
3.3.2 BDNF, CNTF und GDNF unterscheiden sich nicht in ihrer Wirkung auf das Axonwachstum bei isolierten Motoneuronen.....	68
3.4 Effekt des glutamatergen AMPA Rezeptors auf das Neuritenwachstum embryonaler Motoneurone	70
3.4.1 AMPA verstärkt das CNTF induzierte Dendritenwachstum bei primären Motoneuronen.....	71
3.4.2 Der AMPA-Rezeptorantagonist NBQX vermindert das GDNF stimulierte Dendritenwachstum bei primären Motoneuronen	72
3.4.3 Der AMPA-Rezeptorantagonist NBQX hat keinen Einfluss auf das Axonwachstum von primären Motoneuronen.....	75
3.4.4 Der AMPA-Rezeptorantagonist NBQX hat keinen Einfluss auf das Axonwachstum von primären Motoneuronen.....	76

3.5 Differentielle Effekte von BDNF, CNTF und GDNF auf den axonalen Wachstumsdefekt bei <i>pmn</i> Motoneuronen	78
3.5.1 CNTF kompensiert den axonalen Wachstumsdefekt von <i>pmn</i> Motoneuronen.....	79
3.5.2 CNTF reduziert die pathologischen axonalen Schwellungen bei <i>pmn</i> Motoneuronen	82
4 DISKUSSION.....	85
4. 1 TrkB, p-TrkB, gp130 und p-Stat3 sind im Perikaryon, in Dendriten, im Axon und an der Axonterminalen von Motoneuronen lokalisiert	85
4.2 Ret und p-Ret sind auf Dendriten, im Perikaryon und an der Axonterminalen von Motoneuronen lokalisiert, nicht aber im Axon .	90
4.3 GDNF stimuliert das Dendritenwachstum von Motoneuronen stärker als BDNF und CNTF	93
4.4 Der AMPA-Rezeptorantagonist NBQX hebt das durch GDNF vermittelte Dendritenwachstum auf.....	95
4.5 CNTF hebt das axonale Wachstumsdefizit bei <i>pmn</i> Motoneuronen auf und verringert die Anzahl der axonalen Schwellungen	99
4.6 Implikationen für weitere klinische Studien und Ausblick	103
5 ZUSAMMENFASSUNG.....	106
6 LITERATURVERZEICHNIS.....	108

1 EINLEITUNG

1.1 Neurodegenerative Erkrankungen des Motoneurons

1.1.1 Amyotrophe Lateralsklerose (ALS)

Die Amyotrophe Lateralsklerose ist die häufigste Motoneuronerkrankung des Erwachsenen und tritt mit einer Inzidenz von 2:100.000 in Europa auf (Ekestern, 2004). Es werden verschiedene Formen der ALS unterschieden: sporadische Formen (90%), familiäre Formen (10%), sowie eine guamische Form. Die charakteristischen Symptome der ALS wurden bereits im 19. Jahrhundert durch Jean Martin Charcot beschrieben (Charcot and Joffroy, 1869). Kennzeichnend für das Krankheitsbild der ALS ist das Nebeneinander von atropen Paresen infolge der Degeneration des ersten Motoneurons sowie spastischen Tonuserhöhungen durch den Untergang des zweiten Motoneurons. Zusätzlich können auch bulbäre Symptome auftreten, die als Zeichen der Beteiligung motorischer Hirnnervenkerne zu werten sind. Die ALS hat eine sehr schlechte Prognose; die Hälfte der Patienten stirbt innerhalb von 18 Monaten nach Diagnosestellung und nur etwa 10% überleben länger als 10 Jahre (Rowland and Shneider, 2001). Der Tod der ALS Patienten tritt durch respiratorische Insuffizienz mit terminaler Hyperkapnie infolge der Lähmung der Atemmuskulatur ein. Das histopathologische Hauptmerkmal der ALS ist die selektive Degeneration der Motoneurone im Vorderhorn des Rückenmarks und der motorischen Hirnnervenkerne. Zusätzlich kommen in etwa 70% der Fälle Bunina Körperchen und ubiquitinierte Einschlüsse in den Zellkörpern der Motoneurone vor. In den Axonen spinaler Motoneurone finden sich außerdem typische Schwellungen, die ungeordnete phosphorylierte und unphosphorylierte Neurofilamente enthalten (Rowland and Shneider, 2001).

Die Ursache dieser selektiven Motoneurondegeneration ist heute noch weitgehend unbekannt. Neben exzitotoxischen Faktoren (Van Den et al., 2006), Störungen der Detoxifizierung gefährlicher Sauerstoffradikale (Liochev and

Fridovich, 2003), chronischer Inflammation, mitochondrialer Dysfunktion und Fehlregulation von Neurofilamenten werden auch Störungen des axonalen Transportes diskutiert (Bruijn et al., 2004). Auch die Frage, warum gerade die Motoneurone selektiv von der Degeneration betroffen sind, während sensible und sensorische Neurone von der Degeneration verschont bleiben, konnte bislang nicht zufrieden stellend beantwortet werden.

Unter den familiären Formen der ALS ist die Mutation des *SOD-1* Gens (Cu-Zn-Superoxiddismutase) die häufigste beschriebene Genveränderung (Siddique et al., 1996; Deng et al., 1993; Rosen et al., 1993). Diese *SOD-1* Mutation ist für etwa 20% der familiären ALS Formen verantwortlich. Für die übrigen 80% der familiären Formen sind eine Vielzahl von genetischen Mutationen bekannt, die autosomal dominant oder autosomal rezessiv vererbt werden (Kunst, 2004). Interessanterweise betreffen drei dieser Mutationen Proteine, die für die axonale Integrität bzw. den axonalen Transport von Bedeutung sind. Ein intakter axonaler Transport ist gerade für Motoneurone von essentieller Bedeutung, da die Axone menschlicher Motoneurone bis zu 100 cm lang werden können. Der axonale Transport ist dabei einerseits für die anterograde Versorgung der motorischen Endplatte mit Organellen und Proteinen notwendig, andererseits aber auch für die retrograde Versorgung des Zellkörpers mit trophischen Signalen aus der Peripherie. Die Basis des axonalen Transportes bildet ein filamentöses Netzwerk aus Zytoskelettproteinen (wie den Mikrotubuli und Neurofilamenten) und Transportproteinen (wie Dynein und Kinesin).

Die ersten Hinweise auf eine mögliche Beeinträchtigung des Zytoskeletts bei einer autosomal rezessiv vererbten ALS Form lieferte die Entdeckung einer Mutation in *ALSIN* (Hadano et al., 2001; Yang et al., 2001). Die Funktion von Alsln ist noch nicht genau bekannt. Alsln fungiert wahrscheinlich als Guanin Austausch Faktor für Rab5 und scheint für die Dynamik endosomaler Prozesse wichtig zu sein (Kunita et al., 2004).

Eine zweite Mutation in einem Protein für den axonalen Transport wurde in einer autosomal dominanten ALS Form beschrieben. Dabei liegt eine G59S Mutation im *DCTN1*-Gen (Dynaktin-Gen) vor. Die Mutation liegt in einer hochkonservierten Domäne, die für die Bindung von Dynaktin an die Mikrotubuli notwendig ist. Diese Bindung sowie die Interaktion zwischen Dynaktin und Dynein ist für den retrograden axonalen Transport von Vesikeln und Organellen von großer Bedeutung (Puls et al., 2003).

Für eine kleine Gruppe von familiärer ALS ist eine Mutation in dem *NFH*-Gen (Neurofilament-Heavy) beschrieben (Al-Chalabi et al., 1999). Neurofilamente bestimmen die Größe und Gestalt der Motoneuronen sowie ihrer Neuriten. Des Weiteren spielen sie eine wichtige Rolle für den axonalen Transport. Dicke Axone, die reich an Neurofilamenten sind, werden vorzugsweise von der ALS betroffen. Diese Beobachtung führte zu der Hypothese, dass die Menge der Neurofilamente für die selektive Vulnerabilität der Motoneurone verantwortlich ist. Die ungeordnete Akkumulation von Neurofilamenten in den Zellkörpern und Axonen der Motoneurone ist eines der zentralen Charakteristika der ALS (Rouleau et al., 1996). Die unorganisierten Neurofilamente behindern unter anderem den axonalen Transport von Proteinen, die notwendig für die Instandhaltung der Axone sind, wie Tau und Aktin (sog. axonale Strangulation) (Collard et al., 1995). Unklar bleibt dabei, ob die pathologische Ansammlung der ungeordneten Neurofilamente die kausale Ursache oder nur ein Nebenprodukt der neuronalen Degeneration darstellt.

Im 20. Jahrhundert sorgte eine spezielle Form der ALS bei den Chamorro Einwohnern von Guam für 50-fach höhere Inzidenzzahlen als in Europa (Trojanowski et al., 2002). Ursächlich für die hohe ALS Inzidenz auf der Insel Guam scheint eine zugrunde liegende Tauopathie zu sein. Klinisch ist die guamische ALS in einem Teil der Fälle mit einem Parkinson-Demenz-Komplex assoziiert. Auch die Neuropathologie weist bezeichnende Merkmale auf. In den Motoneuronen sind zahlreiche Einschlüsse von hyperphosphorylierten aggregierten Tauproteinen lokalisiert, insbesondere im Axon der spinalen

Motoneurone (Trojanowski et al., 2002). Normalerweise bindet Tau an Mikrotubuli und sorgt so für die Stabilisierung der polymerisierten Mikrotubuli. Das hyperphosphorylierte Tau kann diese wichtigen Funktionen jedoch nicht mehr ausüben und fällt stattdessen als unlösliche Proteinaggregate in Neuriten aus (Galasko et al., 2002). Die hyperphosphorylierten Tauaggregate führen dann zur Degeneration der spinalen Motoneurone. Interessanterweise kommen diese Aggregate aber auch in (noch) nicht degenerierten Motoneuronen vor, so dass der Verlust der axonalen Integrität der Apoptose der Motoneurone vorausgeht (Trojanowski et al., 2002).

1.1.2 Spinale Muskelatrophie (SMA)

Während die ALS vorwiegend Erwachsene betrifft, ist die spinale Muskelatrophie (SMA) überwiegend eine pädiatrische Motoneuronenerkrankung, die autosomal rezessiv vererbt wird. Die SMA tritt mit einer Inzidenz von 1:8000 in Deutschland auf und ist damit nach den Dystrophinopathien die zweithäufigste neuromuskuläre Erkrankung des Kindesalters. Der zugrunde liegende Defekt im *SMN* Gen (Survival of Motoneuron) liegt auf dem langen Arm des Chromosoms 5 in zwei Kopien vor: *SMN1* und *SMN2* (Endrizzi et al., 1999; Lefebvre et al., 1995). Dabei kodiert nur *SMN1* zu 100% für ein voll funktionsfähiges Protein. Im Gegensatz dazu wird das *SMN2* Transkript aufgrund eines Polymorphismus im Exon 7 alternativ gespleißt und daher nur zu 10% in funktionsfähiges Protein translatiert. Bei der überwiegenden Mehrzahl der SMA Patienten kommt es durch nicht homologe Rekombinationen zwischen *SMN1* und *SMN2* zu einem Verlust des wichtigen *SMN1* Gens. Bei etwa 5% der SMA Patienten liegt eine Punktmutation direkt im *SMN1* Gen vor. Aufgrund der geringen Menge des resultierenden funktionsfähigen SMN Proteins, kann der *SMN1* Verlust nicht durch *SMN2* kompensiert werden, so dass die Motoneurone degenerieren (Monani et al., 1999; Lorson et al., 1999). Die Funktion des SMN Proteins liegt im Aufbau des spliceosomalen Komplexes (Liu and Dreyfuss, 1996; Jablonka et al., 2004). Je nach Alter bei Krankheitsbeginn und Schwere der Erkrankung werden vier Typen der SMA

unterschieden (Cole and Siddique, 1999). Patienten, die an SMA Typ I (Werdnig-Hoffmansche Erkrankung) erkranken, werden in der Regel noch vor dem sechsten Lebensmonat diagnostiziert und sind am schwersten betroffen. Durch den Untergang der Motoneurone kommt es zu atrophen Paresen der gesamten Skelettmuskulatur einschließlich der Schluckmuskulatur und der Mm. intercostales. Die betroffenen Kinder versterben daher meistens noch im Kleinkindesalter an respiratorischer Insuffizienz.

1.2 Die *pmn* Maus als Modell für degenerative Motoneuronenerkrankungen

Ein Mausmodell für degenerative Motoneuronenerkrankungen wie ALS und SMA entstand durch eine Spontanmutation in einer NMRI Mauskolonie (Naval Medical Research Institute) am Panum Institut in Dänemark. 1991 wurde diese Mutation erstmals beschrieben und die betroffenen Tiere als „progressive Motoneuronopathie“ (*pmn*) Mäuse bezeichnet (Schmalbruch et al., 1991). Das Krankheitsbild der *pmn* Mäuse wird autosomal rezessiv vererbt. Homozygot-krankte *pmn* Mäuse weisen viele Gemeinsamkeiten mit menschlichen Motoneuronenerkrankungen auf. Ein wichtiger Vorteil bei der Verwendung von Mausmodellen zur Erforschung humaner Krankheiten ist, dass der gesamte Verlauf einer Erkrankung beobachtet werden kann, sogar noch ehe die ersten klinischen Symptome auftreten.

Homozygot-krankte *pmn* Mäuse (im Folgenden als *pmn* Mäuse bezeichnet) entwickeln etwa zwei Wochen nach Geburt progressive Paresen, die zunächst die hinteren Extremitäten betreffen. Die Erkrankung breitet sich dann rasch auf die proximalen Muskelgruppen aus, befällt auch die Atemmuskulatur und führt schließlich in der vierten bis sechsten Lebenswoche zum Tode. Histopathologisch zeigt sich sowohl eine Atrophie der Axone peripherer Nerven, als auch ein Verlust von Motoneuronperikarya im Rückenmark und den motorischen Hirnnervenkernen (Sendtner et al., 1992a). Außerdem lässt sich die spezifische Degeneration der Motoneurone auch im Nucleus ruber nachweisen (Schmalbruch et al., 1991). Den Motoneuronen dieses Kerns

kommt bei Nagetieren eine besondere Bedeutung durch das funktionelle Zusammenspiel des Tractus rubrospinalis mit dem Tractus corticospinalis zu. In diesem Sinne lässt er sich funktional mit dem 1. Motoneuron in höheren Wirbeltieren vergleichen, da er signifikant zur Innervation der spinalen Motoneurone beiträgt.

Ursächlich für die Erkrankung der *p_{mn}* Mäuse ist aber nicht der Verlust der Motoneurone, sondern die Dysfunktion der verbleibenden Neurone. Bereits mit Beginn der ersten Symptome ist eine Verminderung des retrograden Transports von Fluorogoldpartikeln zu erkennen und das zu einem Zeitpunkt, wo noch keine apoptotischen Motoneurone detektiert werden können (Sagot et al., 1998c; Holtmann et al., 1999). Es scheint daher eine klare Korrelation zwischen dem axonalen Transportdefekt (bzw. einem Aufnahmedefekt in der Peripherie) und den klinischen Symptomen zu geben. Auf zellulärer Ebene beginnt die Erkrankung an der motorischen Endplatte und setzt sich dann retrograd in den Axonen fort. Daher wird die Erkrankung der *p_{mn}* Mäuse auch als „dying back“ Neuronopathie bezeichnet (Schmalbruch et al., 1991).

1.2.1 Genetik und Pathophysiologie der *p_{mn}* Maus

Der genetische Defekt der *p_{mn}* Maus beruht auf einer autosomal rezessiv vererbten Mutation im *Tubulin spezifischen Chaperone E (Tbce)* Gen (Martin et al., 2002; Bommel et al., 2002). Durch Sequenzanalysen konnte nachgewiesen werden, dass lediglich eine Thymin zu Guanin Punktmutation an der Stelle 1682 des *Tbce* Gens auf dem Mauschromosom 13 für den Phänotyp der *p_{mn}* Maus verantwortlich ist (Bommel et al., 2002). Diese Punktmutation führt zum Einbau eines Glycins anstelle eines Tryptophans an der letzten Stelle (524. Stelle) des *Tbce* Proteins, wodurch sich die biochemischen Eigenschaften des Carboxyterminalen Endes des *Tbce* Proteins verändern.

Das *Tbce* Protein spielt eine wichtige Rolle beim Aufbau der Mikrotubuli. Mikrotubuli sind essentielle ubiquitäre Zytoskelettproteine, die vor allem bei der

Zellteilung, dem architektonischen Aufbau und dem axonalen Transport der Zelle wichtig sind. Mikrotubuli enthalten spiralg angeordnete, polymerisierte Heterodimere, die aus α -Tubulin und β -Tubulin bestehen. Nur wenn diese kleinsten Bausteine korrekt zusammengelagert werden, können sich die Mikrotubuli in ihrer ganzen Länge ausbilden.

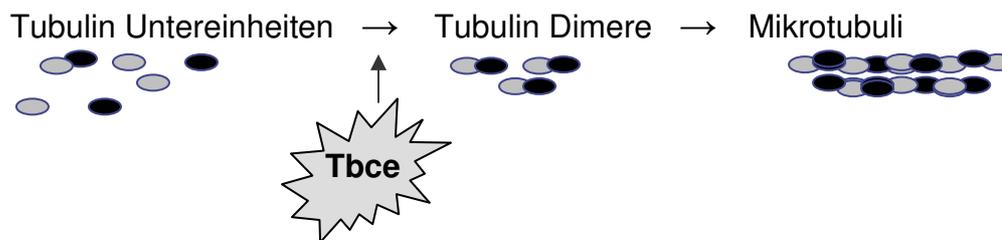


Abbildung 1: Funktion des Tbce Proteins.

Tbce ist einer von vier Kofaktoren, der für die richtige Dimerisierung der α -Tubuline mit den β -Tubulinen verantwortlich ist. Nur wenn die Tubulineinheiten richtig dimerisiert sind, können sich Mikrotubuli in voller Länge ausbilden.

Das Tbce Protein bindet an die α -Tubulin Einheit und unterstützt somit die Dimerisierung mit der β -Tubulin Untereinheit (Tian et al., 1996). Es trägt also mit anderen Proteinen dazu bei, dass die neuen Tubuline ihre richtige dreidimensionale Struktur erreichen und bewahren können, um sich zu den polymerisierten Mikrotubulisträngen zusammenlagern zu können. Gerade in Motoneuronen kommt den Mikrotubuli eine besondere Aufgabe zu, da aufgrund der Größe der Zelle, Nährstoffe, Überlebens- und Wachstumssignale über weite Distanzen transportiert werden müssen. Die Integrität der Mikrotubuli in Motoneuronen ist daher sowohl für den schnellen anterograden als auch retrograden Transport von essentieller Bedeutung. Tbce wird in embryonalem Mausgewebe (E13,5) ubiquitär exprimiert. Durch Westernblot Analysen konnte gezeigt werden, dass neuronales Gewebe, wie Gehirn und Rückenmark, eine besonders starke Expression von Tbce aufweist (Diplomarbeit Murat Kaya, 2004).

1.2.2 *pmn* Motoneurone *in vitro*

Pmn Motoneurone weisen in der Zellkultur charakteristische Merkmale auf. Während das Überleben embryonaler *pmn* Motoneurone gegenüber Wildtyp Motoneuronen *in vitro* nicht verändert ist, zeichnen sich *pmn* Motoneurone durch einen drastischen axonalen Wachstumsdefekt aus. Die Axone embryonaler *pmn* Motoneurone sind mehr als 50% kürzer als die Axone embryonaler Wildtyp Motoneurone (Bommel et al., 2002). Weiterhin zeigen sich spezifische axonale Schwellungen, die sich immunhistochemisch irregulär mit Tau und Tubulin spezifischen Antikörpern anfärben lassen (Bommel et al., 2002). Die kennzeichnenden Unregelmäßigkeiten im Färbeverhalten dieser Schwellungen weisen Ähnlichkeiten mit den typischen Proteinaggregaten auf, die häufig bei ALS Patienten zu finden sind (Chou, 1992). Die Größe und Morphologie der Wachstumskegel der *pmn* Motoneurone dagegen weisen keinen Unterschied zu denen der Wildtyp Motoneurone auf (Bommel et al., 2002; Jablonka et al., 2004).

1.3 Neurotrophe Faktoren

Neurotrophe Faktoren sind kleine Proteine, die durch hochspezifische Bindung an bestimmte Rezeptoren das Überleben von Neuronen sichern. Dazu werden die neurotrophen Faktoren in geringsten Mengen (weniger als 1 ng/ml) vom Zielgewebe produziert. Während der Embryonalentwicklung der Maus werden ursprünglich etwa doppelt so viele Motoneurone angelegt wie benötigt; die begrenzte Verfügbarkeit der neurotrophen Faktoren führt somit zur Selektionierung der zum Überleben bestimmten Neurone. Der erste entdeckte neurotrophe Faktor war 1954 der Nerve Growth Faktor (NGF) (Levi-Montalcini et al., 1954), der während der Embryonalentwicklung die Apoptose sensorischer und sympathischer Neurone verhindert. Erst etwa 30 Jahre später wurden weitere Überlebensfaktoren für Neurone entdeckt, die aufgrund struktureller Ähnlichkeiten mit NGF der Familie der Neurotrophine zugeordnet wurden: der Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF), Neurotrophin 3 (NT-3),

Neurotrophin 4/5 sowie die Neurotrophine 6 und 7, die bislang nur bei Fischen identifiziert werden konnten. Später wurden weitere neurotrophe Faktoren entdeckt, die sich nicht in die Familie der Neurotrophine einordnen ließen. Zur Familie der Neurozytokine gehören Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), Cardiotrophin, Leukemia Inhibitory Factor sowie Cardiotrophin Like Cytokine. Eine dritte Gruppe von neurotrophen Faktoren findet sich in der TGF- β Superfamilie, zu der unter anderem Glial Cell Derived Neurotrophic Factor (GDNF), Neurturin, Persephin und Artemin zählen (Ekestern, 2004).

Neuere Forschungen zeigen aber, dass sich die Funktion der neurotrophen Faktoren nicht auf die Förderung des Überlebens von Neuronen beschränkt, sondern dass sie vielfältige Auswirkungen auf das ZNS und darüber hinaus besitzen. Beispiele hierfür sind die Stimulierung des Axon- und Dendritenwachstums, die Stabilität und Erregbarkeit von Synapsen, die nervale Regeneration nach Axotomie und die Differenzierung von Neuronen.

1.3.1 BDNF

BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) ist ein nicht-glykolysiertes Polypeptid aus 119 Aminosäuren und wurde als zweites Mitglied der Neurotrophinfamilie entdeckt (Barde et al., 1982).

Erst nach der extrazellulären Spaltung der Proform kann BDNF mit hoher Affinität an seinen spezifischen Tropomyosin related kinase Rezeptor B (TrkB) binden (Lee and Chao, 2001). Dieser TrkB Rezeptor wird im ZNS neben neuronalen Vorläuferzellen und Pyramidenzellen des Hippocampus vor allem von Motoneuronen exprimiert. Nach Bindung des Liganden an TrkB führt die Dimerisierung zur Autophosphorylierung des Tyrosinkinase Rezeptors (Soppet et al., 1991; Squinto et al., 1991). Dadurch werden verschiedene Wege der Signaltransduktion eingeschlagen. Einerseits wird Ras aktiviert, welches über Raf die MAPK phosphoryliert. Andererseits wird über den PI-3 Kinase Weg auch Akt rekrutiert, welches als Transkriptionsfaktor Apoptose verhindert (Douma et

al., 2004). Drittens bewirkt die BDNF Bindung auch die Erhöhung des intrazellulären Kalziums durch den PLC und PKC Weg.

Ein zentrales Thema der Neurotrophin Hypothese besagt, dass neuronales Überleben und Differenzierung auf den retrograden Transport der trophischen Faktoren aus dem Zielgewebe angewiesen ist (Levi-Montalcini, 1966; Levi-Montalcini, 1987). Dazu werden die Trk Rezeptoren nach Ligandenbindung mittels der GTPase Dynamin in Endozytosevesikel aufgenommen (Zhang et al., 2000). Die internalisierten Trk-Neurotrophin-Komplexe werden dann sortiert und entweder retrograd transportiert oder dem Recycling Weg zugeführt. Es konnte gezeigt werden, dass Neurotrophine während des retrograden Transportes am aktivierten Trk Rezeptor gebunden bleiben (Tsui-Pierchala and Ginty, 1999; Delcroix et al., 2003). Der retrograde Transport der Trk Vesikel erfolgt Mikrotubuli abhängig und involviert Dynein. Neu synthetisierte Trk Rezeptoren passieren den Golgi Apparat und werden dann entweder anterograd mittels Kinesin entlang der Mikrotubuli zu den Axonterminalen transportiert oder in die Dendriten delegiert. Auf welche Art die gezielte Delegation in Axon oder Dendrit erfolgt, ist noch nicht bekannt. Die Rekrutierung von TrkB Rezeptoren aus dem intrazellulären Pool an die Oberfläche des Zellkörpers wird durch neuronale Aktivität moduliert und involviert eine Vielzahl von Faktoren wie cAMP, Kalzium und CaMKII. Die Delegation der Trk Rezeptoren in subzelluläre Kompartimente der Zelle sowie die exakte Lokalisation innerhalb der Zelle ist wichtig für den Effekt des Neurotrophins auf das Motoneuron (Übersicht in (Yano and Chao, 2004). Im Nervensystem wird BDNF von verschiedenen Zellen exprimiert und sezerniert, unter anderem von Fibroblasten, Astrozyten, Schwannzellen und verschiedenen Neuronen. BDNF ist ein wichtiges Überlebenssignal für Motoneurone (Novikov et al., 1997; Becker et al., 1998).

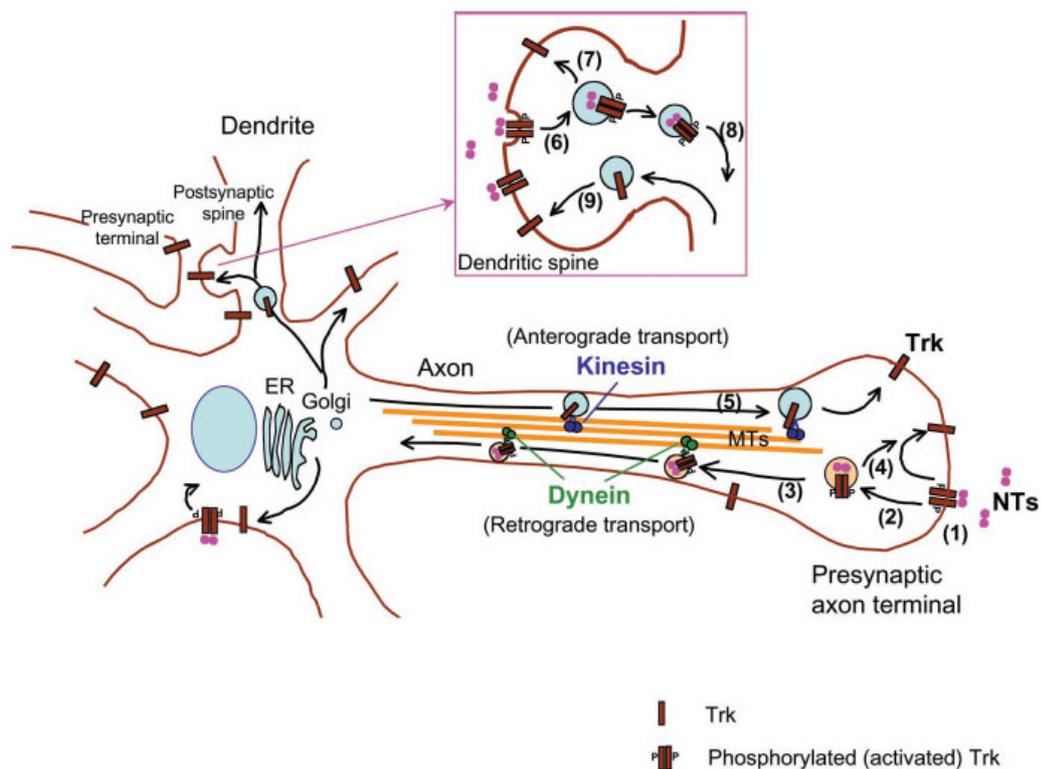


Abbildung 2: Modell der Delegation und Prozessierung von Neurotrophinen und deren Rezeptoren mittels retrograden und anterograden Transport (Yano and Chao, 2004).

Der antiapoptotische Effekt wird dabei von der Peripherie über den retrograden Transport an das trophische Zentrum im Zellkörper übermittelt. BDNF unterstützt auch das Überleben von embryonalen Motoneuronen (Wong et al., 1993). Des Weiteren ist BDNF in der Lage Motoneurone, vor Axotomie-induzierter und physiologischer Apoptose zu schützen (Clatterbuck et al., 1994). Die Applikation von BDNF führt außerdem zu einer beeindruckenden Förderung der Regeneration des peripheren Nerven nach Axotomie (Boyd and Gordon, 2003). Neben seiner Funktion als Überlebenssignal stimuliert BDNF auch das axonale Wachstum von Motoneuronen (Braun et al., 1996), sowie Verzweigungen der Neuriten (Steljes et al., 1999). BDNF wird aber nicht nur retrograd, sondern auch anterograd transportiert. Nach aktiver Sekretion aus den Axonterminalen der Motoneurone kann BDNF auf diese Weise auch postsynaptische TrkB Rezeptoren aktivieren (Kohara et al., 2001).

1.3.2 CNTF

CNTF (Ciliary Neurotrophic Factor) ist ein aus 200 Aminosäuren bestehendes Polypeptid und zählt zur Familie der Neurozytokine. Seine spezifische Wirkung entfaltet der Überlebensfaktor über den CNTF-Rezeptorkomplex, der im ZNS, Skelett- und Herzmuskel exprimiert wird (Davis et al., 1991; Raju et al., 2006). Der vollständig assemblierte CNTF Rezeptor ist ein dreiteiliger Proteinkomplex, der aus der CNTFR α -Untereinheit, dem Glykoprotein gp130 und der strukturell verwandten LIFR β -Untereinheit besteht. CNTF bindet dabei an CNTFR α , die lediglich mittels GPI in der Zellmembran verankert ist und daher keine intrinsische Fähigkeit zur Signaltransduktion besitzt. Diese Bindung an CNTFR α führt zur Heterodimerisierung von gp130 und LIFR β , welche die Signaltransduktion einleiten. Anschließend assoziiert JAK mit der zytoplasmatischen Domäne von gp130. Diese Tyrosinphosphorylierung aktiviert mehrere intrazelluläre Signalmoleküle wie Stat3, einen DNA bindenden Transkriptionsaktivator. Aktiviertes Stat3 wandert dann in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor auf potentielle Zielgene wie die antiapoptotischen Bcl-xl und Hsp90 wirkt (Stephanou et al., 1998); (Kuroda et al., 2001; Raju et al., 2006). Neben der Phosphorylierung von Stat3, führt die Aktivierung von gp130 auch zur Stimulierung der PI3-Kinase und der MAP-Kinase.

Im ZNS hat CNTF vielschichtige Funktionen: namensgebend war seine Funktion als Überlebensfaktor für die Neurone des Ganglion ciliare (Barbin et al., 1984). Die Expression und Sekretion von CNTF findet im Organismus erst postnatal statt. Dagegen wird der CNTF Rezeptor auch schon pränatal exprimiert und scheint eine wichtige Rolle für die Entwicklung des ZNS zu spielen. Der physiologische Ligand des CNTF Rezeptors während der Embryonalperiode ist aber noch nicht bekannt (DeChiara et al., 1995). Postnatal sind Schwannzellen und Astrozyten die reichsten Quellen an CNTF. Diese Gliazellen produzieren große Mengen von CNTF und tragen dadurch zur protektiven Wirkung dieser Zellen auf die Motoneurone bei. Im Zielgewebe der Motoneurone, wie der Muskulatur, wird dagegen kein CNTF exprimiert. Im

Gegensatz zu anderen neurotrophen Faktoren ist CNTF kein sekretorisches, sondern viel mehr ein zytosolisches Protein (Sendtner et al., 1991). Da CNTF über keine hydrophobe Signalsequenz verfügt, die normalerweise die Sekretion eines Proteins vermittelt, wird es nach der Translation zunächst in Gliazellen gespeichert. Erst im Falle einer mechanischer Verletzung der Schwanzzellen oder Astrozyten wird CNTF freigesetzt und kann dann eine Wirkung, z.B. auf regenerierende Nervenfasern entfalten (Sendtner et al., 1992c).

CNTF ist ein bedeutender Überlebensfaktor für spinale Motoneurone, besonders in Gegenwart von Stressoren. Nach Entzug anderer trophischer Substanzen verhindert CNTF die Apoptose der Motoneurone (Tan et al., 1996). Nach Nervenverletzungen, wie einer Axotomie, wird CNTF physiologischerweise hochreguliert und agiert somit als endogener Schutzfaktor für die durchtrennten Nervenfasern (Sendtner et al., 1997). Die exogene Applikation von CNTF führt außerdem zu einer erhöhten Regenerationsrate nach Nervenverletzung und zwar sowohl im Rückenmark als auch im peripheren Nerven (Ye and Houle, 1997; Newman et al., 1996). Cntf^{-/-} Mäuse weisen im Vergleich zu Wildtyp Mäusen nur eine gering verminderte Muskelkraft sowie eine leichte progressive Atrophie und Degeneration von Motoneuronen auf (Masu et al., 1993b). Demgegenüber ist die Apoptoserate von Motoneuronen von Cntf-Lif-Cardiotrophin Tripel k.o. Mäusen wesentlich höher (Sendtner et al., 1996; Masu et al., 1993b). Auch der Phänotyp dieser Mäuse ist wesentlich schwerwiegender, Tripel k.o. Mäuse weisen schon kurz nach der Geburt Muskelschwäche, Degeneration der distalen Axone und Veränderungen der motorischen Endplatten auf (Holtmann et al., 2005). Dies liefert einen wichtigen Hinweis für das redundante System der neurotrophen Faktoren in Motoneuronen. Physiologischerweise üben neurotrophe Faktoren ihre Effekte über ähnliche Rezeptoren und Signalwege aus, so dass ein registrierbarer Effekt häufig erst zustande kommt, wenn mehrere der Faktoren gleichzeitig ausgeschaltet werden.

Neben dem Überleben stimuliert CNTF auch den axonalen Transport spinaler Motoneurone (Masu et al., 1993a). Darüber hinaus ist CNTF ein wichtiger Katalysator des Neuritenwachstum bei spinalen Motoneuronen. CNTF stimuliert das Aussprossen von Kollateralen motorischer Nervenfasern aus distalen Axonabschnitten sowie an der motorischen Endplatte (Siegel et al., 2000). Bei kultivierten Motoneuronen induziert exogen appliziertes CNTF sogar ein um das Dreifache vermehrtes Neuritenwachstum (Oyesiku and Wigston, 1996).

1.3.3 GDNF

GDNF (Glial Cell Derived Neurotrophic Faktor) wurde ursprünglich als Überlebensfaktor für embryonale dopaminerge Neurone des Mittelhirns aus dem Überstand einer Rattengliom Zelllinie isoliert (Lin et al., 1993). GDNF ist ein 211 Aminosäuren langes glykosyliertes Polypeptid, welches der großen TGF β Superfamilie zugeordnet wird. Wie alle Mitglieder dieser Familie verfügt GDNF über sieben Cysteinreste, die durch drei Disulfidbrücken miteinander verbunden sind und für die Dimerisierung eine entscheidende Rolle spielen. GDNF bindet an die GPI verankerte GFR α -Untereinheit des GDNF Rezeptors (Treanor et al., 1996), welche vorzugsweise in lipidreichen Membranarealen vorkommt, sogenannten „Lipid Rafts“. Die mit GDNF besetzte GFR α -Untereinheit rekrutiert dann die Tyrosinkinase Ret in die Lipid Rafts (Tansey et al., 2000), um dort die Signaltransduktion einzuleiten. Innerhalb dieser Rafts assembliert Ret dann mit FRS2, wodurch der MAPK Signalweg aktiviert wird (Melillo et al., 2001). Außerhalb der Rafts interagiert aktiviertes Ret mit zytoplasmatischem Shc (Borrello et al., 1994), wodurch über die PI3 Kinase letztendlich Akt phosphoryliert wird. Zusätzlich scheint es aber auch noch weitere Ret-unabhängige Wege der Signaltransduktion zu geben (Sariola and Saarma, 2003). Die signaltransduzierende Einheit des GDNF Rezeptorkomplexes, c-Ret, ist sowohl prä- als auch postnatal im Rückenmark detektierbar (Zhang and Huang, 2006). Darüber hinaus konnte auch aktiviertes p-Ret, welches eine wichtige Funktion für die Regulation der Rac Aktivität und Lamellipodienformation besitzt (Fukuda et al., 2002), sowohl im embryonalen

als auch im adulten Rückenmark nachgewiesen werden (Zhang and Huang, 2006). Die genaue subzelluläre Lokalisation dieses Rezeptors auf Motoneuronen blieb bisher aber unklar.

GDNF wird physiologischerweise vor allem im Skelettmuskel und in Schwanzzellen exprimiert (Trupp et al., 1995; Henderson et al., 1994; Golden et al., 1999), aber auch verschiedene Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten sind zur GDNF Produktion befähigt (Schaar et al., 1993; Wilkins et al., 2003).

GDNF ist ein potenter Überlebensfaktor für spinale Motoneurone sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Oppenheim et al., 1995). GDNF hat positive Überlebenswirkungen auf ein breites Spektrum von Motoneuronpopulationen. Die Muskel-spezifische Überexpression von GDNF bewahrt Motoneurone vor dem natürlichen Zelltod. Obwohl der GDNF Rezeptor in allen Motoneuronen exprimiert wird, beschränkt sich der Verlust von Motoneuronen in $GFR\alpha$, GDNF und Ret k.o. Mäusen auf gewisse Subpopulationen von Motoneuronen (Oppenheim et al., 2000; Garces et al., 2000). GDNF ist daher möglicherweise ein physiologischer Überlebensfaktor für bestimmte Subpopulationen von Motoneuronen. Auch nach Axotomie ist GDNF ein potentes Überlebenssignal. In GDNF-GFAP transgenen neonatalen Mäusen, führte die gezielte GDNF Überexpression in Astrozyten nach Axotomie zu einem Langzeitüberleben von Motoneuronen (länger als 18 Wochen). Dagegen führte die Muskelspezifische Überexpression von GDNF nach Axotomie zur keiner verbesserten Überlebensrate der Motoneurone. Diese Daten sprechen also entweder für einen parakrinen Wirkmechanismus von GDNF oder aber, für das Unvermögen der Motoneurone GDNF retrograd an den Ort der Wirkung in den Zellkörper zu transportieren (Zhao et al., 2004). Auch in vielen weiteren Versuchsanordnungen konnte die extrem potente GDNF Wirkung auf nervale Regeneration nach Axotomie unter Beweis gestellt werden (Fine et al., 2002; Chen et al., 2001). Neben dem Überleben fördert GDNF auch das Wachstum von Motoneuronen. Die Zellkörper von GDNF-überexprimierenden Motoneuronen sind signifikant größer als die Zellkörper von Wildtypkontrollen (Zhao et al., 2004). Auch das

Auswachsen der Neuriten wird durch GDNF stimuliert (Paratcha et al., 2001; Paratcha et al., 2001). Eine weitere Studie konnte zeigen, dass die Überexpression von GDNF unter einem Muskel-spezifischen Promotor zu einer kräftigen Zunahme synaptischer Inputs in den neonatalen Skelettmuskel führt (Nguyen et al., 1998). Auch die kontinuierliche GDNF Injektion resultiert in einer multiplen Hyperinnervation an motorischen Endplatten von neonatalen Mäusen (Keller-Peck et al., 2001).

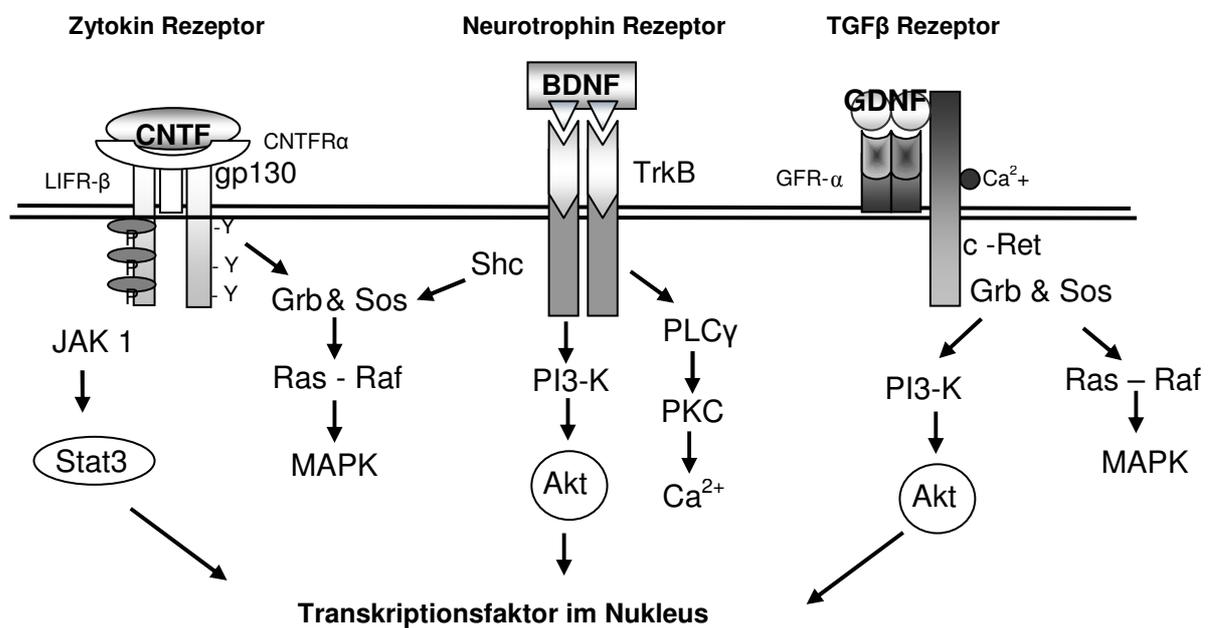


Abbildung 3: Aktivierung und Signaltransduktion des BDNF, CNTF und GDNF Rezeptors

Nach Aktivierung des CNTF Rezeptors wird neben dem MAPK Weg auch das Signalmolekül Stat3 aktiviert und wandert als Transkriptionsfaktor in den Zellkern. BDNF wirkt über Akt, den MAPK Weg und über Erhöhung des intrazellulären Kalziums. GDNF bewirkt die Aktivierung des MAPK Weges sowie des Transkriptionsfaktors Akt.

1.4 Therapieansätze mit neurotrophen Faktoren am *pmn* Mausmodell

Das Konzept der trophischen Interaktion von Zielgewebe und Motoneuron impliziert therapeutische Ansätze. Das therapeutische Potential erstreckt sich daher möglicherweise auf eine Vielzahl neurologischer Störungen, darunter traumatische Prozesse und neurodegenerative Erkrankungen. Die Idee, dass die Applikation eines neurotrophen Faktors die Überlebensfähigkeit erkrankter Neurone verbessern könnte, führte in den 90er Jahren zu zahlreichen tierexperimentellen Studien. Unter anderem wurden die Wirkungen neurotropher Faktoren auf das *pmn* Mausmodell für neurodegenerative Erkrankungen des Motoneurons untersucht.

Dabei zeigte sich, dass sich die Symptome der *pmn* Maus durch die Behandlung mit bestimmten neurotrophen Faktoren entscheidend verbessern lassen. CNTF und NT-3 verlängern das Überleben der *pmn* Mäuse und verringern gleichzeitig den Verlust von myelinisierten Axonen des N. phrenicus (Sendtner et al., 1992a; Sagot et al., 1995b; Haase et al., 1997). Die intraperitoneale Implantation von CNTF sezernierenden ES-Zellen in *pmn* Mäusen bewirkte bei sechs Wochen alten Tieren gegenüber unbehandelten *pmn* Mäusen einen signifikant verbesserten Phänotyp und eine deutliche Zunahme der Muskelkraft (Sendtner et al., 1992a). Auch die Degeneration der Axone des N. phrenicus ließ sich durch die CNTF Überexpression signifikant reduzieren.

Andere neurotrophe Faktoren zeigten sich weniger erfolgreich. GDNF konnte zwar das Perikaryon der *pmn* Motoneurone erhalten, hatte jedoch keinen positiven Effekt auf das Überleben der Mäuse oder die myelinisierten Axone des N. phrenicus (Sagot et al., 1996b).



pmn (-/-) mit CNTF Überexpression

pmn (-/-)

Abbildung 4: Vergleich der Muskelkraft zweier *pmn* Mäuse

Die *pmn* Maus auf der linken Seite zeigt durch die CNTF Überexpression eine erhebliche Verbesserung der Muskelkraft und des Phänotyps gegenüber der *pmn* Maus ohne CNTF Überexpression (rechts).

Die Applikation neurotropher Faktoren hatte teilweise sogar einen positiven Effekt auf den typischen Defekt des retrograden Transportes von *pmn* Motoneuronen. CNTF, BDNF und NT-3 verbessern den retrograden Transport von Fluorogoldpartikeln. Die Behandlung mit GDNF bewirkte dagegen keine Verbesserung des axonalen Transportes (Sagot et al., 1998b).

Nach diesen ersten, sehr erfolgreichen Tierversuchen, bei denen mit CNTF und BDNF bei *pmn* und *wobbler* Mäusen erstaunliche Verbesserungen des Phänotyps erzielt werden konnten (vgl. Abb. 4), lag es auf der Hand klinische Studien mit dem Ziel der Linderung der neurodegenerativen Symptomatik zu unternehmen. In zwei groß angelegten Studien wurden etwa 1300 ALS Patienten mit subkutan injiziertem CNTF in einer Dosis zwischen 0,5 µg/kg KG und 30 µg/kg KG behandelt (Miller et al., 1996b; ALS CNTF Treatment Study (ACTS) group, 1996). Doch entgegen allen Erwartungen zeigte sich keine signifikante Verbesserung im Vergleich zur Placebogruppe und zwar sowohl im Hinblick auf das Primärziel Überleben als auch auf Sekundärziele wie Muskelkraft oder Lebensqualität (Bongioanni et al., 2004).

1.5 Fragestellung der Arbeit

In vielen Studien an Mausmodellen für neurodegenerative Motoneuronerkrankungen, wie dem *pnn* Mausmodell, konnte bereits nachgewiesen werden, dass neurotrophe Faktoren protektive Wirkungen auf erkrankte Motoneurone besitzen. Obwohl schon seit mehreren Jahren in klinischen Studien an verschiedenen Konzepten der Therapie mit neurotrophen Faktoren gearbeitet wird, ist die genaue Lokalisation der Rezeptoren für diese neurotrophen Faktoren auf Motoneuronen bisher nicht beschrieben. Motoneurone sind polarisierte Zellen und bestehen, neben dem Zellkörper mit seinen zahlreichen Dendriten, aus einem langen Axon mit Kollateralen. Axon und Dendriten bestehen aus völlig unterschiedlichen subzellulären Komponenten und sind für verschiedene Aufgaben des Motoneurons verantwortlich. Rezeptoren für neurotrophe Faktoren sind daher wahrscheinlich unterschiedlich in den subzellulären Domänen des Motoneurons verteilt, ihre genaue subzelluläre Lokalisation wurde aber bisher nicht untersucht (Yano and Chao, 2004). Die gezielte Expression von Rezeptoren für neurotrophe Faktoren in spezifischen Subdomänen muss einer präzisen Regulation unterliegen, damit die trophischen Signale zielgerecht ausgeübt werden können. Das erste Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Charakterisierung der genauen subzellulären Lokalisation der BDNF, CNTF und GDNF Rezeptoren auf Motoneuronen *in vitro* und *in vivo*.

Neben dem Überlebensseffekt auf das embryonale ZNS und degenerierende Motoneurone wurden für viele der neurotrophen Faktoren auch Wirkungen auf das Neuritenwachstum beschrieben. Jedoch wurde in den meisten dieser Studien weder das Neuritenwachstum genau quantifiziert, noch wurde zwischen einer Stimulation des Axon- bzw. des Dendritenwachstums differenziert. Gleichzeitig waren bei den ersten Versuchen dieser Arbeit charakteristische Unterschiede in der subzellulären Verteilung der Rezeptoren für neurotrophe Faktoren beobachtet worden. Daher bestand das zweite Ziel dieser Arbeit darin, einen direkten, quantifizierbaren Vergleich der differentiellen Wirkungen von

neurotrophen Faktoren (BDNF, CNTF und GDNF) auf das Axon- und Dendritenwachstum von primären Motoneuronen anzustellen. Anschließend sollten diese Ergebnisse dann mit der subzellulären Rezeptorverteilung für diese neurotrophen Faktoren auf Axon und Dendriten korreliert werden.

In einigen Studien wurden Interaktionen zwischen dem glutamatergen AMPA-Rezeptor und neurotrophen Faktoren beschrieben. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass neurotrophe Faktoren einen Einfluss auf die Expression dieser GluR2-Untereinheit des AMPA-Rezeptors haben und damit auch auf die Kalziumpermeabilität (Brene et al., 2000). Im Rahmen dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, ob der AMPA-Rezeptor auch einen Einfluss auf das Neuritenwachstum von embryonalen Motoneuronen besitzt. Dafür sollte das Axon- und Dendritenwachstum von primären Motoneurone in Anwesenheit eines AMPA-Rezeptor Antagonisten bzw. Agonisten und verschiedenen neurotrophen Faktoren quantifiziert werden. Das dritte Ziel der Arbeit war daher die Analyse einer möglichen Interaktion zwischen dem AMPA-Rezeptor und neurotrophen Faktoren im Hinblick auf einen Einfluss auf das Axon- und Dendritenwachstum bei primären Motoneuronen.

Die *pmn* (progressive Motoneuronopathie) Maus ist ein Mausmodell für die ALS und andere degenerative Motoneuronerkrankungen des Menschen. Vielversprechende *in vivo* Studien der 90er-Jahre konnten bereits zeigen, dass eine Behandlung mit CNTF, aber nicht mit GDNF den Beginn der Erkrankung verzögert und das Überleben der *pmn* Mäuse signifikant verlängert (Sendtner et al., 1992b; Sagot et al., 1996b). Durch welche Effekte diese phänotypische Verbesserung zustande kommt, ist aber noch immer unklar – zumal den neurotrophen Faktoren keine ursächliche pathophysiologische Rolle bei der Entstehung neurodegenerativer Erkrankungen zugeschrieben werden. Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun erstmalig die Wirkungen von BDNF, CNTF und GDNF auf zwei typische axonale Charakteristika bei isolierten *pmn* Motoneuronen verglichen werden: einerseits die Fähigkeit, den axonalen Wachstumsdefekt der *pmn* Motoneurone zu vermindern und andererseits die

Anzahl der pathologischen axonalen Schwellungen zu reduzieren. Dazu sollten sowohl die Axonlängen als auch die die Zahl der axonalen Schwellungen der mit verschiedenen neurotrophen Faktoren behandelten *pmn* Motoneurone quantifiziert werden. Das vierte Ziel dieser Arbeit war daher die Analyse der Effekte von BDNF, CNTF und GDNF auf den axonalen Wachstumsdefekt primärer *pmn* Motoneurone.

2 MATERIAL UND METHODIK

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Material	Bezugsquelle
24-well Gewebekulturschale	Greiner
4-well Gewebekulturschale	Greiner
10 cm Gewebekulturschale	Greiner
Glasplättchen Ø10 mm	Paul Mariefeld GmbH
15 ml Falcon	Greiner, Sarstedt
50 ml Falcon	Greiner, Sarstedt
Objektträger	Langenbrinck
Deckgläschen	Knittel Gläser

Tabelle 1: Verwendete Materialien für Zellkultur und Immunhistochemie mit Angabe der Bezugsquelle

2.1.2 Chemikalien

Die Laborchemikalien wurden in pro analysi Qualität, soweit nicht anders vermerkt, von folgenden Firmen bezogen: Invitrogen, Merk, Sigma, Roche und Roth. Soweit nicht anders vermerkt; erfolgte die Herstellung der Lösungen, Puffer und Medien nach Sambrook et al. (1989).

- 10 x TBST (Tris buffered Saline mit Tween)
 - 100 mM Tris-Cl (pH 8)
 - 1,5 M NaCl
 - 0,5% Tween-20

Der pH-Wert wurde mit HCl auf pH7,6 eingestellt.

- PFA 4%
 - 0,2 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - 0,2 M $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
 - 4% Paraformaldehyd

Nach Auflösen des Pulvers wurde die Lösung bei knapp unter 60 °C mit NaOH geklärt und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt.

- 50 x TAE
 - 0,05 M EDTA (pH 8)
 - 0,26 M Eisessigsäure
 - 2,0 M Tris Base
- Lysispuffer
 - 10 mM Tris (pH 7,3)
 - 100 mM EDTA
 - 150 mM NaCl
 - 0,5% SDS
- Motoneuronmedium
 - Neurobasal Medium
 - 10% Pferdeserum, hitzeinaktiviert
 - 500 μM Glutamax
 - 2% B27 Supplement
- HEK 293T- Zell Medium
 - DMEM + L-Glutamine
 - 5% fetales Kälberserum
 - 100 U/ml Penicillin
 - 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin

- Depolarisationslösung
 - 30 mM KCl
 - 0,8% NaCl
- Saccharose Lösung 30%
 - Saccharose 30g
 - PSB ad 100 ml
- Mowiol
 - 10g Mowiol
 - 40 ml PBS
 - 20 ml wasserfreies Glycerin

Die Mischung wurde für 16 h gerührt und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Dann wurde das Mowiol 10 min lang auf 60°C erhitzt.

- 2x HBS Puffer
 - 274 mM NaCl
 - 10 mM KCl
 - 1,4 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$
 - 15 mM Glucose
 - 42 mM Hepes

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7,04 eingestellt.

2.1.3 Reagenzien für Zellkultur und Immunfluoreszenz

Substanz	Bezugsquelle
AMPA	Calbiochem
Brain derived neurotrophic Factor	Amgen
B 27 Supplement	Gibco
Ciliary Neurotrophic Factor	rekombinant, Ratte, in E. coli produziert und gereinigt Institut für kl. Neurobiologie, Würzburg
DMSO	Sigma
Glial Cell Derived Neurotrophic Factor	Amgen
Hanks balanced salt solution (HBSS)	Gibco
Pferdeserum	Linaris
Fetales Kälberserum	Linaris
Laminin	Max Plank Institut, Martinsried
Lektin (Triticum vulgare)	Fluka
NBQX	Calbiochem
Neurobasal Medium	Gibco
DMEM + L-Glutamine	Gibco
Polyornithin	Sigma

Tabelle 2: Verwendete Substanzen für die Zellkultur primärer Motoneurone sowie HEK 293T Zellen mit Angabe der Bezugsquelle

Substanz	Bezugsquelle
Rinderalbumin (BSA)	Sigma
Ziegenserum	Linaris
Dulbecco's PBS	PAA Laboratories
Triton X-100	Sigma
Tissue tek	Sakura Finetek
α -Bungarotoxin (Alexa flour 488 konjugiert)	Molecular Probes, Eugene OR

Tabelle 3. Verwendete Substanzen für die Immunfluoreszenz mit Angabe der Bezugsquelle

2.1.4 Enzyme, Primer und Antikörper

Enzym	Endkonzentration	Bezugsquelle
Proteinase K (20 mg/ml)	1 mg/ml	Roche
Triple Master Taq DNA Polymerase	0,2 µl/50 µl PCR Ansatz	Eppendorf
Trypsin 1%	0,1%	Worthington
Trypsininhibitor 1%	0,1%	Sigma

Tabelle 4: Verwendete Enzyme mit Angaben zur jeweiligen Konzentration und Bezugsquelle

Gen	Primer Richtung	5' → 3'	T _a	Produktlänge
<i>pmn</i>	sense	gcatgcacatcagatcggt	54 °C	479 bp
<i>pmn</i>	antisense	ctgaagatgtggttcctcag	53 °C	479 bp
<i>pmn</i>	sense (neu)	ggcatggatagcatgcacatcagatcggt	57 °C	489 bp
<i>pmn</i>	antisense(neu)	ctgaagatgtggttcctcagcttaaaggac	59 °C	489 bp

Tabelle 5: Verwendete Primer für die *pmn* PCR (Invitrogen Life Technologies)

Antigen	Spezies	Klonalität	Konzentration	Bezugsquelle
Islet 1	Maus	monoklonal	1:2	39.4D5
Phosphotau	Maus	polyklonal	1:1000	Chemicon
Neurofilament	Maus	polyklonal	1:1000	Sternberger
Map 2	Maus	monoklonal	1:1000	Sigma
S100 (β –Einheit)	Kaninchen	polyklonal	1:1000	Sigma
TrkB	Kaninchen	polyklonal	1:100	Santa Cruz
p-TrkB	Kaninchen	polyklonal	1:50	Moses Chao. Skirball Institute
gp 130	Kaninchen	polyklonal	1:400	Sigma
p-Stat3 (S727)	Kaninchen	polyklonal	1:200	Cell Signalling
Ret	Ziege	polyklonal	1:500	R&D Systems
p-Ret (S696)	Kaninchen	polyklonal	1:500	Abcam

Tabelle 6 : Verwendete Erstantikörper für die Immunhistochemie mit Angabe der Bezugsquelle

Antigen	Wirt	Konzentration	Bezugsquelle
Maus-IgG/ Cy 2	Ziege	1:200	Dianova
Kaninchen- IgG/Cy2	Ziege	1:200	Dianova
Maus- IgG/Cy3	Ziege	1:200	Dianova
Kaninchen- IgG/Cy3	Ziege	1:300	Dianova
Ziegen-IgG/Cy3	Kaninchen	1:300	Jackson
Kaninchen-IgG/Cy5	Ziege	1:300	Jackson
Ziegen-IgG/Cy5	Esel	1:300	Jackson

Tabelle 7: Verwendete Zweitantikörper für die Immunhistochemie mit Angabe der Bezugsquelle

2.1.5 Kits

Kit Name	Verwendung	Bezugsquelle
QIAquick Gel Extraktion Kit 250	Elution von DNA Fragmenten aus Agarosegelen	Qiagen
BigDye Terminator Ready Reaktion Kit with AmpliTaq	Sequenzierungsreaktion	ABI Prism
Dye Ex 2.0	Aufreinigung der DNA nach Sequenzierungsreaktion	Qiagen

Tabelle 8: Verwendete Kits mit Verwendungszweck und Bezugsquelle

2.1.6 Mausstämme und genetisch veränderte Mauslinien

Für die jeweiligen Versuche wurden (1) *p_{mn}* Mäuse, (2) NMRI Auszuchtmäuse (Naval Medical Research Institute) (3) C57BL/6 Inzuchtmäuse, (4) EGFP-Tau, (5) *N-trk2* ^{-/-} Mäuse verwendet. Die *p_{mn}* Mäuse entstanden im Panum Institut in Kopenhagen durch eine Spontanmutation in einem NMRI Auszuchtstamm. Die verwendeten *p_{mn}* Mäuse entstammen unserer eigenen Mauszucht (Institut für klinische Neurobiologie, Würzburg), die durch stetige Rückkreuzung mit einem NMRI Stamm (Harlan Winkelmann GmbH) aus diesem genetischen

Hintergrund gezüchtet werden. Für die Zucht homozygoter *pmn* Mäuse wurden jeweils heterozygote Mäuse (*Tbce +/-*) verpaart. Der Genotyp der Embryonen wurde durch Nachweis der Punktmutation mittels DNA Sequenzierung bestimmt.

Die C57BL/6 Mäuse entstammen dem Inzuchtstamm der Harlan Winkelmann GmbH. Die EGFP-Tau Mäuse (*Mtapttm1(EGFP) YB*) entstammen der Zucht von Prof. Y. Barde, Universität Basel. Durch die Insertion von EGFP kann das Axon von Motoneuronen mikroskopisch leicht identifiziert werden. Die EGFP-Tau Mäuse sind gesunde und fertile Tiere. Die N-trk2 Mäuse entstammen der Zucht der Jackson Laboratories (USA). Um homozygote *trkb -/-* Mäuse zu gewinnen, wurden jeweils heterozygote *trkb +/-* Tiere miteinander verkreuzt. Die Tierhaltung erfolgte in allen Fällen unter pathogenfreien Bedingungen in einem künstlichen Tag- und Nachtrhythmus bei kontrollierter Temperatur von 21 \pm 1 °C und 50-60 % relativer Luftfeuchtigkeit.

2.2 Methodik

2.2.1 Calciumphosphat-vermittelte Transfektion von HEK 293T mit TrkB

Zur transienten Expression von TrkB wurden HEK 293T Zellen mittels Calciumphosphat Kopräzipitation transfiziert. Für die Transfektionen wurden konfluente HEK 293T Zellen einen Tag zuvor in 10 cm-Kulturschalen 1:4 passagiert, so dass sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70 – 80 % erreichten. Pro 10 cm-Kulturschale wurden 860 μ l H₂O mit 10 μ g DNA, 100 μ l 2,5 M CaCl₂ und 1 ml 2x HBS-Puffer gemischt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde dieser Ansatz vorsichtig auf die Zellen gegeben und für weitere acht Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde der Transfektionsansatz wieder abgesaugt, die Zellen mit 1x PBS gewaschen und frisches Kulturmedium zugegeben. Nach 24 h Inkubation im Brutschrank wurden die TrkB exprimierenden Zellen gesplittet. Nach 3 Tagen in Kultur wurde ein Teil der transfizierten 293T Zellen mit einem 10 ng/ml BDNF Puls 5 min beziehungsweise 15 min lang stimuliert und anschließend 30 min lang mit 37°C warmen 4% PFA fixiert. Schließlich wurden

die transfizierten 293T Zellen mit Antikörpern gegen TrkB, p-TrkB sowie Map-2 gefärbt.

2.2.2 Zellkultur primärer embryonaler Motoneurone

2.2.2.1 Isolation embryonaler Motoneurone einer Maus

Der Tag der Bildung des Vaginalpfropfes des Muttertieres wurde als Tag 1 der Embryonalentwicklung festgelegt. Am Tag E13,5 wurde die trächtige Maus mit Äther tief anästhesiert und durch zervikale Dislokation getötet. Die Bauchdecke des Muttertieres wurde dann mit 70% Ethanol desinfiziert und eröffnet. Beide Cornua des Uterus wurden am Stück entnommen und die Fruchtblasen präpariert. Die Embryonen wurden einzeln der Fruchtblase entnommen. Für die Genotypisierung wurde der Kopf abgetrennt und für die DNA Extraktion in Lysispuffer gegeben. Das embryonale Rückenmark wurde am Stück entnommen, die Hinterwurzelganglien sowie die Membrana limitans gliae entfernt. Schließlich wurde das gesäuberte Rückenmark in HBSS überführt. Nach Zugabe von 20 µl 1% Trypsin wurde das Rückenmark für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Der Verdau wurde durch 20 µl 0,1% Trypsininhibitor gestoppt.

2.2.2.2 Isolierung der Motoneurone durch Panning mit Lektin

Um die circa 3% Motoneurone aus der Zellsuspension aller Rückenmarkszellen zu isolieren, wurden die Motoneurone anhand ihres p75 Neurotrophinrezeptors selektioniert. Dazu wurde zunächst 300 µl Lektin (Weizenkeimagglutinin) in einer Konzentration von 10 µl/ml in die Vertiefungen der 24-well Gewebekulturschalen gegeben und 30 min lang bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Gewebekulturschalen mit Neurobasal Medium wurde die Zellsuspension auf der mit Lektin beschichteten Kulturschale aufgetragen und weitere 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Durch diesen Inkubationsschritt kann Lektin an die N-Glykosilierungsstelle der ersten Cystein-reichen-Domäne des p75 NTR der Motoneurone binden (Vale and Shooter, 1982; Grob and Bothwell, 1983; Costrini and Kogan, 1981). Alle p75NTR negativen Zellen des Lysats werden nicht gebunden und können vorsichtig mit einer Pipette abgezogen werden. Durch den Panningschritt werden deutlich mehr Motoneurone kultiviert. Mittels Immunfluoreszenz gegen Islet-1, einem Marker für postmitotische Motoneurone (Ericson et al., 1992), konnte der Anteil der Motoneurone in der Zellkultur bestimmt werden. Nach dem Lektinpanning waren etwa 75% der kultivierten Zellen positiv für Islet-1, während die Kontrollkulturen nur etwa 10% Islet-1 positive Zellen aufwiesen.

Die nun am Lektin gebundenen Motoneurone wurden nach drei weiteren Waschschritten und Zugabe von 0,5 ml Depolarisationslösung (37°C) und 0,5 ml Motoneuronmedium (37°C) durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gelöst und in ein steriles Falcon-Röhrchen übertragen. Nach Zugabe von 1 ml Motoneuronmedium wurden die Falcon-Röhrchen bei 1200 Umdrehungen 5 min lang zentrifugiert und anschließend vom Überstand 1,8 ml abgesaugt. Dann wurde zum Pellet der Motoneurone 800 µl Motoneuronmedium hinzugegeben.

2.2.2.3 Zellkultur primärer Motoneurone

Etwa 2500 Zellen wurden auf 4-well Gewebekulturschalen in 100 µl Vollmedium (Motoneuronmedium plus entsprechendem neurotrophen Faktor in einer 1:1000 Verdünnung) ausplattiert, die zuvor mit Poly-D,L-Ornithin (0,5mg/ml in 0,15 M Boratpuffer pH 8,35) und danach mit Laminin (2,5 µg/ml in HBSS) beschichtet worden waren. Bei weiteren Versuchen wurden je nach Versuchsanordnung der primären Motoneuronzellkultur zusätzlich (1) der AMPA Rezeptor Agonist AMPA (555nM, Calbiochem) oder (2) der AMPA Rezeptor Antagonist NBQX (95nM, Calbiochem) zugefügt, so dass ein vergleichbarer Anteil der AMPA Rezeptoren aktiviert bzw. blockiert war (entsprechend $2K_D$). Die Zellkulturen wurden sieben Tage lang bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank (Nuair autoflow) inkubiert. Das Vollmedium (Motoneuronmedium inklusive der

neurotrophen Faktoren) sowie die AMPA Rezeptoragonisten und Antagonisten wurde alle 48h zu 80% ersetzt. Das Wachstum der Motoneurone wurde unter einem Phasenkontrastmikroskop (Leica) überwacht und photographisch mit einer Digitalkamera (Canon) dokumentiert.

2.2.2.4 Fixierung der Zellkultur

Am siebten Tag der Kultur wurde 1 ml 37°C warmes 4% PFA auf jede Gewebekulturschale gegeben und abgesaugt. Mit 1,5 ml derselben PFA-Lösung wurden die Zellen mindestens 20 min nachfixiert. Die so fixierten Zellen wurden 2-5 Tage bei 4°C gelagert.

2.2.2.5 Indirekte Immunfluoreszenz der primären Motoneuronzellkultur

Die fixierten Zellen wurden dreimal mit 1x TBST gewaschen und anschließend durch eine 5min Inkubation mit 100% Aceton (-20°C) permeabilisiert. Nach einem erneuerten Waschschrift mit 1xTBST wurden die unspezifischen Bindungsstellen mit 10% Rinderserumalbumin in 1xTBST (BSA) durch 30 Minuten Inkubation bei RT blockiert. Die Erstantikörper (siehe Tabelle 6) wurden sodann in 1% BSA in 1xTBST verdünnt auf die Gewebekulturschalen gegeben und über Nacht bei 4°C aufbewahrt. Am nächsten Tag wurde die Erstantikörperlösung durch dreimaliges Waschen mit 1xTBST gründlich entfernt und die unspezifischen Bindungen erneut durch eine 30 min Inkubation bei RT mit 10% BSA in 1xTBST gesättigt. Die Zweitantikörper (siehe Tabelle 7) wurden in 1% BSA in 1xTBST verdünnt auf die Zellen gegeben und 40 Minuten bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach einem letzten Waschvorgang mit 1xTBST wurden die Deckgläschen mit der zellbeschichteten Seiten in 2 µg Mowiol auf einem Objektträger eingebettet. Die fertigen Objektträger wurden mindestens 24h lang lichtgeschützt bei 4°C gelagert, ehe sie mit einem konfokalen Mikroskop der Firma Leica analysiert wurden.

2.2.3 Herstellung und indirekte Immunfluoreszenz der Gefrierschnitte

Erwachsene Wildtyp und EGFP-Tau Mäuse wurden mit Aether tief anästhesiert und mit 1xPBS und 4% PFA 10 min perfusionsfixiert. Sowohl das Rückenmark als auch die Nn. phrenici wurden präpariert, entnommen und mit 4% PFA für 3h nachfixiert. Nach einem Waschschrift mit 1xPBS wurde das Gewebe über Nacht bei 4°C in 30% Saccharose Lösung gelagert. Anschließend wurde das Gewebe in Tissue Tek eingebettet und ein bis zwei Minuten in flüssigem Stickstoff gekühltem 2-Methylbutan schockgefroren. Mit dem Cryotom (Leica) wurden sodann Gefrierschnitte in einer Dicke von 10 µm hergestellt; dabei erfolgte die Schnitfführung für die Nn. phrenici längs und für das lumbale Rückenmark quer/koronar. Die Lagerung der Schnitte erfolgte bei -20°C.

Für die indirekte Immunfluoreszenz wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Kryoschnitte mit 10% BSA, 10% Ziegenserum und 0,3% Triton-X 100 in 1x PBS blockiert und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem entsprechenden Erstantikörper (siehe Tabelle 6) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurden die Schnitte 2h bei Raumtemperatur mit den entsprechenden konjugierten Sekundärantikörpern inkubiert (siehe Tabelle 7). Nach einem weiteren Waschschrift mit 1x PBS wurden die Schnitte in DABCO-Eindeckmedium auf Objektträgern eingebettet und das Deckgläschen mit Nagellack abgedichtet. Die Lagerung der fertigen Objektträger erfolgte lichtgeschützt bei 4°C. Für alle Reaktionen wurden (Negativ-) Kontrollen unter denselben Bedingungen und Konzentrationen ohne Primärantikörper angelegt.

2.2.4 Herstellung und indirekte Immunfluoreszenz von gezupften Muskelfasern

Um die Axonterminale an den motorischen Endplatten darstellen zu können, wurde das Diaphragma von Wildtyp Mäusen frisch präpariert. Gezupfte Muskelfasern des Zwerchfells wurden dann 3 h mit 2% PFA fixiert und anschließend mit 1xPBS gewaschen. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden dann über Nacht mit 10% BSA und 0,3% Triton-X-100 in 1x PBS

blockiert. Die Motoneuronendplatten des N. phrenicus wurden anhand ihrer Acetylcholinrezeptoren identifiziert, die mittels konjugiertem α -Bungarotoxin dargestellt wurden. Dazu wurden die gezupften Muskelfasern 30 min mit 5 μ l/ml Alexa Fluor 488 konjugierten α -Bungarotoxin in 1% BSA in PBS inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1xPBS wurden die Endplatten mit den entsprechenden Erstantikörpern (siehe Tabelle 6) über Nacht mit 10% BSA und 0,3% Triton-X-100 in 1xPBS inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Gewebe mit 1xPBS gewaschen und mit den entsprechenden Sekundärantikörpern (siehe Tabelle 7) in 1% BSA in 1xPBS für 90 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt inkubiert. Abschließend wurde das Gewebe mit 1xPBS gewaschen, auf Objektträger überführt, mit DABCO eingebettet und bei 4°C lichtgeschützt gelagert. Negativkontrollen ohne Primärantikörper wurden mit denselben Konzentrationen und Bedingungen für alle Reaktionen angelegt.

2.2.5 Genotypisierung der *pmn* Maus

2.2.5.1 DNA-Isolierung

Die Köpfe der Mausembryonen wurden in 0,5 ml Lysis Puffer und 20 μ l Proteinase K gegeben und über Nacht bei 60°C (Thermomixer comfort, Eppendorf) geschüttelt. Nach vollständiger Lyse wurde die DNA mit 1 ml 100% Ethanol ausgefällt und der Überstand verworfen. Nach weiterer Zugabe von 1 ml 70% Ethanol wurde die Lösung invertiert und daraufhin für 5 min bei 13.000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417R). Das am Boden haftende Pellet wurde in 0,5 ml PCR Wasser gelöst und eine halbe Stunde bei 37°C (Thermocycler comfort, Eppendorf) inkubiert. Schließlich wurde nach Zugabe von 0,5 ml Chloroform ein weiteres Mal für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und 0,2 ml vom milchigen Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Nach erneuter Zugabe von PCR Wasser und Chloroform, wurde die Extraktion wiederholt. Der DNA wurde daraufhin 20 μ l 3M Natriumacetat und 1 ml 100% Ethanol zugegeben und die Lösung bei 13.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Jetzt konnte der Überstand verworfen und dem am Boden haftenden Pellet 0,5

ml 70% Ethanol zugegeben werden. Das Gemisch wurde 5 min bei 4°C und 13.000 rpm zentrifugiert, der Überstand erneut verworfen und das neue DNA Pellet sofort in 100 µl 1xTE gelöst. Schließlich wurde die gelöste DNA bei 37°C (Thermomixer comfort, Eppendorf) 30 min lang inkubiert. Die DNA Konzentration wurde photometrisch bei 260 nm (Biophotometer Eppendorf) bestimmt.

2.2.5.2 *Tbce* PCR

Um genug DNA für die Sequenzierung zur Verfügung zu haben, wurde die gereinigte DNA durch die Standard *Tbce* PCR im Eppendorf Mastercycler amplifiziert. Der PCR Ansatz erfolgte in einem Testvolumen von 50 µl: 2 µl DNA, 1 µl *Tbce* sense primer (10 pmol/µl), 1 µl *Tbce* antisense primer (10 pmol/µl), 5 µl HighFi Puffer (Perkin Elmer), 1 dNTP (10 mM), 0,2µl Triple MasterTaq, 39,8 µl HPLC Wasser. Nach der Denaturierung der DNA bei 94°C für 5 min, folgten 45 Zyklen des folgenden PCR Programms: Denaturierung bei 94°C für 30 sec, Abkühlung (Annealing) auf 53°C für 30 sec, Synthese bei 72°C für 1 min. Abschließend folgte ein Zyklus von 7 min bei 72°C.

2.2.5.3 DNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die jeweiligen Proben wurden mit 10 µl Bromphenolblau-Ladepuffer versetzt und auf ein 1% Agarosegel (1,5 g Agarose in 150 ml TAE, 3 µl Ethidiumbromid) aufgetragen. Als Größenstandard wurde 200 ng eines 1 kb Markers (Gene Ruler 100, Fermentas) verwendet. Die DNA wurde in der Laufkammer (EPS 200, Pharmacia Biotech) 30 min bei 110 V elektrophoretisch getrennt und dann auf einem UV-Schirm analysiert und photographiert. Die entsprechenden Banden wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) aufgereinigt und mit 35 µl HPLC Wasser eluiert.

2.2.5.4 *Tbce* Sequenzierung

Zur Analyse auf dem ABI 373 DNA Sequencer wurden die DNA Proben mit dem ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaktion Kit (Perkin Elmer Biosystems) vorbereitet. Dazu wurde 100 ng der entsprechenden DNA, 4 µl des BigDye Terminator RR Mix und 1,5 µl des jeweiligen Primers (*tbce* sense oder *tbce* antisense) in ein PCR Reaktionsgefäß gegeben. Die Sequenzierungs-PCR wurde nach Angaben des Herstellers (Eppendorf Thermocycler) durchgeführt. Nicht eingebaute, farbstoffmarkierte Nukleotide und überschüssige Primer wurden mit dem Kit DyeEX 2.0 (Qiagen) entfernt. Das Produkt der Sequenzreaktion wurde in der Vakuumzentrifuge (Univapo 100 H) getrocknet und im Anschluss daran mit 3 µl 100% DMSO + Farbstoff gelöst und auf das Sequenziergel aufgetragen. Die Auswertung der DNA Sequenz erfolgte durch das Programm GeneRuler. Mit der Chromas Software konnte die DNA Sequenz und damit der Genotyp des Mausembryos bestimmt werden. Da sich die homozygote *pmn* Maus nur durch eine Punktmutation von der gesunden Wildtyp Maus unterscheidet, war es ausreichend lediglich einen kleinen Abschnitt des Mausgenoms zu sequenzieren.

DNA	<u>C G A</u>	<u>T G G</u>	<u>T A A</u>	<u>C G A</u>	<u>N G G</u>	<u>T A A</u>	<u>C G A</u>	<u>G G G</u>	<u>T A A</u>
	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Tbce	Arg	Trp	Stop	Arg	Trp/Gly	Stop	Arg	Gly	Stop
	<i>Tbce</i> +/+ Maus			<i>Tbce</i> +/- Maus			<i>Tbce</i> -/- Maus (<i>pmn</i>)		

Tabelle 9: Bestimmung des Genotyps der Mausembryos mittels Sequenzierung des *Tbce* Gens

2.2.6 Mikroskopie und statistische Auswertung

Die Immunreaktivität der Zellkulturen, Gefrierschnitte und Muskelzupfpräparate wurde unter einem konfokalen Mikroskop der Firma Leica visualisiert und digital fotografiert (Leica Confocal Software). Bei der Analyse zusammengehöriger

Schnitte und Kulturen wurden dieselben Einstellungen für Lichteinfall, Spannung und Intensität gewählt. Für die hochauflösende konfokale Analyse der Wachstumskegel, des N. phrenicus sowie der motorischen Endplatten wurde das 100x Objektiv mit Immersionsöl verwendet, sowie ein Zoomfaktor von 1,5 bis 3. Die konfokalen Bilder wurden in einer Dicke von 1 µm erstellt. Die hochauflösenden Bilder des N. phrenicus stellen eine Projektion mehrerer konfokaler Bilder dar. Der Identitätsnachweis von Motoneuronen erfolgte durch Färbung gegen den für Motoneurone spezifischen Transkriptionsfaktor Islet-1 (Ericson et al., 1992). Als weiteres Kriterium diente die typische Morphologie der Motoneurone. Nach sieben Tagen in Kultur sind die Axone mindestens dreimal so lang wie die Dendriten und können so voneinander unterschieden werden (Wiese et al., 1999). Immunhistochemisch konnten p-Tau positive / Map-2 negative Neuriten dem Axon zugeordnet werden, während p-Tau negative/ Map-2 positive Neuriten als Dendriten gewertet wurden.

Die Länge der Motoneuronneuriten wurde durch morphometrische Messungen mittels ScionImage (Scion Corporation, Inc.) bestimmt. Die Analyse erfolgte unter blinden Untersuchungsbedingungen, da der Genotyp zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht bekannt war. Die Ergebnisse der verschiedenen Zellkulturen wurden in eine Datenbank zusammengefügt und mit Graph Pad Prism Software (Version 4) statistisch ausgewertet. Wurden mehrere Datengruppen (z.B. Axonlänge unter Behandlung mit BDNF, CNTF und GDNF) miteinander verglichen, wurde eine einfache Analyse der Varianz (one way Anova) durchgeführt. Einzelne Gruppen wurden mit dem Student's *t*-test miteinander verglichen. Die Nullhypothese wurde auf Grund der 5% Basis verworfen ($p < 0,05$). Fehlerbalken wurden, bei nachgewiesener Gaußschen Verteilung, stets als SEM angegeben.

3 ERGEBNISSE

3.1 Lokalisation des BDNF, CNTF und GDNF Rezeptors auf Axonen und Dendriten von primären Motoneuronen

BDNF, CNTF und GDNF sind potente Überlebensfaktoren für Motoneurone. In der Zellkultur fördern sie neben dem Überleben der Motoneurone auch das Axon- und Dendritenwachstum. Axone und Dendriten bestehen aus völlig unterschiedlichen subzellulären Komponenten und sind für verschiedene Aufgaben des Motoneurons verantwortlich. Die Rezeptoren für neurotrophe Faktoren sind daher wahrscheinlich unterschiedlich in den subzellulären Domänen der Motoneurone verteilt. Ihre genaue subzelluläre Lokalisation ist aber bisher nicht gut genug definiert worden (Yano and Chao, 2004). Die gezielte Expression von Rezeptoren für neurotrophe Faktoren in spezifischen Subdomänen muss einer genauen Regulation unterliegen, damit die trophischen Signale zielgerecht ausgeübt werden können.

Um die genaue subzelluläre Lokalisation der BDNF, CNTF und GDNF Rezeptoren auf primären Motoneuronen zu untersuchen, wurden Motoneurone aus (E) 13,5 alten Mausembryonen isoliert und in Gegenwart von 1 ng/ml BDNF, CNTF oder GDNF kultiviert. Unter diesen Bedingungen wachsen Neuriten aus, die mittels Immunfluoreszenz gegen Map-2 und p-Tau, als Dendriten (Map-2 positiv) oder Axon (p-Tau positiv) klassifiziert werden können. Nach sieben Tagen in Kultur weisen Motoneurone zusätzlich eine charakteristische Morphologie auf. Axone werden in der Regel länger als 300 µm, während sämtlichen Dendriten zusammen eine Länge von etwa 50 -100 µm erreichen (Bommel et al., 2002; Rossoll et al., 2003). Auf diese Weise konnten Axone in den folgenden Versuchen einerseits durch ihre charakteristische Länge und andererseits die relativ niedrige Expression von Map-2, von Dendriten unterschieden werden. Die primären Motoneurone wurden nach sieben Tagen in Kultur fixiert und mit Antikörpern gegen Map-2 sowie gegen die entsprechende Rezeptoruntereinheit oder ein

Signaltransduktionsprotein gefärbt. Als Marker für den BDNF, CNTF und GDNF Rezeptor wurden TrkB, gp130 sowie c-Ret gewählt. Die aktivierte Form der Rezeptoren für neurotrophe Faktoren bzw. deren Signaltransduktionsproteine wurden mittels phosphoryliertem TrkB (p-TrkB), phosphoryliertem Stat3 (p-Stat3) und phosphoryliertem Ret (p-Ret) nachgewiesen.

3.1.1 Charakterisierung und Spezifitätsbestimmung des p-TrkB Antikörpers

Für alle oben genannten Marker neurotropher Faktoren waren kommerzielle Antikörper verfügbar, mit Ausnahme eines Antikörpers gegen p-TrkB. Daher wurde in der Arbeitsgruppe von M. Chao am Skirball Institute (New York, USA) ein Antiserum entwickelt, das spezifisch die phosphorylierte Form des TrkB Rezeptors (p-TrkB) erkennt. Freundlicherweise wurde uns dieser p-TrkB Antikörper von M. Chao (Skirball Institute) zur Verfügung gestellt. Um die Spezifität dieses neuen Antikörpers zu testen, wurden HEK 293T Zellen mit TrkB transfiziert und in Abwesenheit des Liganden BDNF kultiviert. Kurz bevor die Zellen fixiert wurden, erhielt der erste Teil der Zellen einen 5 min Puls mit 10 ng/ml BDNF, der zweite Teil einen 15 min Puls mit 10 ng/ml BDNF und der dritte Teil wurde als Kontrollkultur ohne weitere Zugabe sofort fixiert. Anschließend wurden die 293T Zellen mit TrkB sowie dem neuen p-TrkB Antikörper gefärbt und konfokal mikroskopiert. In den Kontrollkulturen ohne BDNF Zugabe, war TrkB besonders stark in der Zellmembran der 293T Zellen lokalisiert, teilweise aber auch Zellinneren (Abb. 5a). P-TrkB war in den Kontrollkulturen dagegen kaum nachweisbar (Abb. 5b). Nach der Zugabe eines 5 min BDNF Pulses war TrkB mit starker Intensität in der Zellmembran der 293T Zellen lokalisiert (Abb. 5c). P-TrkB war nach Zugabe des 5 min Pulses deutlich in der Zellmembran und im angrenzenden Zellinneren zu erkennen. Interessanterweise war p-TrkB vor allem auch in den Filopodien der 293T Zellen lokalisiert (Abb. 5d). Auch die Zugabe eines 15 min BDNF Pulses zur transfizierten 293T Zellkultur bewies die Spezifität des p-TrkB Antikörpers. Immunreaktivität für TrkB zeigte sich wiederum in der Zellmembran und auch im Inneren der Zellen (Abb. 5e), während p-TrkB neben der Zellmembran vor allem

im Inneren der Zelle und in den Filopodien dieser Zellen lokalisiert war (Abb. 5f). In den untransfizierten Kontrollkulturen der 293T Zellen fand sich erwartungsgemäß weder Immunreaktivität für TrkB (Abb. 5g), noch für p-TrkB (Abb. 5h).

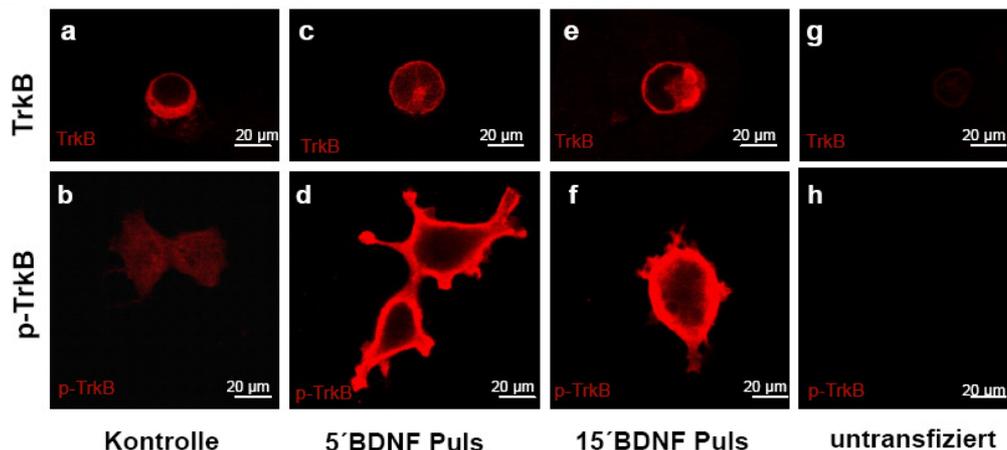


Abbildung 5: Spezifitätsnachweis des p-TrkB Antikörpers

Der neue p-TrkB Antikörper weist spezifisch die phosphorylierte Form des TrkB Rezeptors nach. In 293T Zellen (a-h), die nach TrkB Transfektion einen Puls des Liganden BDNF erhalten hatten, ließ sich p-TrkB Immunreaktivität (rot) vor allem an der Zelloberfläche sowie in Filopodien nachweisen (e,f). In den 293T Kontrollkulturen (b) sowie den untransfizierten 293T Zellen (h) dagegen fand sich erwartungsgemäß keine Immunreaktivität für p-TrkB.

In einem zweiten Versuch wurde zusätzlich die Spezifität des p-TrkB Antikörpers bei primären Motoneuronen überprüft. Dazu wurden Motoneurone an Embryonaltag (E)13,5 aus N-trk2 ^{-/-} Mäusen isoliert und in Gegenwart von 1 ng/ml CNTF und BDNF kultiviert. Nach sieben Tagen in Kultur wurden diese Motoneurone fixiert und mit Antikörpern gegen TrkB, p-TrkB sowie dem Dendritenmarker Map-2 gefärbt. Auch dieser Versuch bewies die Spezifität des Antikörpers, da in diesen TrkB k.o. Motoneuronkulturen erwartungsgemäß weder TrkB (Abb. 5i) noch p-TrkB (Abb. 5j,k) nachweisbar war.

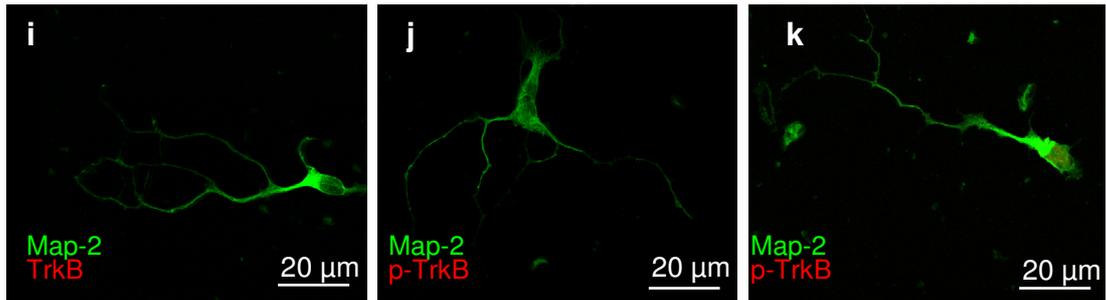


Abbildung 5 i-k: Spezifitätsbestimmung des p-TrkB Antikörpers

Der neue p-TrkB Antikörper weist spezifisch die phosphorylierte Form des TrkB Rezeptors nach. Auch in N-trk2^{-/-} Motoneuronen war zwar der Dendritenmarker Map-2 (grün) deutlich nachweisbar, jedoch keine Immunreaktivität für Trk B (i) oder p-TrkB (j,k).

3.1.2 Subzelluläre Lokalisation von TrkB und p-TrkB auf kultivierten Motoneuronen

BDNF ist ein potenter neurotropher Wachstumsfaktor aus der Gruppe der Neurotrophine, der in biomedizinischer Hinsicht vor allem durch seine protektiven Auswirkungen bei degenerativen Motoneuronenerkrankungen und Nervenverletzungen bekannt geworden ist (Sagot et al., 1998b; Jablonka et al., 2004; Friedman et al., 1995; Kishino et al., 1997). Seine biologischen Effekte werden vor allem durch den hochaffinen Neurotrophinrezeptor TrkB vermittelt (Klein et al., 1991). Nach Bindung des Liganden dimerisiert TrkB. Durch die anschließende aktivierende Phosphorylierung werden verschiedene Wege der Signaltransduktion eingeschlagen, die die zahlreichen Effekte von BDNF auf das Motoneuron bewirken. Obwohl bereits viele Auswirkungen von BDNF auf Motoneurone beschrieben sind, ist die genaue subzelluläre Lokalisation von TrkB und p-TrkB bisher nicht bekannt. Daher war das erste Ziel dieser Arbeit, die genaue subzelluläre Lokalisation dieses Rezeptors auf Motoneuronen zu untersuchen.

3.1.2.1 TrkB ist im Perikaryon, auf Dendriten und im Wachstumskegel in hoher Intensität und im Axon in geringerer Intensität lokalisiert

Zunächst wurde die subzelluläre Verteilung des nicht-aktivierten TrkB Rezeptors untersucht. In primären Motoneuronen, die sieben Tage lang in Gegenwart von 1 ng/ml des TrkB Liganden BDNF kultiviert wurden, war TrkB in hoher Intensität im Zellkörper der Motoneurone lokalisiert. Auch kolokalisierte TrkB mit Map-2 in den Dendriten (Abb. 6a). Im Axon war die Immunreaktivität gegen TrkB schwächer ausgeprägt, aber in höherer Vergrößerung sichtbar (Abb. 6a,h). Die axonalen Wachstumskegel der embryonalen Motoneurone wiesen dagegen eine starke Immunreaktivität für TrkB auf (Abb. 6g, h).

Um zu untersuchen, ob die Verteilung des TrkB Rezeptors abhängig von der Anwesenheit seines Liganden BDNF ist, wurden Motoneurone sieben Tage lang mit CNTF kultiviert. Im Vergleich zu den BDNF Kulturen zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Verteilung des Rezeptors. Auch in den mit CNTF kultivierten Motoneuronen zeigte sich Immunreaktivität für TrkB hauptsächlich in den Dendriten, im Perikaryon, im Wachstumskegel und in geringer Intensität auch im Axon der Motoneurone.

In einer zweiten Reihe von Experimenten wurde untersucht, wo TrkB kurz nach der Aktivierung des Neurotrophinrezeptors in Motoneuronen lokalisiert ist. Dazu wurden Motoneurone sieben Tage lang zunächst nur mit CNTF kultiviert. Kurz bevor die Zellen am siebten Tag fixiert wurden, erhielten sie einen 15 min Puls mit dem TrkB Liganden BDNF (10 ng/ml). Auch unter diesen Bedingungen änderte sich die subzelluläre Lokalisation von TrkB nicht. Wiederum zeigte sich eine starke Anfärbung der Dendriten, des Perikaryons und der Wachstumskegel und eine schwächere Immunreaktivität für TrkB innerhalb des Axons.

3.1.2.2 p-TrkB ist in vesikulären Strukturen im Perikaryon, auf Dendriten und im Axon in hoher Intensität lokalisiert

Nachdem die Transfektionsversuche die Effizienz und Spezifität des neuen p-TrkB Antikörpers bewiesen hatten (siehe 3.1.1), konnte nun erstmalig die genaue Lokalisation von p-TrkB auf primären Motoneuronen untersucht werden. Die phosphorylierte Form des TrkB Rezeptors ist in Motoneuronen, die in Anwesenheit ihres Liganden BDNF (1 ng/ml) kultiviert wurden, insbesondere im Perikaryon und sowohl in Dendriten als auch im Axon deutlich zu erkennen (Abb. 6b). Die Immunreaktivität im Axon war dabei für p-TrkB sehr viel stärker ausgeprägt als für TrkB (Abb. 6a). Auch schienen die distalen Anteile des Axons eine höhere Immunreaktivität für p-TrkB aufzuweisen, als die proximalen Anteile des Axon (Abb. 6b). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei Motoneuronen, die sieben Tage lang in Abwesenheit des Liganden BDNF kultiviert worden waren, keine Anfärbung des Axons, sondern lediglich eine geringe Anfärbung des Perikaryon (Abb. 6d).

In einer zweiten Reihe von Experimenten wurde untersucht, wo sich der aktivierte Neurotrophinrezeptor p-TrkB kurz nach dessen Phosphorylierung in primären Motoneuronen befindet. Dazu wurden Motoneurone sieben Tage lang in Abwesenheit des TrkB Liganden kultiviert. Die Zugabe eines neurotrophen Faktors zur primären Motoneuronkultur ist jedoch notwendig, da die Motoneurone ohne trophische Signale in Apoptose gehen würden. Daher wurde der Kultur CNTF (1 ng/ml) zugesetzt, welches den TrkB Rezeptor nicht aktivieren kann. Kurz vor der Fixierung wurde der Zellkultur dann ein 15 min langer BDNF Puls (10 ng/ml) zugegeben. Unter diesen Bedingungen war p-TrkB in hoher Intensität im Zellkörper der Motoneurone lokalisiert (Abb. 6e,f). Interessanterweise zeigte sich die Immunfluoreszenz für p-TrkB dabei vor allem in vesikulären Strukturen im Perikaryon (Abb.6f). Weiterhin war kurz nach der Aktivierung des TrkB Rezeptors auch eine starke axonale Färbung für p-TrkB auffällig, vor allem im distalen Axon (Abb. 6c).

Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass die Immunreaktivität für TrkB vor allem auf Dendriten und im Zellkörper der Motoneurone in hoher Intensität zu detektieren war. Die phosphorylierte Form des TrkB Rezeptors war ebenfalls in den Dendriten und in deutlich sichtbaren vesikulären Strukturen im Perikaryon lokalisiert. Innerhalb des Axons war die Immunfluoreszenz für p-TrkB deutlich stärker ausgeprägt als für TrkB. Die axonale Färbintensität für p-TrkB steigerte sich durch die Zugabe des physiologischen Liganden BDNF noch weiter. Dies scheint nahezu legen, dass die meisten TrkB Rezeptoren im terminalen Axon normalerweise in nicht phosphorylierter Form vorliegen und erst nach Ligandenbindung aktiviert, internalisiert und dann retrograd transportiert werden.

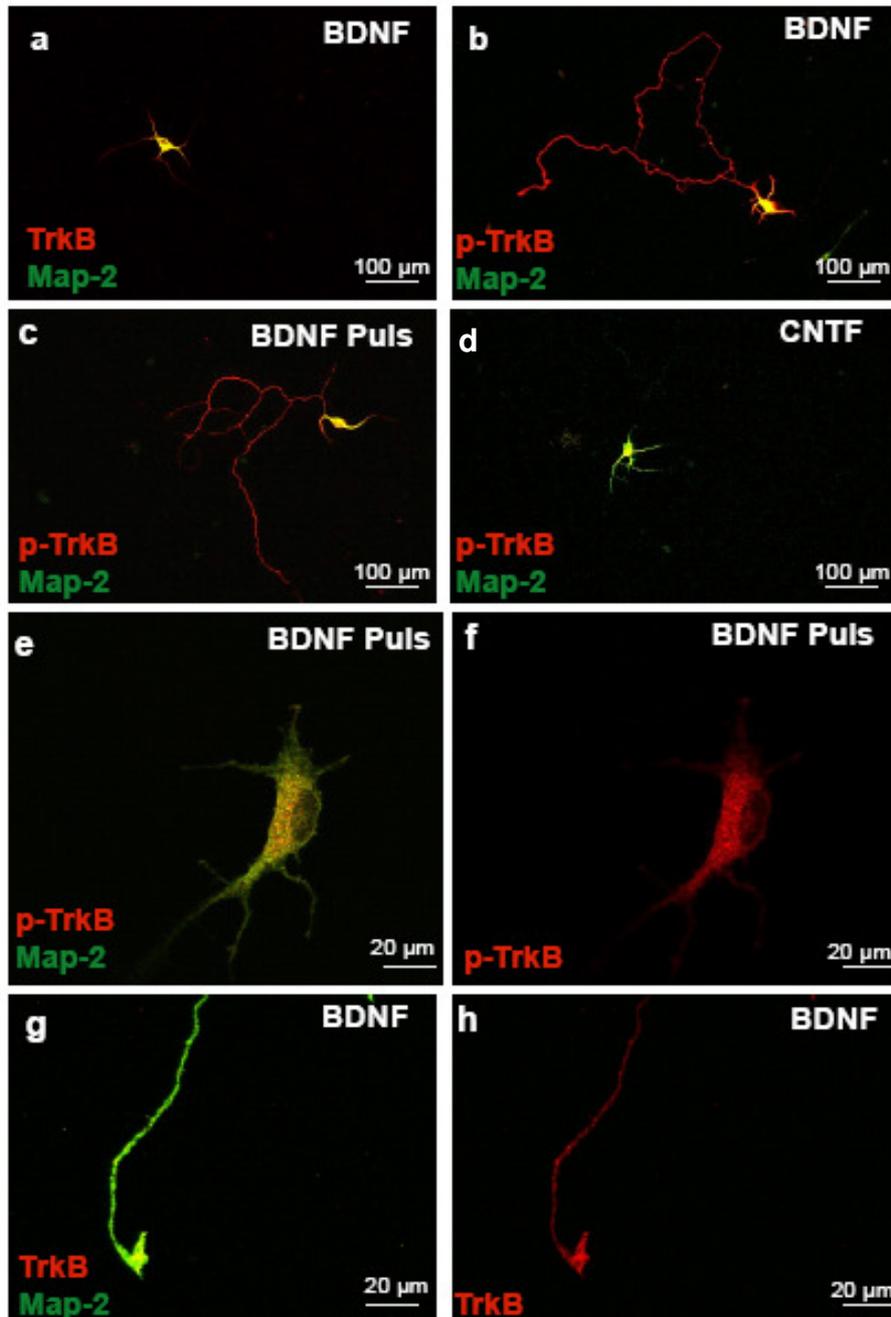


Abbildung 6: Subzelluläre Lokalisation von TrkB und p-TrkB auf primären Motoneuronen

TrkB ist auf den Dendriten und innerhalb der Zellkörper lokalisiert (a). Immunreaktivität für TrkB zeigt sich bei hoher Vergrößerung auch im Axon und dem Wachstumskegel (g,h). In Anwesenheit von BDNF findet sich p-TrkB in hoher Intensität im Axon des Motoneuron (b,c) und in vesikulären Strukturen im Zellkörper (e,f). In Abwesenheit des Liganden findet sich p-TrkB nur in schwacher Intensität (d).

3.1.3 Subzelluläre Lokalisation von gp130 und Stat3 auf kultivierten Motoneuronen

Neben BDNF ist auch CNTF ein bedeutender Überlebensfaktor für spinale Motoneurone, besonders in Gegenwart von Stressoren. Nach Entzug anderer trophischer Substanzen verhindert CNTF die Apoptose der Motoneurone (Tan et al., 1996). Nach Nervenverletzungen, wie einer Axotomie, wird CNTF physiologischerweise hochreguliert und agiert somit als endogener Schutzfaktor für die durchtrennten Nervenfasern (Sendtner et al., 1997). CNTF gehört zur Familie der Neurozytokine. Der vollständig assemblierte CNTF Rezeptorkomplex besteht aus CNTFR α , gp130 und LIFR β (Ip et al., 1993; Davis et al., 1993; Ip et al., 1992). Die zellulären Effekte nach der Aktivierung des Rezeptors werden unter anderem durch den JAK-STAT Signalweg vermittelt (Stahl et al., 1995). Obwohl zahlreiche Effekte von CNTF auf gesunde und erkrankte Motoneurone beschrieben worden sind, blieb die genaue subzelluläre Verteilung der CNTF Rezeptoruntereinheiten auf Motoneuronen bisher unklar. Daher wurde im Folgenden die genaue Lokalisation von gp130 und p-Stat3 auf primären Motoneuronen untersucht und mit der Verteilung des BDNF Rezeptors verglichen.

3.1.3.1 Gp 130 ist im Perikaryon, auf Dendriten und im Wachstumskegel in höherer Intensität als im Axon von Motoneuronen lokalisiert

Zunächst wurde die subzelluläre Verteilung von gp 130 auf primären Motoneuronen untersucht. Das Glykoprotein gp130 ist ein essentieller Bestandteil des CNTF-Rezeptorkomplexes, da die ligandenbindende Einheit CNTFR α selbst keine Signaltransduktion übernehmen kann. Aber auch für die Rezeptoren von IL-6, LIF, CT-1 und CLC spielt gp 130 eine wichtige Rolle.

Immunreaktivität für gp130 konnte bei Motoneuronen, die sieben Tage lang in Anwesenheit von CNTF (1 ng/ml) kultiviert worden waren, in den Dendriten und im Zellkörper von Motoneuronen nachgewiesen werden (Abb. 7a,e,f). Des

Weiteren wurde eine starke Immunreaktivität auch in den axonalen Wachstumskegeln der kultivierten embryonalen Motoneurone beobachtet (Abb. 7a Pfeil, sowie 7g,h). Im Axon selbst war gp130 nur in relativ geringer Intensität lokalisiert (Abb. 7a), aber bei starker Vergrößerung gut zu erkennen (Abb. 7h).

Um zu untersuchen, ob die Verteilung der gp130 Rezeptoreinheit abhängig von der Anwesenheit des Liganden CNTF ist, wurden Motoneurone sieben Tage lang mit GDNF kultiviert. Im Vergleich zu den CNTF Kulturen zeigte sich jedoch kein Unterschied in der Verteilung der Rezeptoreinheit. Auch in Abwesenheit des Liganden zeigte sich Immunreaktivität für gp130 hauptsächlich in den Dendriten, im Perikaryon, im Wachstumskegel und in geringer Immunreaktivität auch im Axon der Motoneurone. Das bedeutet, dass CNTF nicht selbst die Verteilung der Rezeptoreinheit gp130 reguliert, sondern, dass die Rezeptorverteilung unabhängig von der Anwesenheit des Liganden ist.

In einer zweiten Reihe von Experimenten wurde untersucht, wo gp130 kurz nach der Aktivierung des CNTF Rezeptors in Motoneuronen lokalisiert ist. Dazu wurden Motoneurone sieben Tage lang zunächst in Abwesenheit des Liganden, nur mit GDNF kultiviert. Kurz bevor die Zellen am siebten Tag fixiert wurden, erhielten sie einen 15 min Puls mit dem Liganden CNTF (10 ng/ml). Auch unter diesen Bedingungen änderte sich die subzelluläre Lokalisation von gp130 nicht.

Wiederum zeigte sich eine starke Anfärbung der Dendriten, des Perikaryons und der Wachstumskegel und eine schwächere Immunreaktivität innerhalb des Axons. Diese Befunde sprechen also eher gegen eine Internalisierung und retrograden Transport der gp130 Rezeptoreinheit nach Rezeptoraktivierung.

3.1.3.2 p-Stat3 ist in hoher Intensität im Perikaryon, auf Dendriten und im Axon lokalisiert

Als Marker für den aktivierten CNTF Rezeptor wurde Stat3 gewählt. Stat3 wird nach Ligandenbindung des CNTF Rezeptors über die Janus Kinase 1 aktiviert (phosphoryliert) und wandert dann in den Zellkern, wo es als

Transkriptionsfaktor auf DNA Ebene wirkt. In Anwesenheit des Liganden CNTF wurde Immunreaktivität für aktiviertes p-Stat3 sowohl in Dendriten, im Soma als auch sehr prominent im Axon gefunden (Abb. 7b). Die Signalintensität für p-Stat3 im Axon war bei CNTF behandelten Motoneuronen wesentlich stärker ausgeprägt als die Immunreaktivität für gp130. Weiterhin ließ sich eine auffällige Diskrepanz in der Immunreaktivität gegen p-Stat3 zwischen dem distalen und proximalen Axon beobachten: im distalen Anteil des Axons war die Immunfluoreszenz für p-Stat3 stärker ausgeprägt als im proximalen Anteil (Abb. 7b). Auch die Wachstumskegel der Motoneurone wiesen eine auffällig starke Immunreaktivität für p-Stat3 auf. Im Gegensatz dazu war p-Stat3 bei Kontrollmotoneuronen, die in Abwesenheit des Liganden CNTF kultiviert worden waren, im Axon nicht detektierbar (Abb. 7d) und nur in sehr geringer Intensität im Zellkörper und den proximalen Dendriten nachzuweisen. Daraus kann geschlossen werden, dass der Signalmediator Stat3 in Abwesenheit des Liganden CNTF nur im Zellkörper in phosphorylierter Form vorliegt. Erst nach der Aktivierung des CNTF Rezeptors wird Stat3 aktiviert und ist dann auch in den Dendriten und im Axon nachzuweisen.

In einer zweiten Reihe von Experimenten wurde die Verteilung des aktivierten Mediators p-Stat3 kurz nach dessen Phosphorylierung in primären Motoneuronen untersucht. Dazu wurden Motoneurone sieben Tage lang in Abwesenheit des Liganden lediglich mit GDNF kultiviert. Kurz vor der Fixierung wurde der Zellkultur dann ein 15 min langer CNTF Puls (10 ng/ml) zugegeben. Unter diesen Bedingungen wurde p-Stat3 in starker Färbeintensität sowohl im Soma als auch in den Dendriten, im Wachstumskegel und auch im Axon nachgewiesen (Abb. 7c). Dabei ist bemerkenswert, dass die Intensität der Axonfärbung für p-Stat3 kurz nach der Aktivierung des CNTF Rezeptors im distalen Anteil des Axons sehr viel stärker ausgeprägt ist, als im proximalen Anteil, wo nur wenig p-Stat3 nachzuweisen war (Abb. 7c). Hieraus lässt sich schließen, dass die meisten Stat3 Mediatoren im Axon erst nach der Aktivierung des CNTF Rezeptors phosphoryliert werden und dann retrograd zum Zellkörper transportiert werden.

3.1.4 Subzelluläre Lokalisation von c-Ret und p-Ret auf kultivierten Motoneuronen

GDNF ist ein potenter neurotropher Faktor für Motoneurone aus der Gruppe der TGF β -Superfamilie (Henderson et al., 1994). Die Bindung von GDNF an die GDNFR α Rezeptoruntereinheit rekrutiert die Tyrosinkinase Ret in die Lipid Rafts. Innerhalb dieser lipidreichen Membranareale wird dann die Signaltransduktion über c-Ret initiiert (Paratcha et al., 2001). Über das Transmembranprotein c-Ret werden die verschiedenen zellulären Effekte von GDNF übermittelt, beispielsweise ein Überlebenssignal für Motoneurone (Jing et al., 1996), aber auch das Auswachsen von Neuriten (Uchida et al., 2006). Obwohl diese Effekte schon vor längerer Zeit beschrieben worden sind, ist die genaue subzelluläre Verteilung von c-Ret in Motoneuronen bisher nicht genau charakterisiert worden. Daher wurde im Rahmen der dritten Versuchsreihe die subzelluläre Lokalisation der c-Ret Tyrosinkinase, sowie der phosphorylierten Untereinheit p-Ret auf primären Motoneuronen untersucht.

3.1.4.1 c-Ret ist an der Oberfläche des Perikaryons, im Wachstumskegel und besonders stark auf den Dendriten lokalisiert

C-Ret war bei Motoneuronen, die in Gegenwart des Liganden GDNF (1 ng/ml) kultiviert worden waren, im Perikaryon und auffällig stark in den Dendriten lokalisiert (Abb. 8A a,b). Im Perikaryon der Motoneurone war c-Ret hauptsächlich an der Zelloberfläche zu erkennen, während innerhalb der Zelle selbst kaum Immunreaktivität gegen c-Ret detektiert werden konnte (Abb. 8A e,f). Dieses Verteilungsmuster deutet darauf hin, dass c-Ret weitgehend in der Zellmembran der Motoneurone lokalisiert ist. Innerhalb der Map-2 positiven Dendriten zeigte sich eine besonders intensive Immunreaktivität für c-Ret, die darauf schließen lässt, dass c-Ret in hoher Dichte innerhalb der Dendriten lokalisiert ist. Überraschenderweise konnte im Axon jedoch keine Immunreaktivität für c-Ret nachgewiesen werden (Abb. 8A a,b). Selbst bei konfokalen Analysen in hoher Vergrößerung konnte kein c-Ret innerhalb des

Axons beobachtet werden (Abb. 8A e,f; der Pfeil markiert den Abgang des Axons). Dagegen war Immunreaktivität gegen c-Ret in den Wachstumskegel embryonaler Motoneurone klar zu erkennen (Abb. 8B). Auch bei Analysen der Rezeptorverteilung an den Wachstumskegeln embryonaler Motoneurone zeigte sich kaum c-Ret Lokalisation im Axon selbst.

Um zu untersuchen, ob die Verteilung der c-Ret Rezeptoreinheit abhängig von der Anwesenheit des Liganden GDNF ist, wurden Motoneurone sieben Tage lang mit BDNF kultiviert. Auch in Abwesenheit des Liganden zeigte sich Immunreaktivität für c-Ret in den Dendriten, an der Zelloberfläche des Zellkörpers und an den Wachstumskegeln der embryonalen Motoneurone (Abb. 8A c). Damit weisen die Motoneurone in Abwesenheit des Liganden das gleiche Verteilungsmuster für c-Ret wie Motoneurone, die mit GDNF kultiviert werden, so dass GDNF die Rezeptorverteilung wohl nicht selbst reguliert.

3.1.4.2 p-Ret ist im Perikaryon, im Wachstumskegel und besonders stark auf den Dendriten lokalisiert

Als Marker für den aktivierten GDNF Rezeptor wurde ein spezifischer Antikörper gegen die phosphorylierte Form, p-Ret, gewählt. Motoneurone, die in Anwesenheit des Liganden GDNF kultiviert wurden, zeigten innerhalb der Map-2 positiven Dendriten besonders intensive Immunreaktivität für p-Ret. Dies lässt darauf schließen, dass auch aktiviertes p-Ret in hoher Dichte innerhalb der Dendriten lokalisiert ist (Abb. 8A c,g,h). Im Zellkörper embryonaler Motoneurone war p-Ret an der Oberfläche des Zellkörpers lokalisiert. Zusätzlich fand sich p-Ret, im Gegensatz zu c-Ret, aber auch innerhalb der Perikarya (Abb. 8A g, h). Dies deutet auf eine Endozytose des aktivierten Rezeptors nach Ligandenbindung hin. Weiterhin war p-Ret auch an den Wachstumskegeln der embryonalen Motoneurone lokalisiert. Im Axon selbst war p-Ret jedoch nicht nachzuweisen (Abb. 8A g, h; der Pfeil markiert den Abgang des Axons); ganz im Gegensatz zu den aktivierten Formen des BDNF und CNTF Rezeptors, die

in Anwesenheit ihres Liganden eine starke Immunreaktivität entlang des Axons gezeigt hatten.

Wurden Motoneurone in Abwesenheit des Liganden GDNF kultiviert, war p-Ret in den Dendriten und an der Oberfläche der Zellkörper lokalisiert, allerdings war die Färbintensität nicht ganz so intensiv (Abb. 8A d). Auch war kaum Immunreaktivität für p-Ret innerhalb des Zellkörpers nachweisbar. Diese Ergebnisse legen nahe, dass nur der durch den Liganden aktivierte Rezeptor (p-Ret) internalisiert wird, während c-Ret in Abwesenheit von GDNF membranständig bleibt.

In einer zweiten Reihe von Experimenten wurde untersucht, wo p-Ret kurz nach der Aktivierung des GDNF Rezeptors lokalisiert ist. Dazu wurden Motoneurone zunächst sieben Tage lang in Abwesenheit von GDNF kultiviert. Kurz vor der Fixierung der Zellen, erhielten die Motoneurone einen 15 min Puls mit dem Liganden GDNF (10 ng/ml). Unter diesen Bedingungen zeigte sich eine starke Anfärbung der Dendriten für p-Ret (Abb. 8A c). Außerdem war Immunreaktivität für p-Ret deutlich innerhalb der Zellkörper und auch an den Wachstumskegeln zu erkennen (Abb. 8A c). Auch diese Befunde sprechen für eine Endozytose der aktivierten Rezeptereinheit nach der Bindung des Liganden GDNF. Dagegen war auch in dieser Reihe von Experimenten kein p-Ret in den Axonen der Motoneurone nachweisbar; vielmehr brach die im Perikaryon vorhandene Immunreaktivität für p-Ret am Axonhügel abrupt ab.

Zusammenfassend lässt sich daher feststellen, dass c-Ret in hoher Intensität in den Dendriten der Motoneurone lokalisiert ist. Daneben findet sich c-Ret auch an der Oberfläche der Motoneuronzellkörper und an den Wachstumskegeln. Im Axon selbst ist c-Ret jedoch nachweisbar. Aktiviertes p-Ret ist in hoher Intensität in den Dendriten, dem Zellinneren der Perikarya und an den Wachstumskegeln der Motoneurone lokalisiert. Im Gegensatz zu p-TrkB und p-Stat3, die in Anwesenheit ihres Liganden starke Immunreaktivität im Axon zeigen, ist p-Ret aber nicht innerhalb des Axons selbst nachzuweisen.

A

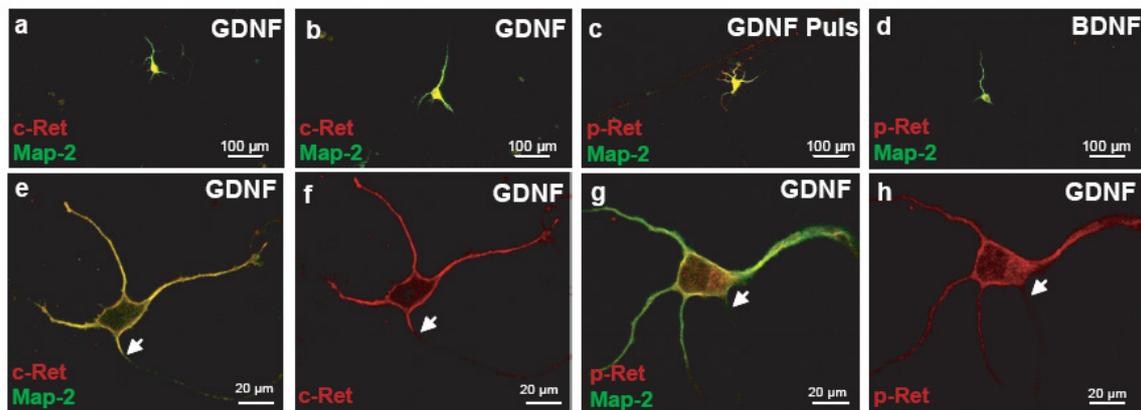


Abbildung 8A: Subzelluläre Verteilung von c-Ret und p-Ret in primären Motoneuronen

C-Ret ist in hoher Intensität in den Dendriten (a,e,f) und auch an der Oberfläche des Zellkörpers der Motoneurone (a,e,f) lokalisiert. Selbst in der hochauflösenden konfokalen Analyse findet sich aber kaum c-Ret im Axon (e,f: der Pfeil markiert den Axonhügel des Motoneurons). In Anwesenheit des Liganden GDNF ist p-Ret in hoher Intensität auf den Dendriten (c,g,h) und auch intrazellulär im Zellkörper lokalisiert, nicht jedoch im Axon. Ohne Ligand ist kaum Immunreaktivität für p-Ret nachweisbar (d).

B

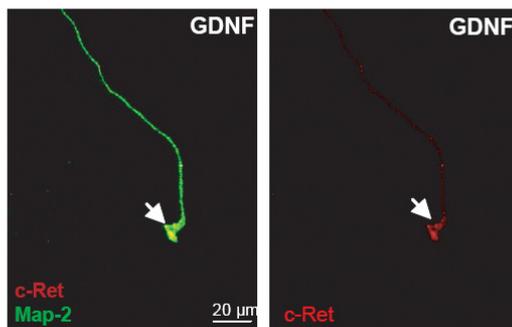


Abbildung 8B: Subzelluläre Verteilung von c-Ret in Wachstumskegeln von Motoneuronen

C-Ret ist auch im Wachstumskegel (Pfeil, 8B) embryonaler Motoneurone lokalisiert. Selbst bei hoher Vergrößerung findet sich jedoch kaum Immunreaktivität für c-Ret oder p-Ret im Axon selbst.

3.2 Lokalisation der Rezeptoren neurotropher Faktoren *in vivo*

Nachdem im Rahmen dieser Arbeit distinkte Unterschiede in der subzellulären Verteilung der Rezeptoren für neurotrophe Faktoren in embryonalen Motoneuronen *in vitro* gefunden worden waren, wurde in einer weiteren Versuchsreihe die Verteilung der BDNF, CNTF und GDNF Rezeptoren *in vivo* untersucht. Dazu wurde die Rezeptorlokalisierung entlang des gesamten Motoneurons im lumbalen Rückenmark, im N. phrenicus und an den Axonterminalen motorischer Endplatten des Diaphragmas von adulten Mäusen analysiert.

3.2.1 *In vivo* Lokalisation der Rezeptoren für neurotrophe Faktoren im lumbalen Rückenmark

Um die subzelluläre Lokalisation der Marker für neurotrophe Faktoren im Rückenmark zu untersuchen, wurde das lumbale Rückenmark adulter Mäuse entnommen und 10 µm dicke Gefrierschnitte präpariert. Anschließend erfolgte die Färbung der Gefrierschnitte mit Primärantikörpern gegen TrkB, p-TrkB, gp130, p-Stat3, c-Ret, p-Ret and Map-2. Die spinalen α -Motoneurone konnten anhand ihrer charakteristischen Form und Größe sowie ihrer Lage im Vorderhorn des Rückenmarkes identifiziert werden.

In Übereinstimmung mit den Befunden der *in vitro* Untersuchungen, war die Immunreaktivität für TrkB sehr stark in den Map-2 positiven Fortsätzen der Motoneurone zu finden. Weiterhin fand sich starke Immunreaktivität auch innerhalb der Zellkörper der Motoneurone (Abb. 9a). Die Immunreaktivität für aktiviertes p-TrkB war sehr schwach innerhalb der Zellkörper der α -Motoneurone, aber in der perinukleären Region klar zu erkennen (Abb. 9b Pfeil). Diese Lokalisation von p-TrkB deutet auf eine Rezeptorinternalisierung nach der Aktivierung des Neurotrophinrezeptors hin. P-TrkB konnte außerdem in den Map-2 positiven Fortsätzen im Vorderhorn und auch in Gliazellen

nachgewiesen werden, allerdings war die Färbeintensität weitaus geringer ausgeprägt als für TrkB.

In Einklang mit den *in vitro* Ergebnissen, konnte die Signaltransduktionseinheit des GDNF Rezeptors, c-Ret, reichlich in den Map-2 positiven Dendriten und an der Oberfläche der Motoneuronzellkörper nachgewiesen werden (Abb. 9c). Immunreaktivität für p-Ret war in Dendriten und in perinukleären Strukturen in schwacher Intensität zu finden (Abb. 9d Pfeil). Im Gegensatz zu c-Ret war p-Ret aber hauptsächlich im Inneren des Zellkörpers der Motoneurone lokalisiert (Abb. 9d), was auf eine Rezeptorendozytose nach Aktivierung hindeutet.

Immunreaktivität für die CNTF Rezeptoruntereinheit gp130 war im lumbalen Rückenmark *in vivo* relativ gering ausgeprägt. Punktuelle Färbung konnte innerhalb der Zellkörper der Motoneurone beobachtet werden (Abb. 9e, Pfeil). Zusätzlich war gp130 auch in den Dendriten nachweisbar. Der aktivierte Downstream-Mediator p-Stat3 war in geringer Intensität sowohl in Dendriten als auch im Zellkörper der Motoneurone lokalisiert (Abb. 9f). Hierbei war die Immunreaktivität überwiegend in der Nähe des Zellkerns lokalisiert

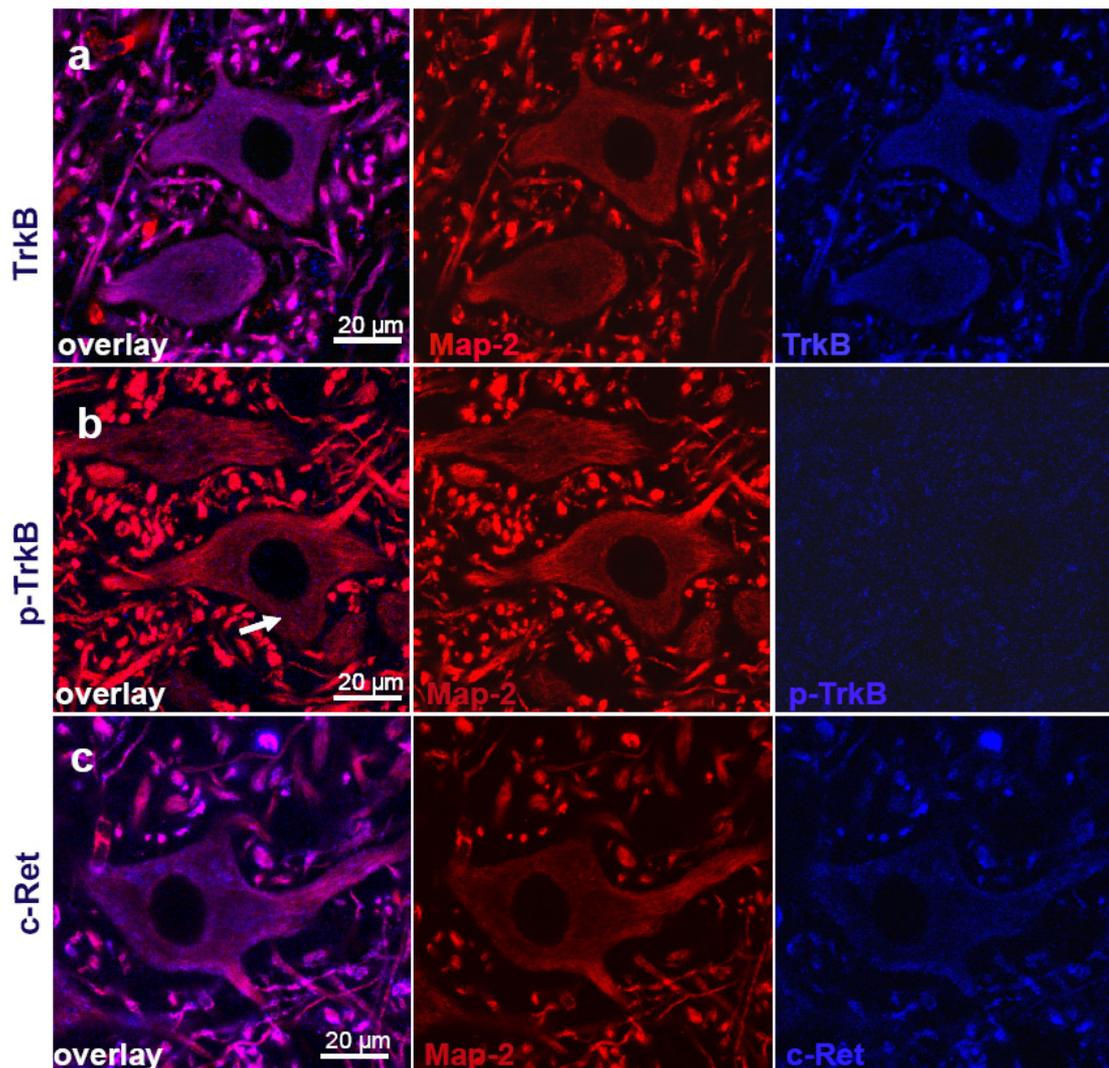


Abbildung 9 a-c: Subzelluläre Verteilung von TrkB, p-TrkB und c-Ret im Vorderhorn des lumbalen Rückenmarks *in vivo*

Im Vorderhorns des lumbalen Rückenmarks ist TrkB sehr stark in den Map-2 positiven Fortsätzen sowie intrazellulär im Zellkörper der Motoneurone (a) lokalisiert. Die Immunreaktivität für aktiviertes p-TrkB ist innerhalb der Zellkörper sehr schwach, dort aber vor allem in der perinukleären Region zu erkennen (b, Pfeil). C-ret ist reichlich in den Map-2 positiven Dendriten und auch an der Oberfläche der Motoneuronzellkörper zu finden (c).

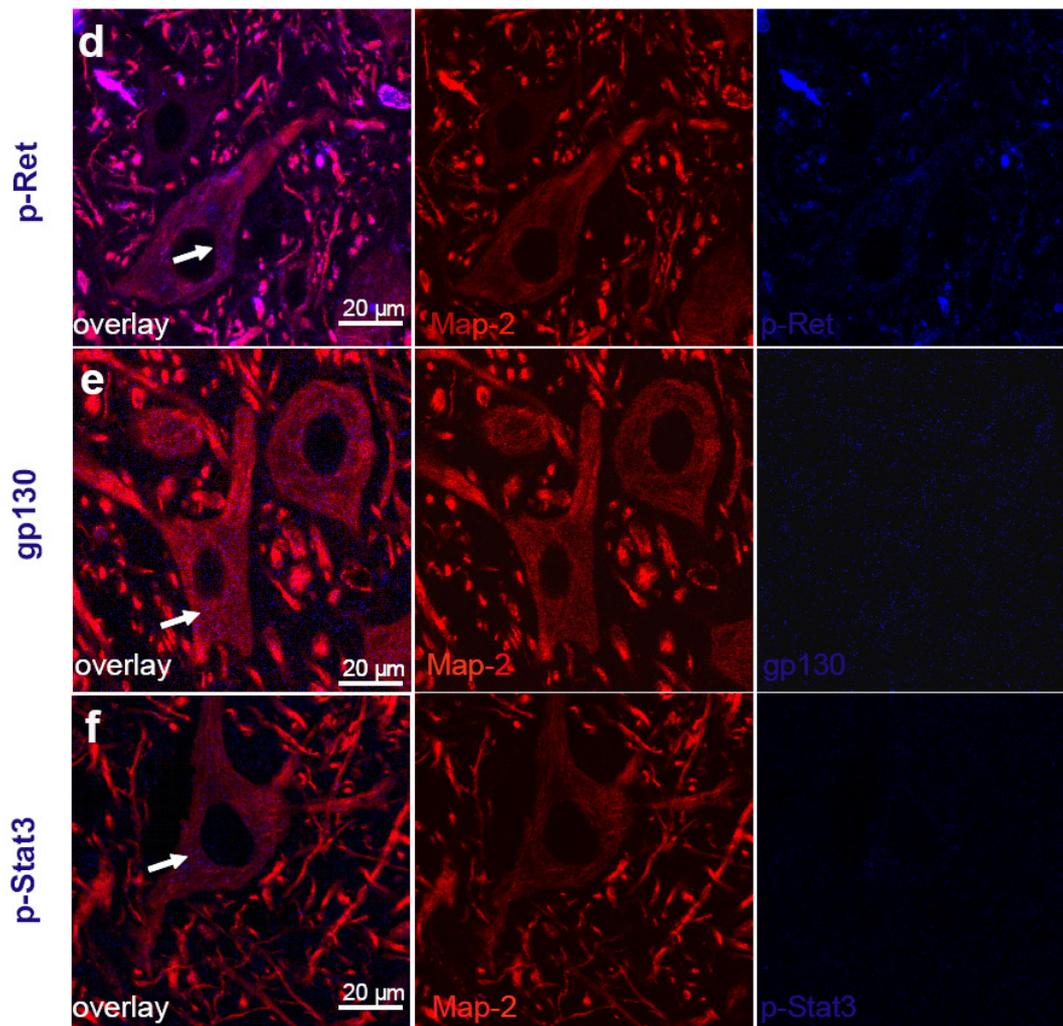


Abbildung 9d-f: Subzelluläre Verteilung von p-Ret, gp130 und p-Stat3 im Vorderhorn des lumbalen Rückenmarkes *in vivo*

Immunreaktivität für p-Ret ist in schwacher Intensität in Dendriten und im perinukleärem Zytoplasma der lumbalen Motoneurone zu finden. Im Gegensatz zu c-Ret ist p-Ret hauptsächlich intrazellulär im Zellkörper der Motoneurone lokalisiert und weniger an der Zelloberfläche (d). Gp130 Immunreaktivität ist im Vorderhorn des lumbalen Rückenmarks *in vivo* relativ gering ausgeprägt. Punktuelle Färbung kann innerhalb der Zellkörper der Motoneurone (Pfeil) sowie in Neuriten beobachtet werden (e). Aktiviertes p-Stat3 ist in geringer Intensität sowohl in Dendriten als auch im Zellkörper der Motoneurone lokalisiert (f). Hierbei ist die Immunreaktivität überwiegend in der Nähe des Zellkerns zu finden (Pfeil,f).

3.2.2 *In vivo* Lokalisation der Rezeptoren für neurotrophe Faktoren an den Axonterminalen motorischer Endplatten

Im Rahmen dieser Arbeit waren an den Wachstumskegeln kultivierter embryonaler Motoneurone Rezeptoren für neurotrophe Faktoren nachgewiesen worden. Daher wurde nun in einem weiteren Versuch untersucht, ob und wie Rezeptoren und Mediatoren für BDNF, CNTF und GDNF an den Axonterminalen motorischer Endplatten adulter Motoneurone *in vivo* verteilt sind. Dazu wurden gezupfte Muskelfaserpräparate des Zwerchfells von adulten Mäusen präpariert. Die motorischen Endplatten der Muskelzupfpräparate konnten sodann anhand ihres Azetylcholinrezeptors mittels Alexa Flour 488 konjugiertem α -Bungarotoxin identifiziert werden. Die BDNF, CNTF und GDNF Rezeptoren und ihre Signalmediatoren wurden durch indirekte Immunfluoreszenz gegen TrkB, p-TrkB, gp130, p-Stat3, c-Ret und p-Ret dargestellt.

Die Axonterminalen motorischer Endplatten wiesen im präsynaptischen Bereich eine hohe Immunreaktivität für den BDNF Rezeptor TrkB auf (Abb. 10a). Ebenso war auch Immunreaktivität gegen den aktivierten Rezeptor p-TrkB an den motorischen Endplatten gut zu erkennen (Abb. 10b). Auch die CNTF Rezeptoruntereinheit gp 130 war an den Axonterminalen der Motoneurone *in vivo* lokalisiert (Abb. 10c), dabei war die Färbungsintensität in der präsynaptischen Zone der motorischen Endplatten besonders intensiv. Moderate Immunreaktivität gegen aktiviertes p-Stat3 konnte ebenfalls an den Axonterminalen beobachtet werden (Abb. 10d). Desgleichen war Immunreaktivität gegen die c-Ret Untereinheit des GDNF Rezeptors in den Axonterminalen motorischer Endplatten adulter Motoneurone *in vivo* nachzuweisen (Abb. 10e). Die aktivierte p-Ret Untereinheit war ebenfalls an der Axonterminalen lokalisiert (Abb. 10f), dabei war die Intensität aber etwas geringer ausgeprägt als gegen TrkB und gp130.

Zusammenfassend lässt sich daher festhalten, dass TrkB, p-TrkB, gp 130 und p-Stat, sowie in geringerem Maße auch c-Ret und p-Ret an den Axonterminalen motorischer Endplatten adulter Motoneurone lokalisiert sind. Diese Befunde stehen im Einklang mit den Ergebnissen aus den *in vitro* Versuchen an embryonalen Motoneuronen, die diese Rezeptoren und Signaltransduktionsproteine auch an den Wachstumskegeln kultivierter embryonaler Motoneurone nachgewiesen hatten.

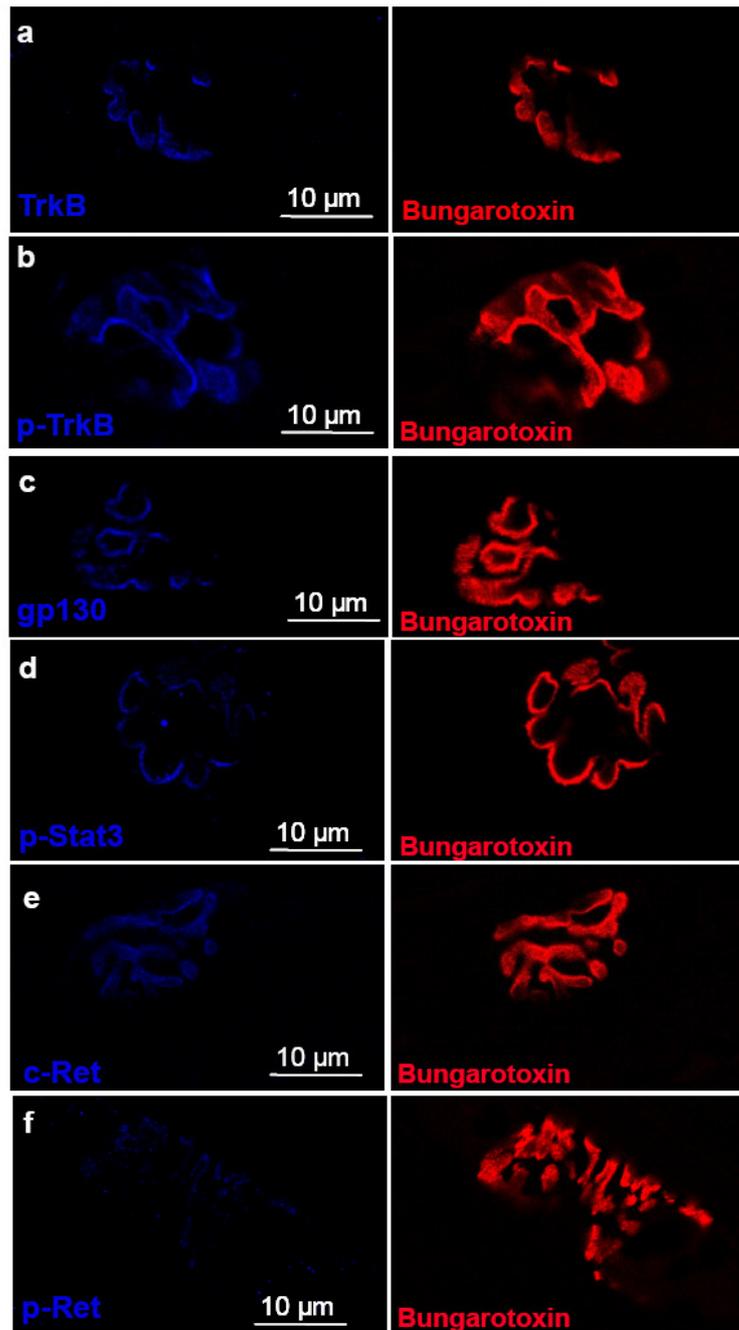


Abbildung 10: *In vivo* Lokalisation der Rezeptoren für neurotrophe Faktoren an den Axonterminalen motorischer Endplatten von adulten Mäusen

Starke Immunreaktivität gegen TrkB (blau, a) und auch p-TrkB (blau, b) ist an den motorischen Endplatten im präsynaptischen Bereich zu finden, da ihre Rezeptoren sich neben dem AChR-Marker Bungarotoxin (rot) darstellen lassen. Ebenso sind die CNTF Rezeptor Einheit gp 130 (c) und der Signalmediator p-Stat3 (d) an den motorischen Endplatten lokalisiert. Auch c-Ret (e) und p-Ret (f) können an den motorischen Endplatten adulter Motoneurone nachgewiesen werden, dabei ist die Immunreaktivität gegen p-Ret aber relativ gering ausgeprägt.

3.2.3 *In vivo* Lokalisation der Rezeptoren für neurotrophe Faktoren in peripheren Nerven

In vitro waren entlang des Axons embryonaler Motoneuronen deutliche Unterschiede in der subzellulären Lokalisation von Rezeptoren für neurotrophe Faktoren beobachtet worden. Daher war es von großem Interesse zu untersuchen, ob diese differentielle Verteilung der Rezeptoren auch *in vivo* zutrifft. Dazu wurde der N. phrenicus von adulten EGFP-Tau transgenen Mäusen entnommen und longitudinale 10 µm dicke Gefrierschnitte präpariert. Der N. phrenicus wurde als repräsentativer peripherer Nerv gewählt, da dieser Nerv zu über 85% aus motorischen Axonen besteht und nur sehr wenige Axonkollaterale besitzt. Gleichzeitig lässt er den direkten Vergleich mit den untersuchten Axonterminalen und motorischen Endplatten im Zwerchfell zu. Die entsprechenden Rezeptoren für neurotrophe Faktoren wurden mittels indirekter Immunfluoreszenz gegen TrkB, p-TrkB, gp130, p-Stat3, c-Ret und p-Ret dargestellt. Die umhüllenden Schwannzellen wurden mit Antikörpern gegen den Schwannzellmarker S100 identifiziert. Das Axon des N. phrenicus ließ sich durch das EGFP-Tau klar zu erkennen.

Der hochaffine Neurotrophinrezeptor TrkB ließ sich auf diese Weise sehr intensiv in der Membran des Axons darstellen. Etwas TrkB fand sich auch in den umhüllenden Schwannzellen, da es mit dem Schwannzellmarker, S100, kolokalisiert war. Zu einem geringeren Teil war TrkB auch im Axon selbst nachweisbar (Abb. 11a). Die hochauflösende konfokale Analyse des N. phrenicus (Abb. 12a) zeigte kleine vesikuläre Strukturen, die deutlich mit Tau kolokalisierten und wahrscheinlich den retrograden oder anterograden Transport des BDNF Rezeptors darstellen. Die Signalintensität für TrkB war dabei besonders in der Nähe der Ravierschen Schnürringe sehr intensiv (Pfeil, Abb. 12a)

Die aktivierte Untereinheit des BDNF Rezeptors, p-TrkB, war zum größten Teil innerhalb der Tau-positiven Axone lokalisiert. Nur ein geringerer Anteil befand

sich an der Axonmembran (Abb. 11+12b). Dieses Resultat deutet auf eine Rezeptorinternalisierung und retrograden Transport des Rezeptors nach der Bindung des Liganden hin. Auch für p-TrkB zeigte die konfokale Analyse mit hoher Vergrößerung eine deutliche Kollokalisierung mit Tau im Axon und eine Akkumulation von p-TrkB in der Nähe der Ranvierschen Schnürringe (Pfeil, Abb. 12b)

Die CNTF Rezeptoruntereinheit gp130 war im Längsschnitt des N. phrenicus vor allem in der Axonmembran (dünner Pfeil) und auch in der umhüllenden Schwanzzelle lokalisiert (Abb. 11e). Zusätzlich war Immunreaktivität für gp130 auch innerhalb des Axons selbst nachweisbar, da gp130 auch mit Tau kollokalisierte (Abb. 12c). Das aktivierte CNTF Signaltransduktionsprotein p-Stat3 wurde vor allem innerhalb des Axons und nur zum geringeren Anteil in der Axonmembran beobachtet. Weiterhin war p-Stat3 auch innerhalb der Schwanzzellen lokalisiert (Abb. 11d). Zusätzliche konfokale Analysen in hoher Vergrößerung zeigten viele Endosomen ähnliche Strukturen innerhalb des Axons, die hinweisend für einen retrograden Transport dieses Proteins sind (Pfeil, Abb. 12d).

Die signaltransduzierende Untereinheit des GDNF Rezeptors, c-Ret, war an der Oberfläche und auch innerhalb der Schwanzzellen nachweisbar, da sie deutlich mit S100 kollokalisierte. Im Tau-positiven Axon selbst dagegen wurde keine Immunreaktivität gegen c-Ret beobachtet (Abb. 11e). Auch weitere konfokale Analysen mit hoher Vergrößerung zeigten, dass c-Ret deutlich innerhalb der das Axon umhüllenden Schwanzzellen lokalisiert war, nicht aber im Axon selbst (Abb. 12e). Analog dazu war auch die Immunreaktivität gegen aktiviertes p-Ret in hohem Maß innerhalb der Schwanzzellen sichtbar (Kollokalisierung mit S100), jedoch konnte p-Ret im Axon selbst nicht nachgewiesen werden (Abb. 11f). Sogar die hochauflösende konfokale Mikroskopie zeigte eine sehr starke Anfärbung der Schwanzzellen für p-Ret, aber keine Anfärbung des Axons selbst (Abb. 12f). Diese Befunde stehen in Einklang mit den *in vitro*

Beobachtungen, die gezeigt hatten, dass weder c-Ret noch p-Ret auf den Axonen embryonaler Motoneurone lokalisiert ist.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass TrkB und gp130 sowie ihre aktivierten Formen p-TrkB und p-Stat3 innerhalb des Axons lokalisiert sind. Dabei weisen die aktivierten Formen p-TrkB und p-Stat3 eine stärkere Immunreaktivität innerhalb des Axons auf, als ihre nicht-phosphorylierten Formen TrkB und gp130, die ein überwiegend membranständiges Färbeverhalten aufweisen. Daraus lässt sich schließen, dass vornehmlich die aktivierten Rezeptoren neurotropher Faktoren internalisiert und retrograd in Richtung des Zellkerns transportiert werden. Im Gegensatz dazu ist weder c-Ret noch p-Ret als Marker des GDNF Rezeptors innerhalb des Axon nachweisbar. Obwohl c-Ret und p-Ret eine starke Immunreaktivität in den umhüllenden Schwannzellen aufweisen, ist keine Immunreaktivität für diesen Rezeptor innerhalb des Tau-positiven Axons zu erkennen. Diese Beobachtungen stehen in Einklang mit den Ergebnissen aus *in vitro* Versuchen, die zeigen, dass sowohl BDNF- als auch CNTF Rezeptoren entlang und innerhalb des Axons lokalisiert sind, nicht aber GDNF Rezeptoren.

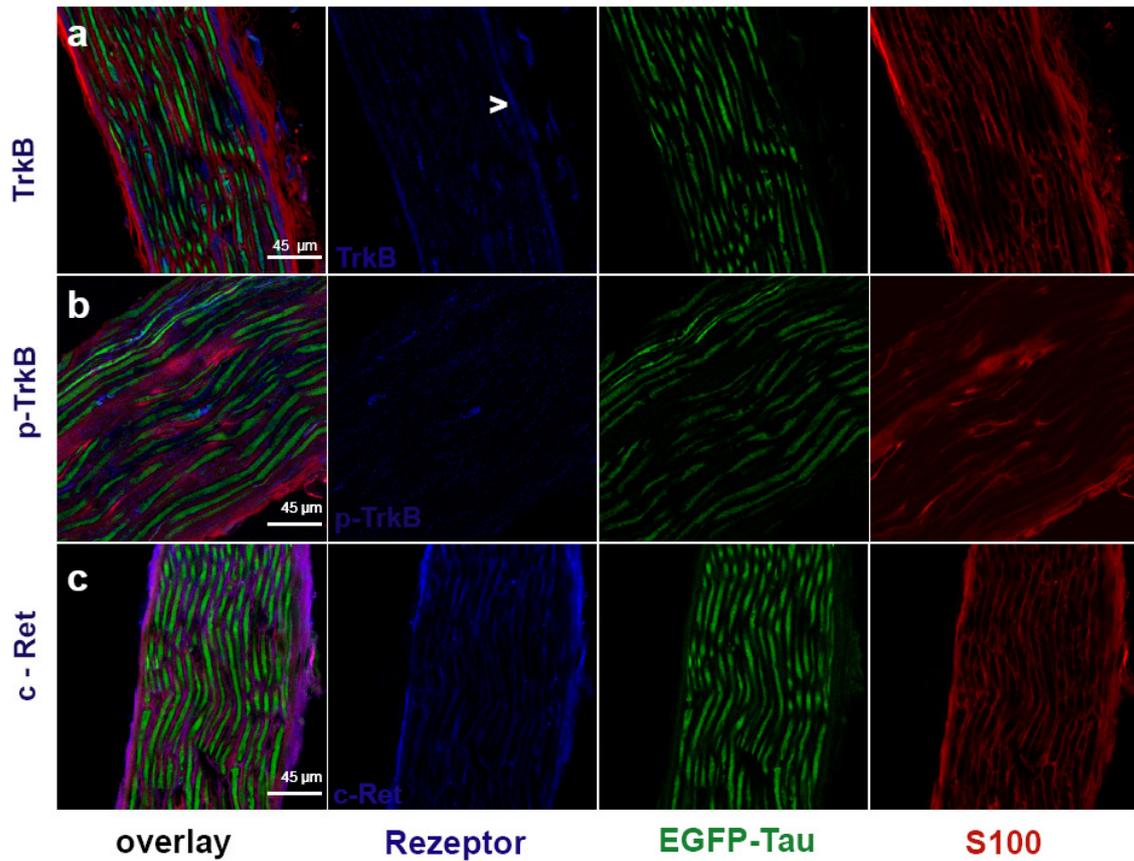


Abbildung 11a-c: Subzelluläre Verteilung von TrkB, p-TrkB und c-Ret im N.phrenicus

Die BDNF Rezeptoruntereinheit TrkB (a) ist im Axonlängsschnitt des N. phrenicus vor allem an der Oberfläche des Axons lokalisiert (Pfeil). Der aktivierte BDNF Rezeptor, p- TrkB, ist im Axonlängsschnitt dagegen vor allem im Inneren des Axon lokalisiert (b). Demgegenüber lässt sich die GDNF Rezeptoreinheit c-Ret (c) in hoher Intensität in den umhüllenden Schwannzellen (S100, rot) nachweisen, jedoch zeigt c-Ret keine Kolo-kalisation mit dem Axon selbst (EGFP-Tau, grün).

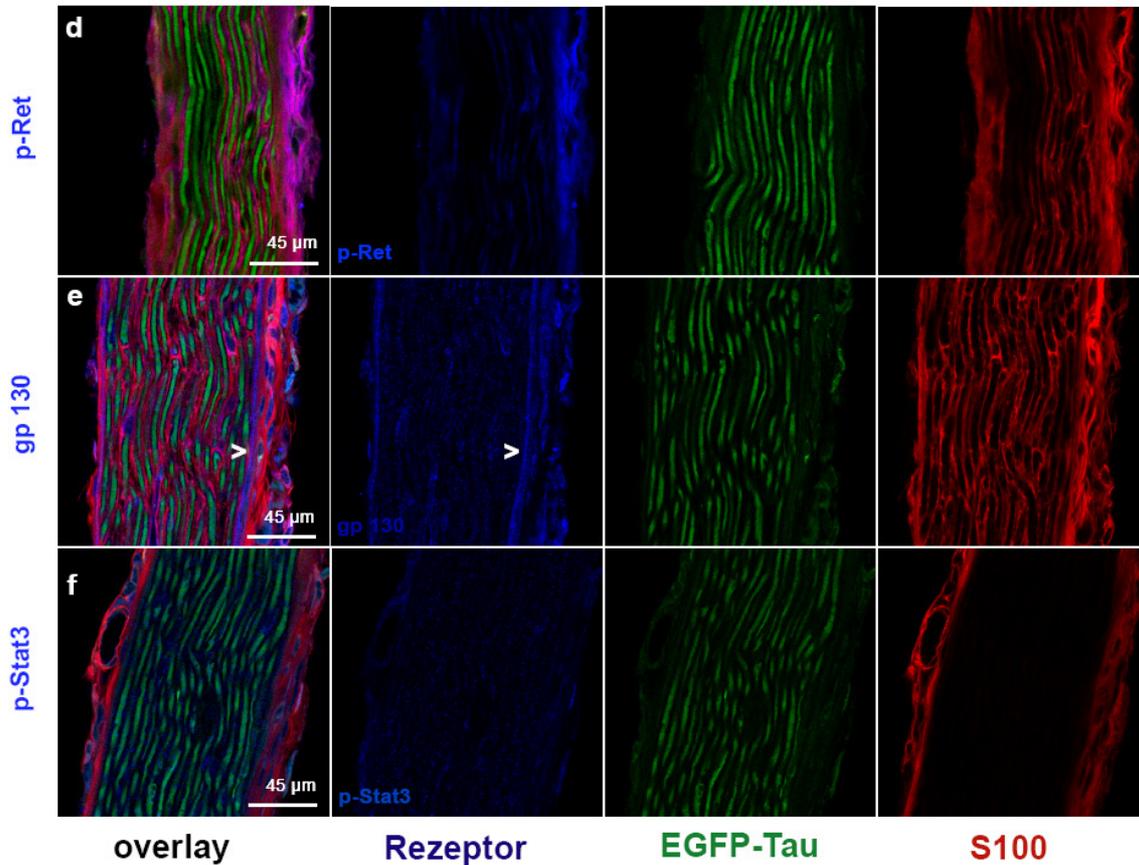


Abbildung 11d-f: Subzelluläre Verteilung von gp130, p-Stat3 und p-Ret im N.phrenicus

Die GDNF Rezeptoreinheit p-Ret (d) lässt sich, wie auch c-Ret (c), zwar in den das Axon umhüllenden Schwanzzellen (S100, rot) nachweisen, zeigt jedoch keine Kolo-kalisation mit Tau im Axon selbst (EGFP-Tau, grün). Die CNTF Rezeptoruntereinheiten gp130 (e) ist dagegen in starker Intensität an der Oberfläche des Axon lokalisiert (Pfeil), aber auch punktuell im Inneren des Axon. Der aktivierte Signalmediator p-Stat3 (f) ist im Axonlängsschnitt des N. phrenicus vor allem im Inneren des gesamten Axon nachweisbar und weniger an der Oberfläche des N. phrenicus.

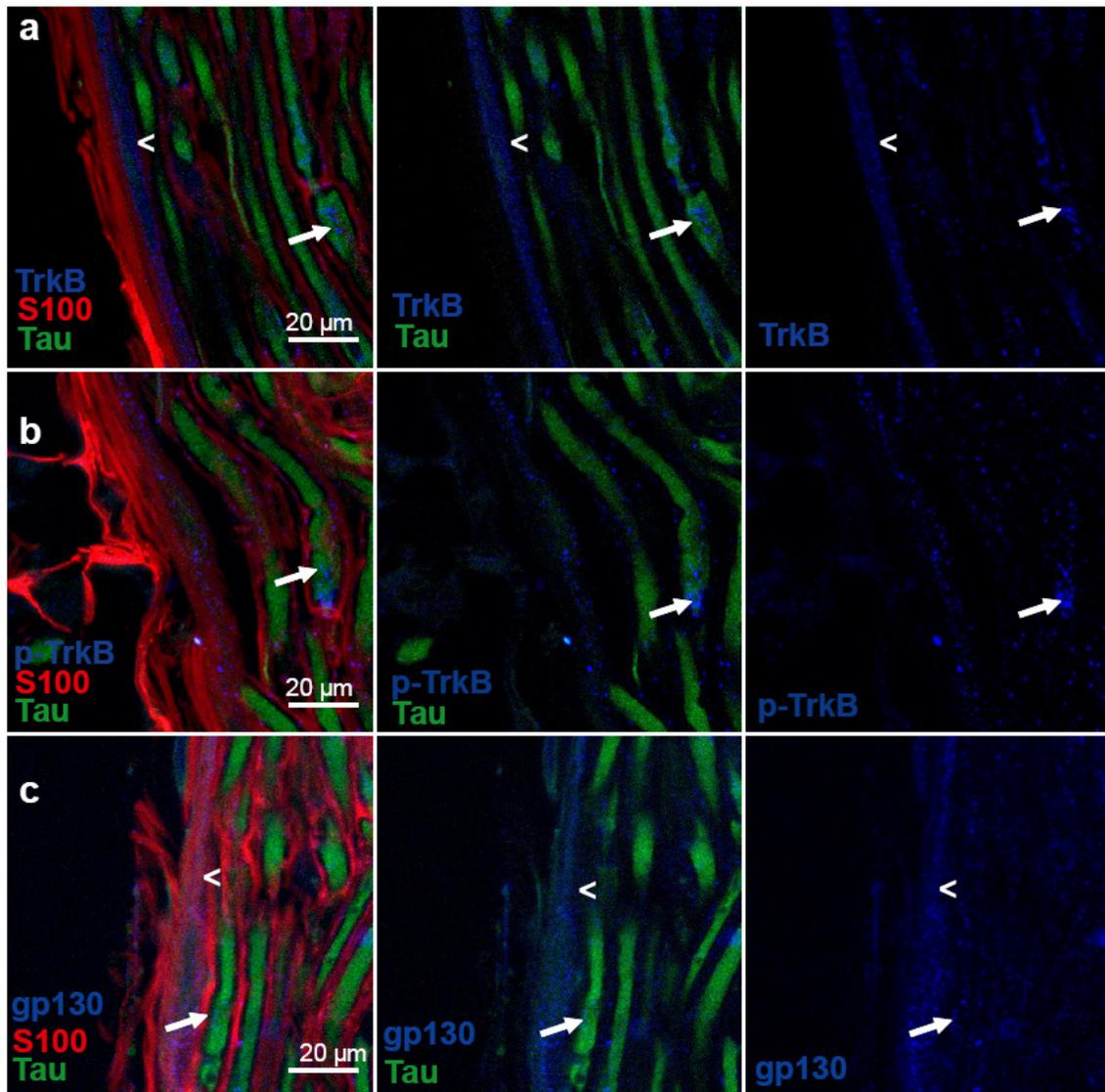


Abbildung 12 a-c: Hochauflösende konfokale Analyse der subzellulären Verteilung von TrkB, p-TrkB und gp130 im N. phrenicus

Der hochaffine BDNF Rezeptor ist im N. phrenicus vor allem an der Oberfläche des Axon lokalisiert (>,a), zeigt aber auch eine klare Kolokalisation mit Tau im Axon. Der aktivierte Rezeptor, p-TrkB, befindet sich hauptsächlich innerhalb des Axons der Motoneurone, da p-TrkB eine klare Kolokalisation mit dem EGFP-Tau des Axons (grün) aufweist (b). Besonders starke p-TrkB Immunreaktivität läßt sich an den Ranvierschnürringen (dicker Pfeil,b) nachweisen. Die CNTF Rezeptor Einheit gp130 ist in der hochauflösenden konfokalen Analyse sowohl an der Oberfläche des Axon (<, c) als auch im Tau-positiven Axon nachweisbar (dicker Pfeil, c). Relativ schwächere Immunreaktivität für TrkB, p-TrkB und gp130 befindet sich auch in den S100 positiven Schwanzzellen (a,b,c).

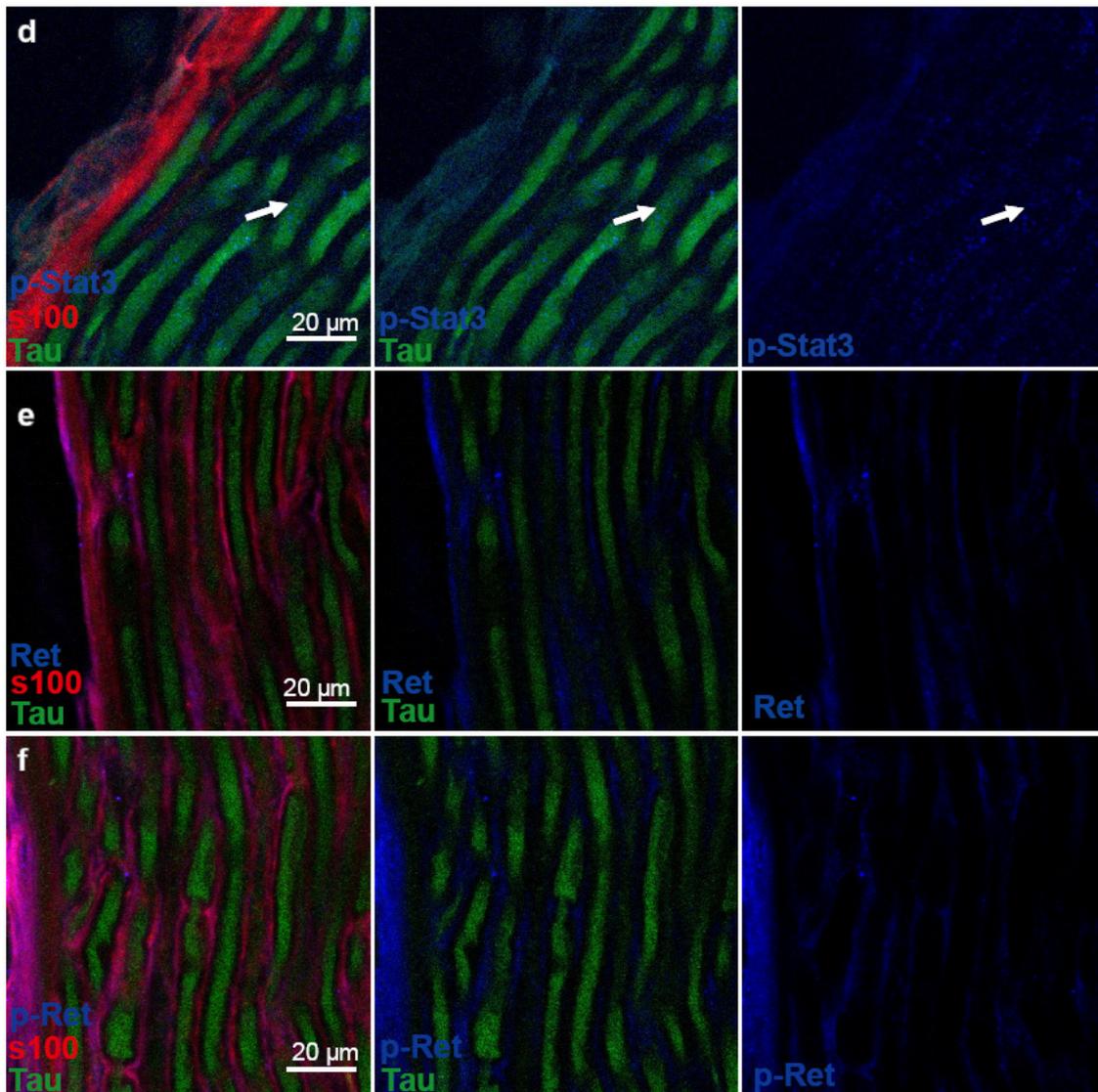


Abbildung 12d-f: Hochauflösende konfokale Analyse der Rezeptorlokalisierung von p-Stat3, c-Ret und p-Ret im N.phrenicus

P-Stat3 (d) zeigt eine deutliche Lokalisation im Axon (grün) des N. phrenicus. Der Pfeil deutet auf die Kolo-kalisation innerhalb des Axon. C-Ret (e) und p-Ret (f) dagegen sind zwar klar innerhalb der umhüllenden Schwanzzelle (rot) zu erkennen, nicht aber innerhalb des Axons der Motoneurone selbst.

3.3 Differentielle Effekte von BDNF, CNTF und GDNF auf das Neuritenwachstum embryonaler Motoneurone

Die Analyse der subzellulären Lokalisation des BDNF-, CNTF- und GDNF-Rezeptors hatte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* deutliche Unterschiede in der Verteilung in Axonen und Dendriten aufgewiesen. Aus diesem Grunde wurde im Folgenden untersucht, ob die Lokalisation der Rezeptoren für neurotrophe Faktoren in verschiedenen subzellulären Kompartimenten der Zelle, mit unterschiedlichen Wirkungen auf das Axon- und Dendritenwachstum einhergeht.

3.3.1 GDNF stimuliert das Dendritenwachstum bei isolierten Motoneuronen stärker als BDNF und CNTF

Als erstes wurden die Effekte von BDNF, CNTF und GDNF auf das Dendritenwachstum analysiert. In sechs unabhängigen Experimenten wurden primäre lumbale Motoneurone der Naval Medical Research Institute Mauslinie (NMRI) an Embryonaltag (E)13,5 isoliert und in Gegenwart von 1 ng/ml BDNF, CNTF oder GDNF kultiviert. Nach sieben Tagen in Kultur wurden die Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen p-Tau und Map-2 gefärbt. Alle Map-2 positiven und p-Tau negativen Fortsätze der Motoneurone wurden den Dendriten zugeordnet und blind vermessen. Für jedes Motoneuron wurde die Länge der einzelnen Dendriten bestimmt und dann die Gesamtlänge des Dendritenbaums durch Addition der einzelnen Dendritenlängen berechnet.

Die Gesamtlänge der Dendriten betrug $49,8 \pm 4,0 \mu\text{m}$ ($n=101$) für Motoneurone, die mit BDNF kultiviert worden waren. Mit CNTF behandelte Motoneuronkulturen wiesen eine Gesamtdendritenlänge von $44,6 \pm 3,9 \mu\text{m}$ auf ($n=100$). Im Gegensatz dazu wurde der Dendritenbaum, der mit GDNF kultivierten Motoneurone, mehr als doppelt so lang, nämlich $118,9 \pm 8,2 \mu\text{m}$ ($n=100$). Daher war GDNF signifikant stärker in der Lage das Dendritenwachstum bei isolierten primären Motoneuronen zu stimulieren, als

dies BDNF oder CNTF konnten ($p < 0,0001$, one way ANOVA)(Abb. 13A+B). Diese Beobachtung scheint mit der starken Immunreaktivität von Ret und p-Ret in den Dendriten der Motoneurone zu korrelieren.

3.3.2 BDNF, CNTF und GDNF unterscheiden sich nicht in ihrer Wirkung auf das Axonwachstum bei isolierten Motoneuronen

Analog zur Wirkung der verschiedenen neurotrophen Faktoren auf das Dendritenwachstum, wurde der Effekt von BDNF, CNTF und GDNF auf das Axonwachstum von Motoneuronen untersucht. Embryonale Motoneurone von NMRI Mäusen wurden an (E)13,5 isoliert und in Gegenwart von 1 ng/ml BDNF, CNTF oder GDNF kultiviert. Nach sieben Tagen in Zellkultur wurden die Motoneurone fixiert und mit Antikörpern gegen Map-2 und p-Tau gefärbt. Alle p-Tau positiven Fortsätze wurden dem Axon zugeordnet und blind vermessen. Dabei wurde sowohl die Länge des längsten axonalen Fortsatzes als auch die Länge aller axonalen Fortsätze inklusive der Kollateralen bestimmt.

Die Zugabe von verschiedenen neurotrophen Faktoren änderte die Axonlänge der Motoneurone nicht signifikant. Wenn Motoneurone in Gegenwart von BDNF kultiviert wurden, betrug der längste axonale Fortsatz $678,0 \pm 24,1 \mu\text{m}$ ($n=94$), (Abb. 13A). Mit CNTF kultivierte embryonale Motoneurone hatten einen axonalen Fortsatz von $643,7 \pm 27,9 \mu\text{m}$ ($n=91$). Bei Motoneuronen, die sieben Tage lang mit GDNF kultiviert worden waren, wurde das Axon $643,0 \pm 24,0 \mu\text{m}$ ($n=95$) lang (Abb. 13A). Daher scheinen alle drei neurotrophen Faktoren in ihrer Fähigkeit, das Axonwachstum bei Motoneuronen zu stimulieren, gleich potent zu sein ($p > 0,05$, one way ANOVA).

In einem zweiten Versuch wurde die Gesamtlänge der axonalen Fortsätze inklusive der Kollateralen untersucht. Die Gesamtlänge der axonalen Fortsätze betrug bei Motoneuronen, die mit BDNF kultiviert worden waren $872 \pm 36,6 \mu\text{m}$ ($n=94$). CNTF kultivierte Motoneurone wiesen eine Axongesamtlänge von $847 \pm 44,3 \mu\text{m}$ ($n=91$). Motoneurone, die in Gegenwart von GDNF kultiviert

worden waren, zeigten Axone mit einer Gesamtlänge von $845 \pm 43,3 \mu\text{m}$ ($n=95$). Daher konnte statistisch kein signifikanter Unterschied im Axonwachstum zwischen den Motoneuronen, die mit BDNF, CNTF oder GDNF kultiviert wurden, festgestellt werden ($p > 0,05$, one way ANOVA)(Abb. 13A+C).

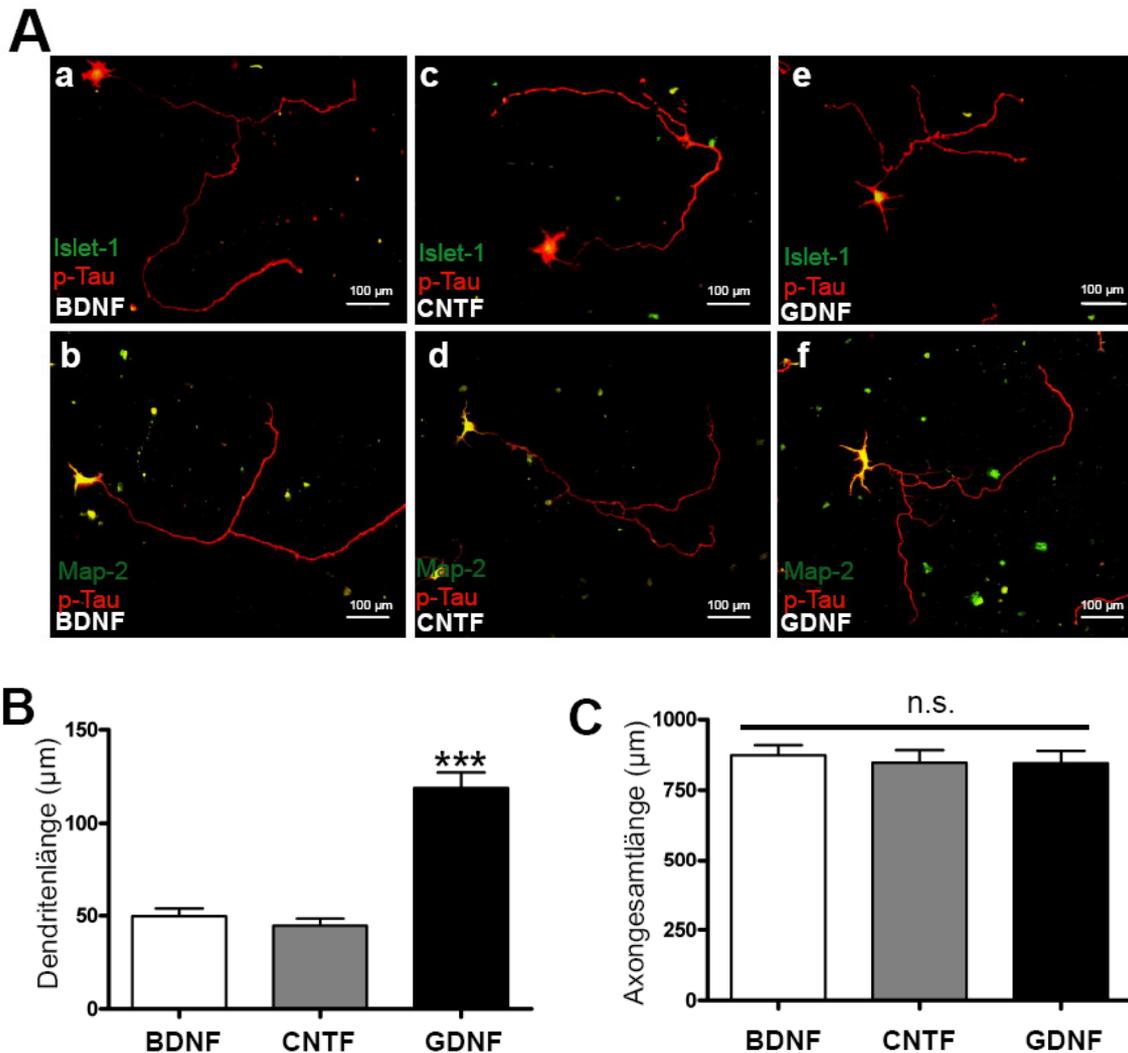


Abbildung 13: Differentielle Wirkungen neurotropher Faktoren auf das Neuritenwachstum von embryonalen Motoneuronen

Die Zugabe von GDNF (A e,f) zu isolierten Motoneuronen bewirkt *in vitro* ein mehr als doppelt so starkes Dendritenwachstum wie die Zugabe von BDNF(A a,b) oder CNTF(A c,d) ($p < 0,0001$, B). Im Gegensatz dazu unterscheiden sich BDNF, CNTF und GDNF hinsichtlich ihrer Fähigkeit das Axonwachstum von isolierten Motoneuronen zu stimulieren nicht signifikant ($p > 0,05$, C).

3.4 Effekt des glutamatergen AMPA Rezeptors auf das Neuritenwachstum embryonaler Motoneurone

GDNF hatte einen doppelt so starken Effekt auf das Dendritenwachstum gezeigt wie BDNF und CNTF. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, ob es neben der unterschiedlichen subzellulären Verteilung der Rezeptoren für neurotrophe Faktoren Unterschied noch weitere modulierende Faktoren gibt, die das Dendritenwachstum von embryonalen Motoneuronen beeinflussen.

Der AMPA Rezeptor ist ein Liganden-gesteuerter, ionotroper Kationenkanal. Nach Bindung des Liganden Glutamat bewirkt er einen Natriumeinstrom und einen Kaliumausstrom. Je nach Zusammensetzung seiner vier Untereinheiten besitzt der AMPA Kanal zusätzlich auch eine Permeabilität für Kalziumionen. Rezeptoren, die eine GluR2-Untereinheit besitzen, weisen eine wesentlich geringere Permeabilität für Kalzium, auf als Rezeptoren, die diese Untereinheit nicht exprimieren (Hollmann et al., 1991). Der Kalziumeinstrom ist besonders bei Motoneuronen von großem wissenschaftlichen Interesse, weil er in Verbindung mit der glutamatergen Exzitoxizität gebracht wird, die unter anderem auch für degenerative Motoneuronenerkrankungen wie ALS, eine pathogenetisch entscheidende Rolle spielt (Van Den et al., 2006). Motoneurone besitzen eine Vielzahl von AMPA Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, ein hoher Anteil davon ist für Kalzium permeabel (Carriedo et al., 1996; Van Den et al., 2000). In einigen Studien wurden Interaktionen zwischen dem glutamatergen AMPA-Rezeptor und neurotrophen Faktoren beschrieben. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass neurotrophe Faktoren einen Einfluss auf die Expression dieser GluR2-Untereinheit des AMPA-Rezeptors haben und damit auch auf die Kalziumpermeabilität (Brene et al., 2000). Weitere Studien hatten auch das Dendritenwachstum in Verbindung mit dem AMPA Rezeptor gebracht (Metzger et al., 1998). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun untersucht, ob der AMPA-Rezeptor auch einen Einfluss auf das Neuritenwachstum von embryonalen Motoneuronen besitzt. Dafür wurde das Axon- und Dendritenwachstum von primären Motoneurone in Anwesenheit

eines AMPA-Rezeptor Antagonisten bzw. Agonisten und verschiedenen neurotrophen Faktoren quantifiziert.

3.4.1 AMPA verstärkt das CNTF induzierte Dendritenwachstum bei primären Motoneuronen

Zunächst wurde der Effekt der AMPA Rezeptoraktivierung auf das Dendritenwachstum untersucht. Dazu wurden Motoneurone von C57BL/6 Mäusen an (E)13,5 isoliert und in Gegenwart des Rezeptoragonisten S-AMPA (555nM, entsprechend $2K_D$) und 1 ng/ml neurotrophen Faktor (BDNF, CNTF bzw. GDNF) kultiviert. Da AMPA in DMSO gelöst worden war, wurde der Kontrollkultur neben dem entsprechenden neurotrophen Faktor auch DMSO in derselben Verdünnung (1:1000) beigesetzt. Nach sieben Tagen in Zellkultur wurden die Motoneurone fixiert und mit Antikörpern gegen Map-2 und p-Tau gefärbt. Alle Map-2 positiven/p-Tau negativen Fortsätze wurden den Dendriten zugeordnet und blind vermessen. Für jedes Motoneuron wurde die Länge der einzelnen Dendriten bestimmt und dann die Gesamtlänge des Dendritenbaums durch Addition der einzelnen Dendritenlängen berechnet.

Die Kontrollmotoneurone, die lediglich mit neurotrophen Faktor und DMSO behandelt wurden, wiesen folgende Dendritenlängen auf: $51,5 \pm 4,7 \mu\text{m}$ für BDNF (n=32), $61,9 \pm 5,5 \mu\text{m}$ (n=32) für CNTF und $101,1 \pm 5,3 \mu\text{m}$ (n=32) für GDNF behandelte Motoneurone (Abb. 14A, Abb. 15A₁-C₁). Daher scheint die Zugabe des Lösungsmittels DMSO in dieser geringen Konzentration das Neuritenwachstum nicht signifikant zu beeinträchtigen. Auch in diesem Versuch waren die GDNF behandelten Dendriten etwa doppelt so lang wie die Dendriten der Motoneurone, die mit BDNF oder CNTF kultiviert worden waren.

Wenn Motoneurone sieben Tage lang durch den AMPA Agonisten stimuliert worden waren, zeigten die mit BDNF und AMPA kultivierten Motoneurone eine Dendritenlänge von $50,2 \pm 5,5 \mu\text{m}$ (n=36). Mit CNTF und AMPA behandelte

Motoneurone wiesen nach 7 Tagen in Kultur eine Dendritenlänge von $33,1 \pm 4,3 \mu\text{m}$ ($n=44$) auf. Mit GDNF und AMPA behandelte Motoneurone dagegen zeigten Dendriten mit einer Gesamtlänge von $98,3 \pm 12,6 \mu\text{m}$ ($n=42$). Somit zeigte sich, dass das Dendritenwachstum der mit BDNF oder GDNF behandelten Kulturen durch die Aktivierung des AMPA Rezeptors im Vergleich zu den Kontrollkulturen nicht signifikant beeinflusst wurde ($p>0,05$, student's *t*-test, Abb. 14A, 15A₁+C₁). Die Dendriten der mit CNTF behandelten Motoneurone dagegen wurden durch die Zugabe von AMPA signifikant kürzer als die Kontrollkulturen ($p<0,001$, student's *t*-test, Abb. 15B₁).

3.4.2 Der AMPA-Rezeptorantagonist NBQX vermindert das GDNF stimulierte Dendritenwachstum bei primären Motoneuronen

Der AMPA-Rezeptoragonist hatte differentielle Wirkungen auf das Dendritenwachstum von embryonalen Motoneuronen in Abhängigkeit davon gezeigt, welcher neurotrophe Faktor den Motoneuronen zugesetzt worden war. Aus diesem Grunde wurde in einer zweiten Reihe von Experimenten untersucht, ob auch die Inhibition des AMPA Rezeptors das Dendritenwachstum differentiell beeinflusst. Um selektiv den AMPA Rezeptor, nicht aber den verwandten NMDA Rezeptor zu blockieren, wurde NBQX als ein kompetitiver, selektiver AMPA-Rezeptor-Antagonist ausgewählt (Dev et al., 1996). Embryonale Motoneurone von C57BL/6 Motoneuronen wurden dazu in analoger Weise an (E)13,5 isoliert und in Gegenwart des AMPA-Rezeptorantagonisten NBQX (95 nM, entsprechend $2K_D$) und 1 ng/ml BDNF, CNTF oder GDNF kultiviert. Da der AMPA-Inhibitor NBQX in DMSO gelöst worden war, wurde der Kontrollkultur neben dem entsprechenden neurotrophen Faktor DMSO in derselben Verdünnung (1:1000) zugegeben. Die Zugabe von DMSO in dieser geringen Konzentration hatte sich in den Kontrollkulturen bereits als nicht toxisch erwiesen. Nach sieben Tagen in Zellkultur wurden die Motoneurone fixiert und mit Antikörpern gegen Map-2 und p-Tau gefärbt.

Wurden die AMPA Rezeptoren der Motoneurone selektiv mit NBQX inhibiert, erreichten die Dendriten der Motoneurone, die mit BDNF und NBQX kultiviert wurden, eine Dendritenlänge von $66,2 \pm 5,5 \mu\text{m}$ (n=34). Bei Motoneuronen, die mit CNTF und NBQX kultiviert worden waren, betrug die Länge der Dendriten $85,8 \pm 7,2 \mu\text{m}$ (n=33). Dagegen verminderte die Inhibition des AMPA Rezeptors das Dendritenwachstum der mit GDNF behandelten Motoneurone drastisch, nämlich auf eine Länge von $24,3 \pm 3,7 \mu\text{m}$ (n=29).

Folglich werden die Dendriten der mit BDNF oder CNTF behandelten Motoneurone durch die Zugabe von NBQX etwas länger als die Dendriten der Kontrollmotoneurone ($p=0,047$ für BDNF und $p=0,01$ für CNTF, student's *t*-test, Abb. 14C+ 15A₁, B₁). Demgegenüber werden die Dendriten der mit GDNF kultivierten Motoneurone durch die Zugabe von NBQX signifikant kürzer als die Dendriten der Kontrollkulturen ($p<0,0001$, student's *t*-test) (Abb. 14C+ 15C₁).

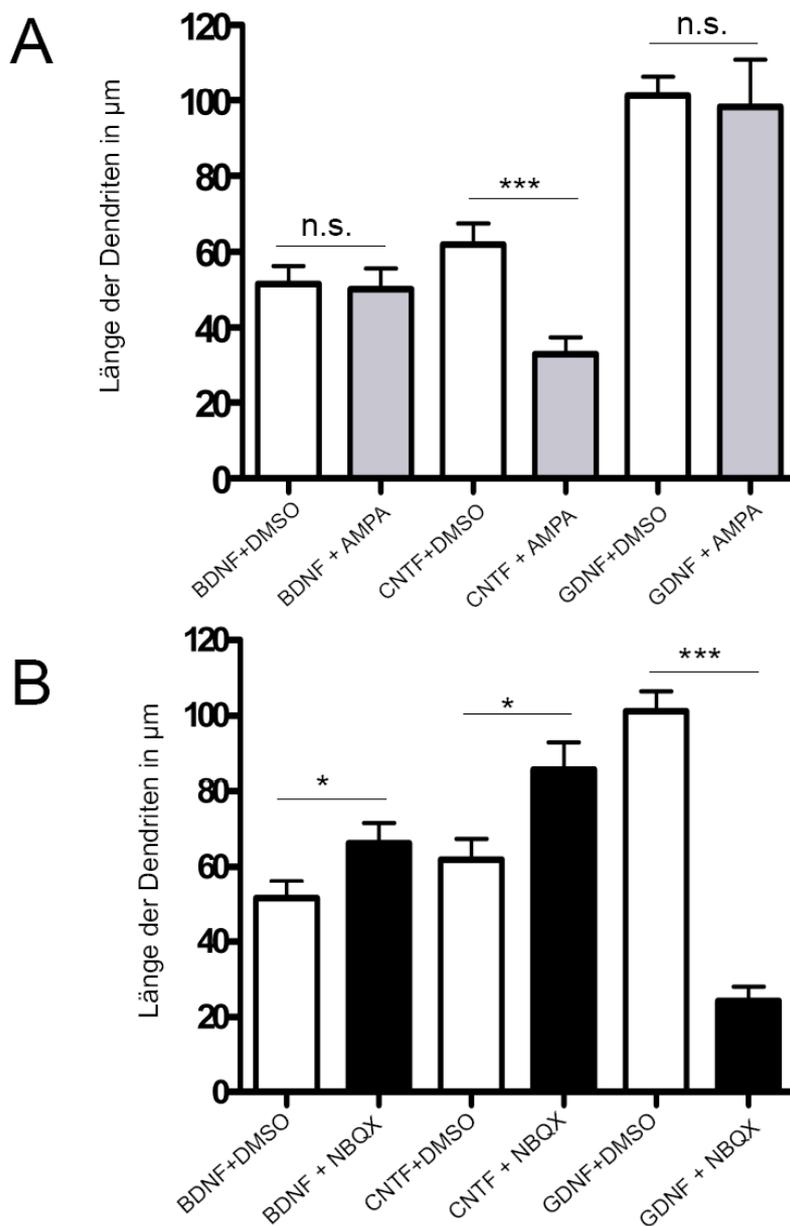


Abbildung 14: Auswirkungen des AMPA Rezeptors auf das Dendritenwachstum primärer Motoneurone

(A) Der Rezeptoragonist AMPA führt bei CNTF behandelten Motoneuronen zu einer signifikanten Reduktion des Dendritenwachstums ($p < 0,001$). Dagegen bewirkt die Aktivierung des AMPA-Rezeptors bei BDNF oder GDNF Kulturen keine signifikante Veränderung des Dendritenwachstums ($p > 0,05$).

(B) Der AMPA Rezeptorantagonist NBQX stimuliert das Dendritenwachstum der mit BDNF oder CNTF kultivierten Motoneurone ($p < 0,05$). Dagegen führt die Zugabe von NBQX bei den mit GDNF behandelten Motoneuronen zu einer hochsignifikanten Reduktion des Dendritenwachstums ($p < 0,0001$).

3.4.3 Der AMPA-Rezeptoragonist AMPA hat keinen Einfluss auf das Axonwachstum von primären Motoneuronen

Die AMPA-Rezeptoraktivierung und Inhibierung hatte differentielle Wirkungen auf das Dendritenwachstum von Motoneuronen in Abhängigkeit davon gezeigt, welcher neurotrophe Faktor der Primärkultur zugesetzt worden war. In einer weiteren Versuchsreihe wurde daher analysiert, welche Wirkungen der AMPA Rezeptor auf das Axonwachstum von isolierten Motoneuronen hat. Dazu wurden in analoger Weise embryonale Motoneurone von C57BL/6 Motoneuronen an (E)13,5 isoliert und in Gegenwart des Rezeptoragonisten AMPA (555nM, entsprechend $2K_D$) und 1 ng/ml neurotrophen Faktor (BDNF, CNTF bzw. GDNF) kultiviert. Da AMPA in DMSO gelöst worden war, wurde der Kontrollkultur neben dem entsprechenden neurotrophen Faktor auch DMSO in derselben Verdünnung (1:1000) zugefügt. Nach sieben Tagen in Zellkultur wurden die Motoneurone fixiert und mit Antikörpern gegen Map-2 und p-Tau gefärbt. Alle Map-2 negativen/p-Tau positiven Fortsätze wurden dem Axon zugeordnet und blind vermessen. Für jedes Motoneuron wurde die Länge des Axon bestimmt und dann die Gesamtlänge durch Addition des Hauptaxons und der einzelnen Kollateralenlängen berechnet.

Wurden die AMPA-Rezeptoren der Motoneurone durch die Zugabe von AMPA stimuliert, so betrug die Axongesamtlänge der mit BDNF behandelten Motoneurone $354,5 \pm 15,2 \mu\text{m}$ (n=65). Bei Motoneuronen, die sieben Tage lang mit CNTF und AMPA kultiviert worden waren, war das Axon $331,7 \pm 14,9 \mu\text{m}$ lang (n=68). Axone in GDNF und AMPA behandelten Kulturen wurden $354,6 \pm 15,3 \mu\text{m}$ lang (n=76). Im Vergleich dazu wiesen die lediglich mit neurotrophem Faktor und DMSO behandelten Kontrollkulturen folgende Axonlängen auf: $353,4 \pm 14,9 \mu\text{m}$ (n=59) bei BDNF Kulturen, $354,0 \pm 10,2$ (n=77) bei CNTF Kulturen und $361,6 \pm 16,6$ (n=56) bei GDNF Kulturen. Daher ist in den Kontrollkulturen in dieser geringen DMSO-Konzentration keine toxische Wirkung auf das Axonwachstum der Motoneurone zu beobachten.

Sowohl die Axonlängen der Kontrollmotoneurone untereinander, als auch die Axonlängen der mit AMPA behandelten Motoneurone untereinander, zeigten keine signifikanten Unterschiede (beide $p > 0,05$, one way ANOVA). Auch waren die Axonlängen der Kontrollmotoneurone und die Axonlängen der AMPA behandelten Motoneurone nicht signifikant unterschiedlich ($p > 0,05$, Abb. 15A₂, B₂, C₂). Die Aktivierung des AMPA Rezeptors scheint somit keinen Einfluss auf das Axonwachstum von primären Motoneuronen zu besitzen.

3.4.4 Der AMPA-Rezeptorantagonist NBQX hat keinen Einfluss auf das Axonwachstum von primären Motoneuronen

Der AMPA - Rezeptorantagonist NBQX hatte differentielle Wirkungen auf das Dendritenwachstum von Motoneuronen in Abhängigkeit davon gezeigt, mit welchem neurotrophen Faktor die Motoneurone behandelt worden waren. In einem weiteren Versuch wurde nun untersucht, ob durch NBQX Zugabe auch Unterschiede im Axonwachstum festgestellt werden können. Dazu wurden in analoger Weise Motoneurone von C57BL/6 Motoneuronen an (E)13,5 isoliert und in Gegenwart des Rezeptorantagonisten NBQX (95nM, entsprechend $2K_D$) und 1 ng/ml neurotrophen Faktor kultiviert. Wurden die AMPA-Rezeptoren durch Zugabe von NBQX selektiv inhibiert, so betrug die Axonlänge der mit BDNF behandelten Motoneurone $365,9 \pm 12,9 \mu\text{m}$ ($n=66$). Bei Motoneuronen, die für sieben Tage mit CNTF und NBQX kultiviert worden waren, war das Axon $348,9 \pm 11,7 \mu\text{m}$ lang ($n=68$). Axone, in GDNF und NBQX behandelten Kulturen, waren $367,5 \pm 13,6 \mu\text{m}$ lang ($n=79$). Folglich bewirkte die selektive AMPA-Rezeptorblockade durch NBQX keinen signifikanten Unterschied in der Axonlänge von BDNF, CNTF oder GDNF behandelten Motoneuronen ($p > 0,05$, one way ANOVA). Auch im Vergleich zu den Kontrollkulturen zeigten die Axonlängen der mit NBQX behandelten Motoneurone keinen signifikanten Unterschied ($p > 0,05$; Abb. 11A₂-C₂). Daher scheint weder die Aktivierung noch die Inhibierung des AMPA-Rezeptors auf Motoneuronen einen signifikanten Einfluss auf das Axonwachstum von primären Motoneuronen zu besitzen ($p > 0,05$, one way ANOVA).

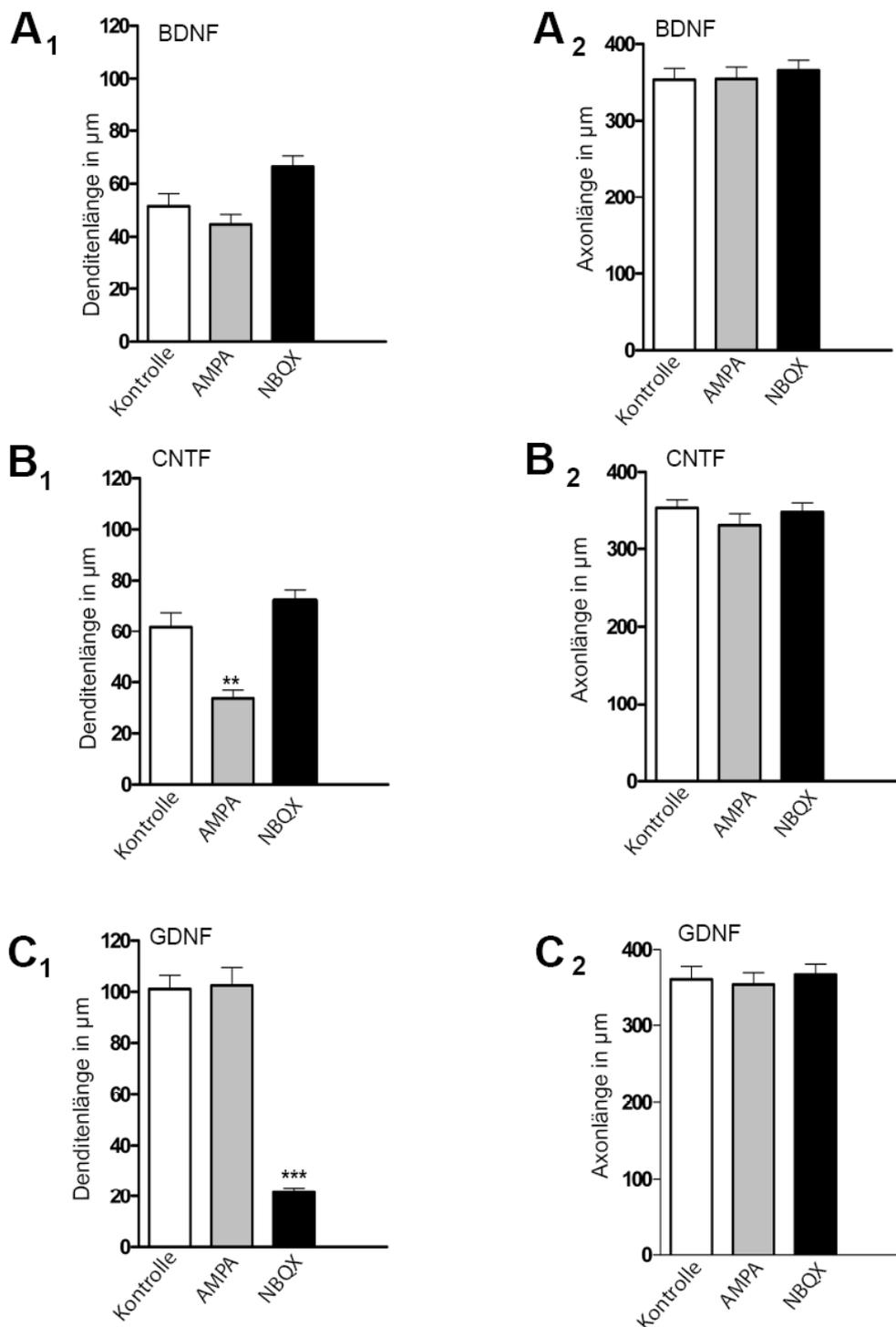


Abbildung 15: Differentielle Wirkungen des AMPA Rezeptors auf das Neuritenwachstum von isolierten Motoneuronen

Der Rezeptoragonist AMPA verkürzt das durch CNTF stimulierte Dendritenwachstum (B₁, $p < 0,001$), dagegen reduziert der Rezeptorantagonist NBQX das durch GDNF stimulierte Dendritenwachstum drastisch (C₁, $p < 0,0001$). Im Gegensatz dazu wird das Axonwachstum weder durch den AMPA Agonisten noch durch AMPA Antagonisten beeinflusst (A₁-C₂, $p > 0,05$).

3.5 Differentielle Effekte von BDNF, CNTF und GDNF auf den axonalen Wachstumsdefekt bei *pnn* Motoneuronen

Die *pnn* (progressive Motoneuronopathie) Maus ist ein Mausmodell für die ALS und andere degenerative Motoneuronenerkrankungen des Menschen. Sie entstand 1991 durch eine Spontanmutation in einem NMRI Mauseauszuchtstamm am Panum Institut in Dänemark. (Schmalbruch et al., 1991). Die zugrunde liegende genetische Veränderung ist eine Punktmutation im Gen des Tubulin spezifischen Chaperone E (*Tbce*) (Bommel et al., 2002; Martin et al., 2002). Das *Tbce* Protein ist wichtig für die Dimerisierung der Tubulinuntereinheiten und daher von essentieller Bedeutung für den korrekten Aufbau der Mikrotubuli (Tian et al., 1996). Durch diesen Defekt der Mikrotubuli fallen im Krankheitsverlauf zuerst Störungen des retrograden Transports auf. Erst im späteren Verlauf der Erkrankung ist ein Verlust von Motoneuronen durch Apoptose erkennbar. Die Erkrankung wird auch als "dying back" Neuronopathie bezeichnet, da der Funktionsverlust der Motoneurone und die Degeneration der Axone, dem Absterben der Motoneuronenzellkörper vorausgeht. Das Überleben isolierter *pnn* Motoneurone ist im Vergleich zu Kontrollmotoneuronen *in vitro* unverändert. Histologisch weist die Morphologie der *pnn* Motoneurone jedoch charakteristische pathologische Merkmale auf. Die Axone der *pnn* Motoneurone sind etwa 50% kürzer als Wildtyp Motoneurone und enthalten außerdem deutliche Schwellungen. Immunhistochemische Untersuchungen dieser axonalen Schwellungen zeigen ein irreguläres Färbemuster für β -Tubulin and p-Tau (Bommel et al., 2002), so wie sie auch bei der ALS beim Menschen zu beobachten sind. In wildtypischen Motoneuronen kommen diese axonalen Schwellungen dagegen so gut wie nicht vor. *In vivo* Studien konnten bereits zeigen, dass eine Behandlung mit CNTF, aber nicht mit GDNF den Beginn der Erkrankung verzögert und das Überleben der *pnn* Mäuse signifikant verlängert (Sendtner et al., 1992b; Sagot et al., 1996b). Daher wurden im Rahmen dieser Arbeit BDNF, CNTF und GDNF im Hinblick auf deren Effekte auf die axonale Pathologie bei isolierten *pnn* Motoneuronen verglichen.

3.5.1 CNTF kompensiert den axonalen Wachstumsdefekt von *pmn* Motoneuronen

In sechs unabhängigen Experimenten wurden Motoneurone isolierter Embryonen von heterozygoten *pmn* Verkreuzungen an (E)13,5 präpariert und separat kultiviert. Der Genotyp der jeweiligen Embryos wurde durch die Sequenzierung der *Tbce* Punktmutation bestimmt. Den Motoneuronkulturen wurde am ersten Tag der Kultur je 1 ng/ml des jeweiligen neurotrophen Faktors zugegeben und bei jedem weiteren Mediumwechsel erneuert. Nach sieben Tagen in Kultur wurden die Motoneurone mit p-Tau und Map-2 immunhistochemisch gefärbt und die Axonlängen blind vermessen.

Bei *pmn* Motoneuronen, die unter diesen Bedingungen sieben Tage lang mit BDNF kultiviert wurden, betrug der längste axonale Fortsatz nur 387,3 +/- 15,3 μm (n=101) und wies damit den typischen axonalen Wachstumsdefekt der *pmn* Motoneurone auf. Auch GDNF konnte das axonale Wachstumsdefizit der *pmn* Motoneurone nicht kompensieren, das Axon war im Schnitt nur 293,4 +/- 15,1 μm (n=100) lang. Interessanterweise waren die mit BDNF behandelten Axone jedoch noch signifikant länger als die mit GDNF behandelten Axone ($p < 0,0001$, student's *t*-test, Abb. 17C).

Die Behandlung kultivierter *pmn* Motoneurone mit CNTF dagegen verlängerte das Axonwachstum signifikant auf 652,9 +/- 22,1 μm (n=100). Auch durch die kombinierte Behandlung mit BDNF, CNTF und GDNF wurden die Axone im Schnitt 601,4 μm +/- 23,9 μm (n=101) lang. Demzufolge kann CNTF, im Gegensatz zu BDNF und GDNF, den axonalen Wachstumsdefekt bei isolierten *pmn* Motoneuronen vollständig kompensieren, da im Vergleich zur Axonlänge der NMRI Kontrollmotoneurone kein signifikanter Längenunterschied mehr besteht ($p > 0,05$, student's *t*-test, Abb. 16B).

In einer weiteren Reihe von Experimenten wurde anschließend der Einfluss der verschiedenen neurotrophen Faktoren auf das Wachstum aller axonalen

Fortsätze, inklusive der Kollateralen analysiert. Mit BDNF behandelte *pmn* Motoneurone wuchsen auf die Gesamtaxonlänge von $465,4 \pm 20,9 \mu\text{m}$ ($n=101$). Mit GDNF behandelte *pmn* Motoneurone wiesen eine Gesamtaxonlänge inklusive der Kollateralen von lediglich $380,1 \pm 19,1 \mu\text{m}$ ($n=100$) auf. Bei der Behandlung der *pmn* Motoneurone mit CNTF wurde die Gesamtaxonlänge dagegen stark verlängert auf $775,6 \pm 27,3 \mu\text{m}$ ($n=100$). Auch bei kombinierter Behandlung mit allen drei Faktoren (BDNF, CNTF, GDNF) betrug die Gesamtaxonlänge $729,9 \pm 34,7 \mu\text{m}$ ($n=101$). Daher bleibt also der axonale Wachstumsdefekt der *pmn* Motoneurone bei der Behandlung mit BDNF oder GDNF bestehen. Bemerkenswert jedoch erscheint, dass die mit BDNF behandelten Axone noch signifikant länger sind, als die mit GDNF behandelten Axone ($p=0,003$, student's *t*-test). Im Vergleich dazu, hatte die Zugabe von BDNF, CNTF oder GDNF bei NMRI Wildtyp Motoneuronkulturen keinen signifikanten Unterschied im Axonwachstum ergeben (Abb. 13C).

Demzufolge ist CNTF in der Lage das Axonwachstum von *pmn* Motoneuronen signifikant zu erhöhen ($p<0,0001$; One Way ANOVA, Abb. 16A, 17C). Nur die Behandlung mit CNTF ist in der Lage, das axonale Wachstumsdefizit von *pmn* Motoneurone soweit aufzuheben, dass kein signifikanter Unterschied mehr zwischen wildtypischen Kontrollkulturen und den mit CNTF behandelten *pmn* Kulturen besteht ($p > 0,05$, student's *t*-test, Abb. 16B).

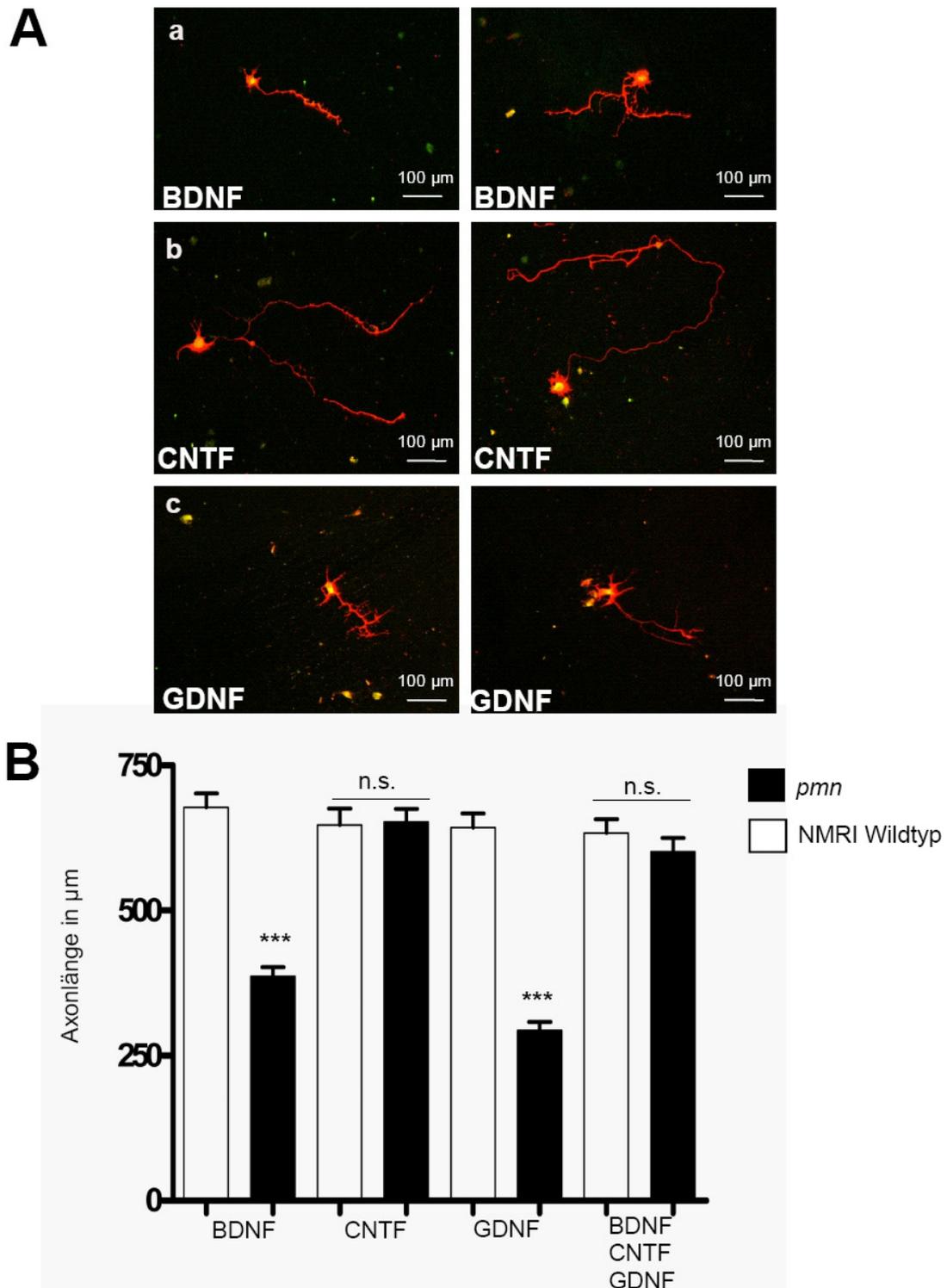


Abbildung 16: CNTF hebt den axonalen Wachstumsdefekt bei isolierten *pmn* Motoneuronen auf

Die mit BDNF oder GDNF kultivierten *pmn* Motoneurone zeigen den charakteristischen Wachstumsdefekt (Aa,c, B; $p < 0,0001$). Die mit CNTF kultivierten *pmn* Motoneurone dagegen werden signifikant länger (A b), sogar so lang, dass zwischen den *pmn* und den NMRI Wildtyp Motoneuronen kein signifikanter Unterschied besteht (B; $p > 0,05$).

3.5.2 CNTF reduziert die axonalen Schwellungen bei *pmn* Motoneuronen

In einem weiteren Versuch wurden die Auswirkungen von BDNF, CNTF und GDNF auf die pathologischen axonalen Schwellungen der *pmn* Motoneurone untersucht. Dazu wurden die axonalen Schwellungen pro Gruppe bei mehr als 140 *pmn* Motoneuronen aus sechs unabhängigen Versuchen gezählt und dann die Anzahl der axonalen Schwellungen pro 1000 μm Axonlänge bestimmt.

BDNF behandelte *pmn* Motoneurone wiesen $7,04 \pm 0,37$ Schwellungen pro 1000 μm auf ($n=142$, Abb. 17Aa). *Pmn* Motoneurone, die 7 Tage lang mit CNTF behandelt worden waren, hatten dagegen nur $3,52 \pm 0,23$ Schwellungen pro 1000 μm Axon ($n=143$, Abb. 17Ab). Mit GDNF behandelte *pmn* Motoneurone zeigten dagegen sogar $8,75 \pm 0,51$ Schwellungen pro 1000 μm Axon ($n=141$, Abb. 17Ac). Axone der *pmn* Motoneuronen, die mit einer Kombination aus BDNF, CNTF und GDNF behandelt wurden, besaßen stattdessen nur $2,78 \pm 0,18$ Schwellungen pro 1000 μm Axon ($n=142$, Abb. 17Ad).

Daher wiesen *pmn* Motoneurone, die mit GDNF behandelt wurden, signifikant mehr Schwellungen auf, als *pmn* Motoneurone, die mit BDNF behandelt wurden ($p=0,0091$, student's *t*-test, Abb. 17B). Die Behandlung der *pmn* Motoneurone mit CNTF war dagegen auch im Hinblick auf die Reduktion der pathologischen axonalen Schwellungen signifikant besser als BDNF oder GDNF ($p<0,0001$, one way ANOVA). Die gemeinsame Applikation von BDNF, CNTF und GDNF war sogar in der Lage, die Anzahl der pathologischen Schwellungen noch weiter zu senken, deshalb war diese Behandlung auch der alleinigen CNTF Applikation signifikant überlegen ($p=0,0021$, student's *t*-test) (Abb. 17B).

Zusammenfassend lässt sich daher festhalten, dass sowohl bei BDNF als auch GDNF behandelten Motoneuronen der charakteristische Axonwachstumsdefekt der *pmn* Motoneurone noch nachweisbar ist. Die Zugabe von BDNF moduliert aber dabei die axonalen Krankheitserscheinungen der *pmn* Motoneurone, wie das Axonwachstum und die Anzahl axonaler Schwellungen, aber noch signifikant besser als GDNF. Demgegenüber kann die CNTF Behandlung *in*

vitro sowohl das Defizit des Axonlängenwachstum aufheben (Abb. 17C), als auch die Anzahl der axonalen Schwellungen gegenüber BDNF und GDNF drastisch reduzieren (Abb. 17B). CNTF scheint demnach der erfolgversprechendste neurotrophe Faktor für eine Therapie der axonalen Defekte der *pnn* Motoneurone zu sein.

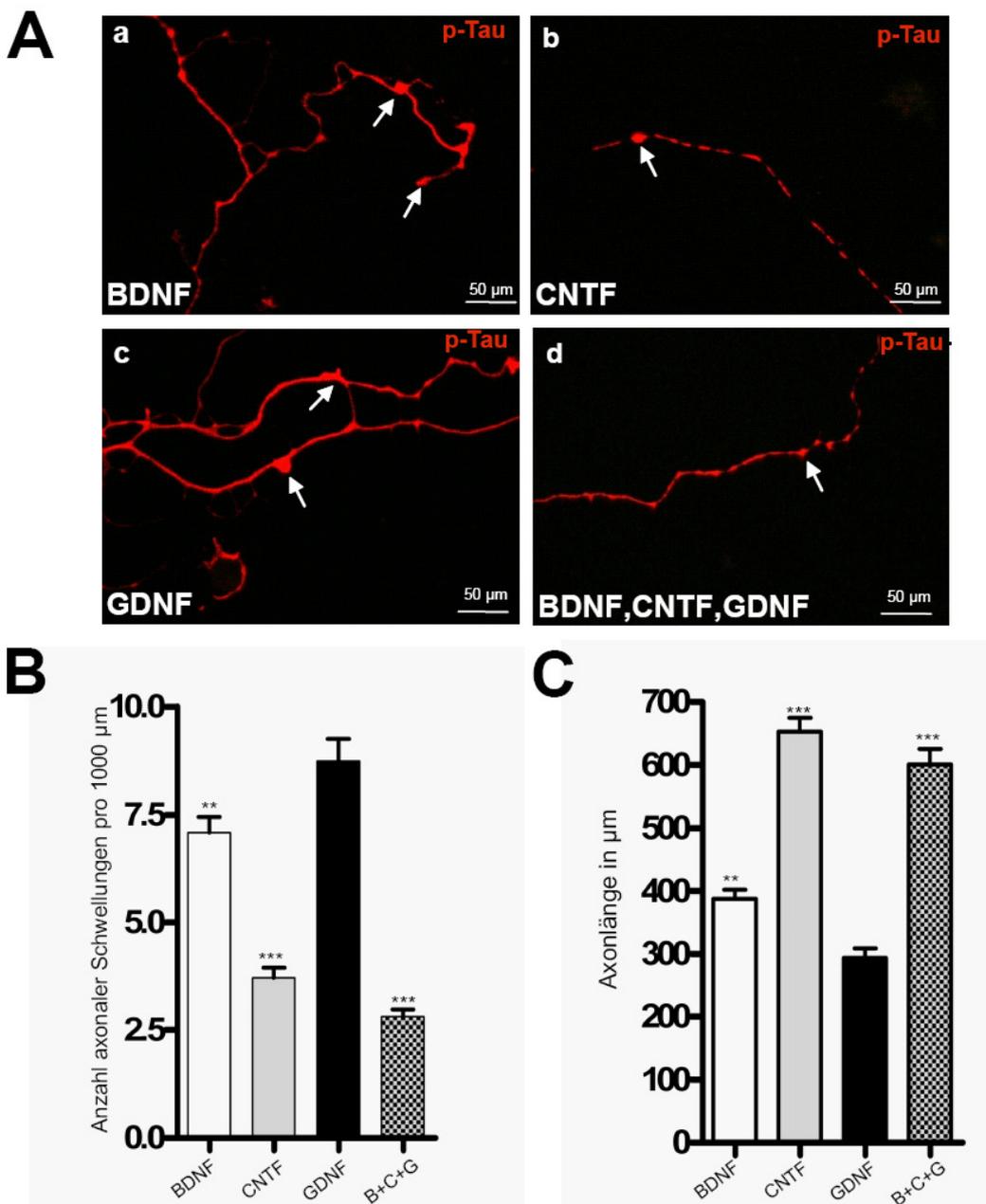


Abbildung 17: Neurotrophe Faktoren verringern die Anzahl axonaler Schwellungen bei primären *pmn* Motoneuronen

Pmn Motoneurone, die mit GDNF(Ac) oder BDNF (Aa) behandelt wurden, weisen sowohl die typischen axonalen Schwellungen mit irregulärer Färbung für p-Tau auf (Pfeil), als auch den charakteristischen axonalen Wachstumsdefekt (C). Dabei besitzen die mit BDNF behandelten Motoneurone weniger Schwellungen und haben längere Axone, als die mit GDNF behandelten Motoneurone (B,C). Die Behandlung der *pmn* Motoneurone mit CNTF ist in der Lage, die Anzahl dieser pathologischen Schwellungen signifikant zu reduzieren (Ac,B, $p < 0,0001$) und die Länge der Axone signifikant zu verlängern (C). Die Zugabe von BDNF, CNTF und GDNF gemeinsam reduziert die Anzahl der axonalen Schwellungen sogar noch weiter (Ad,B).

4 DISKUSSION

Neurotrophe Faktoren wie BDNF, CNTF und GDNF regulieren zahlreiche wichtige Aspekte der Ontogenese und Funktionen von Motoneuronen. Sie haben unter anderem Einfluss auf das Überleben der Neurone im Gehirn und Rückenmark, das Aussprossen von Neuriten, die Synaptogenese, die synaptische Plastizität sowie die Reifung und Aufrechterhaltung elektrophysiologischer Erregbarkeit. Damit diese unterschiedlichen Funktionen wahrgenommen werden können, sind die Faktoren für neurotrophe Faktoren wahrscheinlich ungleich in den subzellulären Domänen des Motoneurons verteilt. Die genaue subzelluläre Lokalisation der Rezeptoren für neurotrophe Faktoren auf Motoneuronen ist aber bisher nicht beschrieben worden (Yano and Chao, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit wurde nun erstmals die genaue subzelluläre Lokalisation der BDNF, CNTF und GDNF Rezeptoren auf embryonalen und adulten Motoneuronen charakterisiert.

4.1 TrkB, p-TrkB, gp130 und p-Stat3 sind im Perikaryon, in Dendriten, im Axon und an der Axonterminalen von Motoneuronen lokalisiert

BDNF ist ein potenter neurotropher Faktor aus der Gruppe der Neurotrophine, der in biomedizinischer Hinsicht vor allem durch seine protektiven Auswirkungen bei degenerativen Motoneuronenerkrankungen bekannt geworden ist (Sagot et al., 1998b; Jablonka et al., 2004; Friedman et al., 1995; Kishino et al., 1997). Seine zellulären Effekte werden vor allem durch den hochaffinen Neurotrophinrezeptor TrkB vermittelt (Klein et al., 1991). TrkB fand sich *in vitro* in hoher Intensität in den Dendriten, im Zellkörper sowie dem Wachstumskegel embryonaler Motoneurone. In Übereinstimmung mit diesen Befunden aus der Zellkultur, war TrkB auch *in vivo* im Vorderhorn des lumbalen Rückenmarks in hoher Intensität auf den Dendriten und im Zellkörper der Motoneurone zu finden. Immunreaktivität für aktiviertes p-TrkB wurde ebenfalls in Dendriten und im Soma beobachtet. Dabei war die Färbeintensität für p-TrkB *in vivo* weitaus geringer ausgeprägt als für TrkB und nur punktuell in der perinukleären Region

sowie in den Dendriten der α -Motoneurone zu erkennen. Diese geringere Färbeintensität für TrkB und p-TrkB im adulten ZNS gegenüber den embryonalen Motoneuronen lässt sich vermutlich durch die Expressionsverminderung dieses Rezeptors von pränatal zu postnatal erklären (Zhang and Huang, 2006).

Im Axon war der hochaffine BDNF Rezeptor sowohl *in vitro* als auch *in vivo* nachweisbar, dabei wies die phosphorylierte Form, p-TrkB, eine deutlich höhere Färbeintensität auf, als die native Form TrkB. Dies ist vermutlich zum einen durch die hohe Spezifität und Affinität des p-TrkB Antikörpers bedingt und zum anderen durch den erhöhten retrograden Transport des aktivierten Rezeptors. Im Längsschnitt des N. phrenicus war TrkB besonders an der Oberfläche des Axons lokalisiert, was auf eine Membranständigkeit der nichtaktivierten Form von TrkB hindeutet. Im Axon selbst war TrkB in geringerer Intensität nachweisbar, besonders aber in der Nähe der Ranvierschnürringe. Hochauflösende Mikroskopie des Nervlängsschnittes zeigte eine deutliche Kollokalisierung mit dem Tauprotein im Axon. In klarem Gegensatz dazu wurde die aktivierte Untereinheit des BDNF Rezeptors, p-TrkB, zum größten Teil innerhalb des Axon gefunden und nur ein geringerer Anteil befand sich in der Axonmembran. In hoher Vergrößerung zeigten sich kleine vesikuläre Strukturen an den Ranvierschnürringen, die p-TrkB beinhalten und deutlich mit Tau kollokalisieren. Die deutlich höhere Färbeintensität für p-TrkB innerhalb des Axon im Vergleich zur geringeren Intensität an der Axonoberfläche, deutet ebenfalls auf eine Rezeptorinternalisierung und retrograden Transport des aktivierten Rezeptors nach der Bindung des Liganden hin. Dies lässt vermuten, dass gerade die aktivierte, phosphorylierte Form dieses Neurotrophinrezeptors internalisiert und retrograd in Richtung des Zellkerns transportiert wird, während unphosphoryliertes TrkB eher membranständig bleibt. Zahlreiche Studien untermauern diesen retrograden Transport von Neurotrophinen. Delcroix bereitete erste Hinweise dafür, dass Neurotrophine (TrkA) in Endosomen zusammen mit Erk1/2, p38 und Akt im N. ischiadicus retrograd transportiert werden (Delcroix et al., 2003). Eine neue Studie konnte nun *in vivo* den

retrograden Transport von TrkB in Endosomen von Motoneuronen demonstrieren und weiter zeigen, dass die kleine GTPase Rab5 zunächst für die Zuordnung von Rezeptoren und Liganden in frühe Endosomen zuständig ist und dann Rab7-positive Organellen die Rezeptoren über weite Strecken retrograd zum Soma transportieren (Deinhardt et al., 2006b).

Desweiteren fanden sich im Einklang mit den *in vitro* Daten sowohl TrkB als auch p-TrkB in hoher Färbeintensität an den Wachstumskegeln embryonaler Motoneurone und an den Axonterminalen neuromuskulärer Endplatten adulter Motoneurone. Neben der Funktion von BDNF, als Überlebenssignal durch retrograden Transport auf das Perikaryon einzuwirken, scheint der Neurotrophinrezeptor an der neuromuskulären Synapse noch weitere, lokale Funktionen auszuüben. Besonders die Rolle von BDNF und TrkB auf die Potenzierung der Signalübertragung an der motorischen Endplatte scheint dabei von Bedeutung zu sein (Jovanovic et al., 1996). Einerseits wird nach der BDNF vermittelten Aktivierung von TrkB indirekt über die Phosphorylierung von Synaptophysin mehr Acetylcholin freigesetzt und andererseits führt die TrkB Aktivierung auch direkt zu einem vermehrten präsynaptischen Kalziumeinstrom, der wiederum mehr Acetylcholin freigesetzt und somit spontane und evozierte Signale potenziert (Boulanger and Poo, 1999; Kleiman et al., 2000; Jovanovic et al., 2000).

CNTF ist ein weiterer wichtiger neurotropher Faktor aus der Familie der Neurozytokine, der das Überleben und die Differenzierung von Neuronen und Gliazellen fördert und auch eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung und der neuronalen Regeneration spielt (Sendtner et al., 1994; Mayer et al., 1994). Der CNTF Rezeptor besteht aus CNTFR α , gp130 und LIFR β (Ip et al., 1993; Davis et al., 1993; Ip et al., 1992). Die weiteren Effekte nach Rezeptoraktivierung werden vor allem durch den JAK-STAT Signalweg vermittelt (Stahl et al., 1995). Die Rezeptoruntereinheit gp130 war *in vitro* vor allem in den Dendriten und im Soma der embryonalen Motoneurone lokalisiert. Das aktivierte Signaltransduktionsprotein p-Stat3 war in den embryonalen

Zellkulturen sowohl in den Dendriten und im Soma als auch im Axon zu finden. Im Vorderhorn des lumbalen Rückenmarks war die Immunfluoreszenz für die CNTF Rezeptoruntereinheit gp130 und aktiviertes p-Stat3 *in vivo* relativ gering ausgeprägt. Punktuelle Färbung konnte innerhalb der Zellkörper der Motoneurone und in den Dendriten beobachtet werden. Hierbei war p-Stat3 im Besonderen perinukleär lokalisiert. A.J. MacLennan beschrieb in seinen *in vivo* Untersuchungen nach CNTF Behandlung ein ähnliches Verteilungsmuster von p-Stat3 im Rückenmarksquerschnitt. P-Stat3 war nach CNTF Injektion in den N. facialis sowohl in den proximalen und distalen Dendriten als auch im Zellkörper der Motoneurone zu erkennen (MacLennan et al., 2000). Die Lokalisation des aktivierten p-Stat3 im Zellkörper des Motoneurons führte MacLennan zur Frage, ob der CNTF Rezeptorkomplex nach Rezeptoraktivierung internalisiert und retrograd transportiert wird und dann im Zellkörper Stat3 aktiviert, oder ob der aktivierte Rezeptor Stat3 vor Ort im Axon aktiviert und dann p-Stat3 retrograd zum Zellkörper transportiert wird. Da sich bisher jedoch keine Studie mit der subzelluläre Verteilung von p-Stat3 und dem CNTF Rezeptorkomplex entlang des gesamten Motoneuronaxon *in vitro* oder *in vivo* beschäftigte, konnte keine befriedigende Antwort auf diese Frage gefunden werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher die subzelluläre Lokalisation von gp130 und p-Stat3 entlang des Axons von Motoneuronen *in vitro* und *in vivo* untersucht. *In vitro* war die Intensität der Axonfärbung für p-Stat3 wesentlich stärker als für gp130. Insbesondere im distalen Anteil des Axons war die Immunreaktivität für p-Stat3 sehr prominent. Im Längsschnitt des N. phrenicus war gp 130 vor allem in der Axonmembran und in geringerer Intensität auch im Axon selbst nachzuweisen. Der aktivierte CNTF Mediator p-Stat3 wurde dagegen besonders innerhalb des Axons in starker Färbungsintensität beobachtet. Zusätzliche Untersuchungen in hoher Vergrößerung zeigten, dass sich p-Stat3 innerhalb des Axons in Vesikel ähnlichen Strukturen befand. Dieser Befund liefert einen weiteren Hinweis dafür, dass p-Stat3 in adulten Motoneuronen retrograd transportiert wird. In Versuchen nach Axotomie konnte dieser retrograde Transport in Motoneuronen bereits nachgewiesen werden und auch, dass dieser retrograde Transport von p-Stat3 für die protektive Wirkung auf die Integrität des Axons verantwortlich ist

(Kirsch et al., 2003). Außerdem waren gp130 und p-Stat3 im Phrenicuslängsschnitt innerhalb der Schwanzzellen nachzuweisen, die das Axon umhüllen. Schwanzzellen bilden und speichern CNTF in hohem Maße und setzen es nach Läsion des Axons frei (Sendtner et al., 1992c). Neben ihrer Speicherfunktion für CNTF, scheint CNTF aber auch autokrine Effekte auf Schwanzzellen selbst zu besitzen. So wird beispielsweise der Grad der Myelinisierung durch CNTF reguliert (Stankoff et al., 2002; Bolin et al., 1995), so dass es zu erwarten ist, dass die CNTF vermittelnde Rezeptereinheit gp130 und auch das Signaltransduktionsprotein p-Stat3 in Schwanzzellen lokalisiert sind.

An den Wachstumskegeln embryonaler Motoneurone und den Axonterminalen motorischer Endplatten adulter Motoneurone waren sowohl gp130 als auch p-Stat3 in hoher Intensität lokalisiert. Auch dieser Befund liefert einen weiteren Hinweis dafür, dass gerade die aktivierte Form des CNTF Rezeptors retrograd in Richtung des Zellkerns transportiert wird. Denn wie auch im Falle von TrkB, weist die aktivierte Form p-Stat3 eine stärkere Immunreaktivität innerhalb des Axons auf, als die gp130 Rezeptorkomponente, die eher membrangebunden lokalisiert ist. Daher sprechen die Daten dieser Arbeit eher für einen retrograden Transport von p-Stat3 nach lokaler CNTF Rezeptoraktivierung, gerade auch da dieses Protein in hoher Intensität innerhalb von Vesikel-ähnlichen Strukturen im Axon selbst gefunden wurde. Auch andere Studien liefern wertvolle Hinweise dafür, dass p-Stat3 nach Axotomie im Axon selbst hochreguliert wird und dann direkt retrograd zum Nukleus transportiert wird (Lee et al., 2004; Haas et al., 1999; Schwaiger et al., 2000). P-Stat3 wird daher vermutlich sowohl als retrogrades Signal als auch als Transkriptionsfaktor auf den Zellkern wirken, wo es positive Effekte auf das Überleben und die neuronale Regeneration nach Axotomie bewirkt. Gleichzeitig lässt sich aber ein retrograder Transport des CNTF Rezeptor Komplexes nicht ausschließen, da sich auch gp130 in geringer Intensität innerhalb des Axons fand. In der Zusammenschau der Ergebnisse lässt sich festhalten, dass gerade die aktivierten Formen p-TrkB und p-Stat3 innerhalb des Axon in vesikulären

Strukturen lokalisiert sind, während die nicht-phosphorylierten Formen TrkB und gp130 eher ein membranständiges Färbeverhalten zeigen. Daraus kann geschlossen werden, dass die aktivierten Formen internalisiert und dann retrograd zum Soma transportiert werden.

4.2 Ret und p-Ret sind auf Dendriten, im Perikaryon und an der Axonterminalen von Motoneuronen lokalisiert, nicht aber im Axon

GDNF ist ein potenter neurotropher Faktor für Motoneurone aus der Gruppe der TGF β -Superfamilie (Henderson et al., 1994). Nach Bindung des Liganden an GFR α , vermittelt das Transmembranprotein c-Ret das Überleben von Motoneuronen (Jing et al., 1996), bewirkt aber auch ein Auswachsen von Neuriten (Uchida et al., 2006). *In vitro* war c-Ret in den Dendriten, im Zellkörper und auch im Wachstumskegel embryonaler Motoneurone lokalisiert. Im Perikaryon zeigte c-Ret eine besonders starke Immunreaktivität an der Zelloberfläche. Die aktivierte Rezeptoreinheit, p-Ret, war ebenfalls in Dendriten, dem Zellkörper und in geringerer Intensität im Wachstumskegel der Motoneurone zu erkennen. Auch *in vivo* konnte c-Ret in adulten Motoneuronen im Vorderhorn des lumbalen Rückenmarkes in hoher Intensität in den Dendriten und auf der Oberfläche der Motoneuronenzellkörper nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu c-Ret war das aktivierte p-Ret aber nicht oberflächlich, sondern hauptsächlich innerhalb der Zellkörper der Motoneurone lokalisiert, was auf eine rasche Rezeptorinternalisierung nach Rezeptorbindung hindeutet. P-Ret fand sich außerdem in hoher Intensität in Dendriten. Die hohe Färbeintensität von Ret in den Dendriten und Perikarya spinaler Motoneuronen wurde kürzlich auch von Jongen et al. beschrieben; mittels Immunhistochemie und ISH wurde die Verteilung von Ret vor und nach Nervenläsion untersucht. Im Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit, wurde Ret im Soma der Motoneurone sowie besonders stark in den Dendriten nachgewiesen (Jongen et al., 2007).

Im Gegensatz zu p-TrkB und p-Stat3, die *in vitro* eine starke Anfärbung des Axons gezeigt hatten, war p-Ret aber kaum im Axon embryonaler Motoneurone

nachzuweisen. In Längsschnittpräparaten des N. phrenicus war c-Ret, wie in anderen Studien auch (Nakamura et al., 1994), innerhalb der das Axon umhüllenden Schwannzellen lokalisiert. Im Axon selbst fand sich dagegen keine Immunreaktivität für c-Ret. Auch weitere Untersuchungen in starker Vergrößerung zeigten, dass c-Ret deutlich innerhalb der das Axon umhüllenden Schwannzellen zu finden war, nicht aber im Axon selbst. Analog dazu war auch aktiviertes p-Ret selbst in hochauflösender konfokaler Analyse zwar in hohem Ausmaß in den Schwannzellen lokalisiert, wurde jedoch im Gegensatz zu p-TrkB und p-Stat3 nicht im Axon selbst nachgewiesen. Auch in Jorgens Arbeit fanden sich keine Hinweise für eine Lokalisation von Ret im Axon der Motoneurone (Jongen et al., 2007).

Demgegenüber fand eine Studie, dass die ligandenbindende Untereinheit des GDNF Rezeptors, GFR α , im peripheren Nerv neben den Schwannzellen, auch im angrenzenden Endoneurium lokalisiert ist; der Großteil jedoch in löslicher Form vorliegt (Hase et al., 2005). Westernblotanalysen zeigten weiterhin, dass c-Ret in spinalen Motoneuronen im Gegensatz zu GFR α nur sehr schwach exprimiert wird (Yang & Nelson 2004). Da GFR α in spinalen Motoneuronen hoch exprimiert ist, übt GDNF seine Effekte auf das Axonwachstum möglicherweise durch andere Korezeptoren als Ret aus. Seit neuerem werden auch Ret-unabhängige Signaltransduktionswege propagiert, die durch GFR α und NCAM-140/Fyn oder Met/Syndecan vermittelt werden (Sariola and Saarma, 2003). Aus diesem Grund könnte die ligandenbindende Rezeptoruntereinheit des GDNF Rezeptors, GFR α , eine mehr wichtige Rolle einnehmen, da sie sowohl für die Ret vermittelte Signaltransduktion, als auch für die neuen NCAM-140 vermittelten Wege der Signaltransduktion von Bedeutung ist.

Auch der retrograde Transport von GDNF in Motoneuronen scheint eher von GFR α als von Ret abhängig zu sein (Leitner et al., 1999). GDNF besitzt eine schlechte Bioverfügbarkeit und erreicht via retrograden Transport nur schwer das Perikaryon. Larsen et al konnten zeigen, dass erst die Konjugation von GDNF mit dem Tetanus Toxin Fragment C zu einem verbesserten retrograden Transport und damit zu einer besseren Bioverfügbarkeit im Zellkörper führt.

(Larsen et al., 2006). Die vermehrte Aufnahme von GDNF an den peripheren Nervenendigungen der Motoneurone erfolgte unter diesen Versuchsbedingungen jedoch nicht über eine Ret Rezeptorinternalisierung und retrograden Transport des GDNF Rezeptors. Vielmehr war es die Bindung des Tetanus Toxin Fragment C an das Gangliosid GD1b und die anschließende Clathrin-abhängige Endozytose, die zur verbesserten Aufnahme in das Axonterminale und zum retrograden Transport von GDNF führte (Deinhardt et al., 2006a). Aufgrund dieser schlechten Bioverfügbarkeit *in vivo* und der Beobachtung, dass weder c-Ret noch p-Ret im Axon lokalisiert ist, spielen retrograde Transportsignale für die zellulären Effekte von GDNF wohl eher eine untergeordnete Rolle. Stattdessen beschränkt sich die Lokalisation und Aktivierung von Ret in Motoneuronen auf das Perikaryon und die Dendriten, was einen parakrinen Wirkmechanismus von GDNF hindeutet.

Passend zu den Befunden aus den *in vitro* Untersuchungen, die eine Lokalisation sowohl von c-Ret als auch von p-Ret auf den Wachstumskegeln embryonaler Motoneurone nachgewiesen hatten, konnten diese beiden Rezeptoreinheiten auch an den Axonterminalen motorischer Endplatten adulter Mäuse nachgewiesen werden. GDNF und c-Ret haben dabei an der neuromuskulären Endplatte und dem Wachstumskegel spezifische, lokale Funktionen. Zahlreiche Studien haben sowohl präsynaptische als auch postsynaptische Aufgaben dieses neurotrophen Faktors an der neuromuskulären Synapse beschrieben. So beeinflusst GDNF via Ret auf der präsynaptischen Seite beispielsweise die Anzahl und Größe der Transmittervesikel an der motorischen Endplatte (Liou et al., 1997; Ribchester et al., 1998). Auch eine kleine, aber signifikante Beeinflussung der Amplitude postsynaptischer Endplattenpotentiale konnte beobachtet werden (Wang et al., 2002). Postsynaptisch ist GDNF via Ret und auch dem neu beschriebenen NCAM-140 Weg in der Lage, die Dichte und Verteilung der Ach-Rezeptoren zu regulieren (Yang and Nelson, 2004). Zusammengenommen tragen GDNF und Ret damit eine Vielzahl von lokalen Funktionen, die für die funktionelle und strukturelle Verbindung der neuromuskulären Synapse wichtig sind. GDNF und

Ret tragen auf diese Weise zur Plastizität der neuromuskulären Endplatte bei, ohne dabei jedoch Einfluss auf das Axon zu nehmen. Somit konzentriert sich die Funktion von Ret in Motoneuronen eher lokal auf die Dendriten, das Perikaryon und das Axonterminale motorischer Endplatte, wo Ret in hoher Intensität lokalisiert ist. Demgegenüber erscheint die ligandenbindende Rezeptoruntereinheit des GDNF Rezeptors, GFR α , mit seinen neuen Ret-unabhängigen Wegen der Signaltransduktion für den retrograden Transport und die Auswirkungen von GDNF auf das Axon verantwortlich.

4.3 GDNF stimuliert das Dendritenwachstum von Motoneuronen stärker als BDNF und CNTF

Neben den gut untersuchten Effekten neurotropher Faktoren auf das Überleben von Neuronen, besitzen diese Faktoren aber auch differentielle Wirkungen auf die Morphogenese und das Auswachsen von Neuriten. Diese Effekte sind neben der embryonalen Entwicklung vor allem auch bei Nervenverletzungen von entscheidender Bedeutung, da die Expression von Neurotrophinen und anderen neurotrophen Faktoren nach Axotomie stark hochreguliert wird. Jedoch gab es bis zum jetzigen Zeitpunkt keine Studie, die sich differentiell mit den Auswirkungen der einzelnen Faktoren auf das Axon- und Dendritenwachstum beschäftigte und einen direkten, quantitativen Vergleich der Fähigkeit des Neuritenwachstums zwischen verschiedenen neurotrophen Wachstumsfaktoren anstellte. Da im Rahmen dieser Arbeit die subzelluläre Lokalisation des BDNF, CNTF- und GDNF- Rezeptors charakteristische Unterschiede in ihrer Verteilung zwischen Axon und Dendriten sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aufgewiesen hatten, wurde untersucht, ob dieser Unterschied in der Verteilung mit verschiedenartigen Auswirkungen auf das Neuritenwachstum einhergeht.

Es zeigte sich, dass CNTF, BDNF und GDNF *in vitro* gleichermaßen in der Lage sind, das Axonwachstum von Wildtyp Motoneuronen zu stimulieren. Es fand sich statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen den Axonlängen, der mit verschiedenen neurotrophen Faktoren behandelten Motoneurone, und

zwar sowohl im Hinblick auf die Länge des längsten axonalen Fortsatzes als auch im Hinblick auf die gesamte Axonlänge inklusiver aller Kollateralen. Im Gegensatz zum Axonwachstum, fanden sich beim Dendritenwachstum erstaunliche Unterschiede. Obwohl alle drei Faktoren in der Lage waren, das Dendritenwachstum von Motoneuronen zu stimulieren, wurden die mit GDNF behandelten Dendriten kultivierter Motoneurone im Schnitt etwa doppelt so lang wie Dendriten, bei BDNF oder CNTF behandelten Motoneuronen. GDNF ist somit ein potenter Stimulator des Dendritenwachstums bei isolierten primären Motoneuronen. Interessanterweise hatte Blits ähnliche Ergebnisse im Rahmen seiner *in vivo* Studie erhalten (Blits et al., 2004). Bei dem Versuch Motoneurone nach Axotomie mittels neurotropher Faktoren und konsekutiver Reimplantation der Vorderwurzel am Überleben zu halten, war der Gruppe aufgefallen, dass nach Axotomie GDNF behandelte Motoneurone im Vorderhorn signifikant mehr Neuriten (Dendriten) auswuchsen, als BDNF behandelte Mäuse. Dagegen erreichten nur vereinzelte Axone, der mit GDNF behandelten Motoneurone, die reimplantierte Vorderwurzel (Blits et al., 2004). Dieses Ergebnis spricht, wie auch die Daten dieser Arbeit, für das erstaunliche Potential von GDNF, das Dendritenwachstum der Motoneurone im Vorderhorn zu stimulieren, während es nur geringere Effekte auf das Axonwachstum besitzt. Diese Beobachtung scheint auch mit der starken Immunreaktivität von c-Ret und seiner aktivierten Form p-Ret in den Dendriten zu korrelieren, die sich sowohl in den *in vitro* als auch in den *in vivo* Versuchen zur subzellulären Lokalisation der GDNF Rezeptoreinheiten gezeigt hatte. Dem gegenüber waren TrkB, p-TrkB, gp130 und p-Stat3 als Marker für den BDNF und CNTF Rezeptor gleichermaßen in den Dendriten und Axonen lokalisiert. Über welche genauen molekularen Mechanismen dieses Dendritenwachstum vermittelt wird, ist bisher noch ungeklärt. Ein komplexes Zusammenspiel zwischen Rezeptoren, Signalmediatoren und Transkriptionsfaktoren einerseits sowie dem Zytoskelett andererseits ist notwendig, um die Richtung, die Verzweigung und die Elongation des Axons und der Dendriten zu regulieren. Markus et al. schlagen vor, dass der PI3K/Akt Signalweg auf das Aktin Mikrofilamentsystem wirkt und so für die lokale Regulation des Auswachsens der Wachstumskegel und der

terminalen Axonverzweigung zuständig ist, während über den Ras/MAPK Signalweg diejenigen Signale gesendet werden, die für die Mikrotubuli Assemblierung und axonale Elongation nötig sind (Markus et al., 2002). Die aktivierten Rezeptoren für neurotrophe Faktoren aktivieren ihrerseits intrazelluläre Signalkaskaden, die dann Veränderungen des Zytoskeletts bewirken und die Transkription für Gene der neuronalen Differenzierung beeinflussen (Chao, 2003). Für den speziellen Fall von GDNF, konnte bereits gezeigt werden, dass das durch GDNF/Ret stimulierte Neuritenwachstum über Dok-4 reguliert wird und wahrscheinlich nur bei längerfristiger MAPK Stimulierung zustande kommt, während eine kurzfristige MAPK Aktivierung eher ein Überlebenssignal an die Nervenzelle sendet (Uchida et al., 2006). Auch Ho et. al. stellten die besondere Eigenschaften von GDNF heraus; es wird spekuliert, dass GDNF im Gegensatz zu anderen neurotrophen Faktoren Veränderungen an Glutamaterezeptoruntereinheiten bedingt, die einerseits neuroprotektive Effekte gegenüber Exzitotoxizität vermitteln und andererseits ein verstärktes Neuritenwachstum über Ret, MAPK und die PI3 Kinase fördert (Ho et al., 2000).

4.4 Der AMPA-Rezeptorantagonist NBQX hebt das durch GDNF vermittelte Dendritenwachstum auf

GDNF hatte im Gegensatz zu BDNF und CNTF einen starken Effekt auf das Dendritenwachstum gezeigt. Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit auch untersucht, ob es neben dem Unterschied in der subzellulären Rezeptorverteilung für neurotrophe Faktoren noch weitere modulierende Faktoren gibt, die das Dendritenwachstum von embryonalen Motoneuronen beeinflussen. In letzter Zeit mehren sich Hinweise dafür, dass es nicht nur eine isolierte Faktor – Rezeptor Interaktion gibt, sondern vielmehr eine regelrechte cross-talk-Aktivität zwischen verschiedenen Rezeptortyrosinkinasen, Zytokinrezeptoren und auch Ionenkanälen existiert (Zhang and Huang, 2006; Tsui-Pierchala et al., 2002; Chuang et al., 2001; Sariola and Saarma, 2003). Ein weiteres Beispiel für dererlei komplexe Interaktionen zwischen Kanälen und

neurotrophen Faktoren wurde für den AMPA Rezeptor beschrieben. Der AMPA Rezeptor ist ein Liganden gesteuerter, ionotroper Kationkanal, der nach Glutamatbindung Natriumeinstrom und Kaliumausstrom bewirkt. Je nach Zusammensetzung seiner vier Untereinheiten besitzt der AMPA Rezeptor zusätzlich auch eine Permeabilität für Kalziumionen. Rezeptoren, die eine GluR2 Untereinheit besitzen, weisen eine wesentlich geringere Permeabilität für Kalzium auf als Rezeptoren, die diese Untereinheit nicht exprimieren (Hollmann et al., 1991). Motoneurone besitzen eine Vielzahl von AMPA Rezeptoren auf ihrer Oberfläche, die zu einem hohen Anteil Kalzium permeabel sind (Carriedo et al., 1996; Van Den et al., 2000). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass neurotrophe Faktoren wie GDNF und BDNF einen Einfluss auf die Expression dieser GluR2-Untereinheit haben und damit auch auf die Kalziumpermeabilität des AMPA Rezeptors (Brene et al., 2000). Im Rahmen dieser Arbeit wurde daher eine mögliche Interaktion zwischen dem AMPA-Rezeptor und neurotrophen Faktoren im Hinblick auf einen Einfluss auf das Axon- und Dendritenwachstum von primären Motoneuronen analysiert.

Wenn primäre embryonale Motoneurone mit dem kompetitiven, selektiven AMPA Rezeptor Antagonisten NBQX kultiviert wurden, verringerte sich das vormals durch GDNF stark forcierte Dendritenwachstum durch NBQX so stark, dass nur noch ganz kurze Dendritenbäume auswuchsen. Demgegenüber zeigten die mit BDNF und CNTF behandelten Kulturen durch die Inhibition des AMPA Rezeptors sogar eine leicht signifikante Erhöhung der Dendritenlängen gegenüber den Kontrollkulturen. Diese Befunde sprechen für weitaus komplexere Interaktionen zwischen neurotrophen Faktoren und dem AMPA Rezeptor in Motoneuronen, als bisher angenommen. Es scheint, dass das über GDNF vermittelte starke Auswachsen der Dendriten über die Antagonisierung des AMPA Rezeptors größten Teils inhibiert werden kann. Auf welche Weise diese Interaktion genau vonstatten geht, über direkte oder indirekte Signale, ist aber noch unklar.

Analog dazu wurde das Dendritenwachstum der Motoneurone auch durch die Aktivierung des AMPA Rezeptors beeinflusst. Wenn der Agonist AMPA zu

BDNF oder GDNF behandelten Kulturen gegeben wurde, änderten sich die Dendritenlängen im Vergleich zu den Kontrollkulturen nicht signifikant. Dagegen wurden die Dendriten der mit CNTF und AMPA behandelten Motoneurone signifikant kürzer als die Kontrollkulturen. Daher scheint das Dendritenwachstum durch die Zugabe von GDNF *in vitro* schon maximal stimuliert zu sein, so dass es auch durch Zugabe von AMPA nicht noch weiter gefördert werden kann. Der umgekehrte Fall trifft für CNTF zu. Hier bewirkte die Zugabe des Agonisten eine Verminderung der Dendritenlänge, wie auch der Antagonist eine Vermehrung des Dendritenwachstums bewirkt hatte. Andererseits scheint sich die Auswirkung der Interaktion zwischen neurotrophen Faktoren und dem AMPA Rezeptor auf das Dendritenwachstum zu beschränken, denn weder die Aktivierung noch auch die Antagonisierung des AMPA Rezeptors hatte einen signifikanten Einfluss auf das Axonwachstum der Motoneurone.

In diesem Licht scheint eine direkte oder indirekte Interaktion zwischen dem glutamatergen AMPA Rezeptor und den Rezeptoren für GDNF, CNTF und BDNF in Motoneuronen denkbar. Die molekulare Verbindung zwischen AMPA Rezeptor Aktivität und neurotrophen Faktoren ist schon mehrfach in anderen Zellsystemen, wie etwa Neuroblastomzellen, beschrieben worden (Voss et al., 2006; Zafra et al., 1990; Limatola, 2004): AMPA Rezeptoren selbst sind in der Lage, eine Reihe von second messenger Signalwegen zu rekrutieren, wie beispielsweise die Tyrosinkinase Lyn (Hayashi et al., 1999), FAK und PI3-K (Millan et al., 2004). Über diese Moleküle können weitere Signalkaskaden wie der MAP Kinaseweg eingeschlagen werden (Wang and Durkin, 1995; Perkinson et al., 1999; Bahr et al., 2002). Auch auf Transkriptionsebene sind komplexe Interaktionen zwischen neurotrophen Faktoren und dem AMPA Rezeptor beschrieben worden. So bewirkt die AMPA Aktivierung einerseits die Hochregulierung des BDNF Rezeptors TrkB (Voss et al., 2006) und die Phosphorylierung von CREB, der unter anderem auch die Expression von BDNF reguliert (Shieh et al., 1998; Tao et al., 1998).

Andererseits sind sowohl GDNF als auch BDNF in der Lage, die Aktivität des GluR2 Promoters mittels eines NRSE (neuron restrictive silencer element) zu regulieren (Brene et al., 2000). Dies ist um so mehr von Interesse, als gerade der GluR2 Anteil des AMPA Rezeptors die Permeabilität für Kalziumionen bestimmt. Es ist schon lange bekannt, dass der intrazelluläre Kalziumspiegel für das Auswachsen von Neuriten eine wichtige Rolle spielt (Fukuda and Kameyama, 1979; Lankford and Letourneau, 1989; Rusanescu et al., 1995). Neue Daten sprechen dafür, dass nicht nur die absolute Konzentration des Kalzium dabei von Bedeutung ist, sondern auch, durch welchen Kanal diese Erhöhung des Kalziumspiegels zustande gekommen ist (Jacques-Fricke et al., 2006). Auch konnte gezeigt werden, dass AMPA Kanäle auf Motoneuronen, durch Phosphorylierung in ihrer Aktivität moduliert werden können. So ist es gut möglich, dass die Rezeptoren für neurotrophe Faktoren über second messenger Signalwege, wie beispielsweise cAMP und PKA, Einfluss auf die Aktivität der AMPA Kanäle besitzen. Für α -Motoneurone wurde bereits eine Phosphorylierung der Untereinheit GluR 6 und 7 durch die PKA beschrieben (Traynelis and Wahl, 1997; Hatt, 1999). Ob jedoch der direkte Anstieg der Kalziumkonzentration, oder indirekte Effekte über Signalkaskaden oder auf Transkriptionsebene für die beobachteten Effekte des AMPA Rezeptors auf das Dendritenwachstum verantwortlich sind, bleibt derzeit noch unklar und bedarf weiteren Untersuchungen. Auch die interessante Frage, warum sich das durch GDNF forcierte Dendritenwachstum durch die Interaktion mit dem AMPA Rezeptor auf ganz andere Weise beeinflussen lässt als durch BDNF oder CNTF bleibt weiteren Studien vorbehalten.

Des Weiteren ist es bemerkenswert, dass es selbst bei Zugabe von hohen AMPA Konzentrationen nur zu wenig bis keinem Absterben der Motoneurone *in vitro* kam. Und das, obwohl es im Allgemeinen als gesichert gilt, dass die übermäßige Aktivierung des AMPA Rezeptors zu Exzitotoxizität und damit zur Apoptose der Motoneurone führt. So dass dies als ein weiterer Hinweis für den protektiven Effekt neurotropher Faktoren gegenüber der Glutamat-induzierten Exzitotoxizität gewertet werden kann. Diese Beobachtung steht in Einklang mit

Ergebnissen aus weiteren Studien (Voss et al., 2006). Gerade für GDNF ist diese Art der Neuroprotektion von spinalen Motoneuronen nach AMPA induzierter Toxizität beschrieben worden (Platania et al., 2005).

4.5 CNTF hebt das axonale Wachstumsdefizit bei *p_{mn}* Motoneuronen auf und verringert die Anzahl der axonalen Schwellungen

Die *p_{mn}* (progressive Motoneuronopathie) Maus ist ein Mausmodell für humane degenerative Erkrankungen des Motoneurons. Sie entstand 1991 durch eine Spontanmutation in einem NMRI Mauseauszuchtstamm am Panum Institut in Dänemark. (Schmalbruch et al., 1991). Klinisch weisen *p_{mn}* Mäuse etwa zwei Wochen nach Geburt progressive Paresen auf, die zunächst die hinteren Extremitäten betreffen. Die Erkrankung breitet sich dann rasch auf proximale Muskelgruppen aus, befällt auch die Atemmuskulatur und führt schließlich durch respiratorische Insuffizienz zwischen der vierten und sechsten Lebenswoche zum Tode (Holtmann et al., 1999; Schmalbruch et al., 1991). Die zugrunde liegende Erkrankung wird durch eine autosomal rezessiv vererbte Punktmutation im Tubulin spezifischen Chaperone E (*Tbce*) Gen verursacht (Bommel et al., 2002; Martin et al., 2002). Das *Tbce* Protein ist wichtig für die Dimerisierung der Tubulinuntereinheiten und daher von essentieller Bedeutung für den korrekten Aufbau der Mikrotubuli (Tian et al., 1996). Bei der *p_{mn}* Maus kommt es durch den defekten Mikrotubuliumaufbau im Krankheitsverlauf zuerst zu Störungen im retrograden Transport, die auch die ersten klinischen Symptome bedingen. Erst im späteren Verlauf der Erkrankung kommt es zu einer deutlichen Abnahme des Zellvolumens und weiteren atrophischen Veränderungen der Motoneuron Perikarya sowie zur Apoptose. Die Erkrankung der *p_{mn}* Maus wird daher auch als "dying back" Neuronopathie charakterisiert (Schmalbruch et al., 1991), da der Funktionsverlust der Motoneurone der Degeneration und dem Absterben der Motoneurone vorausgeht. Isolierte Motoneurone von *p_{mn}* Mäusen weisen im Vergleich zu Kontrollmotoneuronen *in vitro* eine normale Überlebensdauer auf, zeigen aber charakteristische morphologische Merkmale. Die Axone der *p_{mn}* Motoneurone weisen einen

Wachstumsdefizit auf und sind etwa 50% kürzer als Wildtyp Motoneurone. Außerdem weisen die Axone pathologische Schwellungen mit einem irregulären Färbeverhalten für β -Tubulin and p-Tau auf, die so bei Wildtyp Motoneuronen nicht auftreten (Bommel et al., 2002). Mehrere *in vivo* Studien konnten bereits zeigen, dass eine Behandlung mit neurotrophen Faktoren die Symptomatik der *p_{mn}* Mäuse verbessern kann. Die systemische Gabe von CNTF und BDNF konnte den Beginn der Erkrankung verzögern und das Überleben der Mäuse signifikant verlängern. Die systemische Gabe von GDNF dagegen hatte keinen positiven Effekt (Sendtner et al., 1992b; Sagot et al., 1996; Sagot et al., 1995). Der zugrunde liegende Mechanismus für diese Unterschiede in der Krankheitsmodulation zwischen den verschiedenen Gruppen der neurotrophen Faktoren blieb aber unklar, zumal keiner der Faktoren ursächlich für die Erkrankung der *p_{mn}* Maus ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass auch kultivierte *p_{mn}* Motoneurone unterschiedlich auf die Behandlung mit verschiedenen neurotrophen Faktoren reagieren. *P_{mn}* Motoneurone, die mit BDNF oder GDNF kultiviert worden waren, wiesen den charakteristischen axonalen Wachstumsdefekt der *p_{mn}* Motoneurone auf und wurden nur etwa halb so lang wie gesunde Kontrollmotoneurone. Interessanterweise, wurden die mit BDNF behandelten Axone jedoch signifikant länger als die mit GDNF behandelten Axone. Die CNTF Behandlung von isolierten *p_{mn}* Motoneuronen war dagegen in der Lage, das Axonwachstum stark zu stimulieren. CNTF hob das axonale Wachstumsdefizit der *p_{mn}* Motoneurone *in vitro* sogar soweit auf, dass kein signifikanter Unterschied mehr zu gesunden Kontrollmotoneuronen bestand. In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von *p_{mn}* Motoneuronen mit CNTF auch im Hinblick auf die pathologischen axonalen Schwellungen signifikant erfolgreicher war als BDNF oder GDNF. Diese Axonschwellungen sind durch ihre irreguläre Anfärbung von Tubulin und Tau charakterisiert und ähneln morphologisch stark den Proteinaggregaten, die auch bei der ALS anzutreffen sind (Jablonka et al., 2004; Chou, 1992). Während diese axonale Schwellungen für *p_{mn}* Motoneurone charakteristisch

sind, kommen sie in Wildtyp Motoneuronen kommen so gut wie nicht vor (Bommel et al., 2002; Jablonka et al., 2004). Unter den untersuchten *p^{mn}* Kulturen wiesen die mit GDNF behandelten *p^{mn}* Motoneurone nicht nur die kürzesten Axone, sondern auch die meisten axonalen Schwellungen auf. Die geringen positiven Effekte von GDNF auf die Modulation der axonalen Pathologie *in vitro* liefern auch eine Erklärung für die Beobachtung, dass GDNF zwar die Apoptose der *p^{mn}* Motoneurone verhindert, nicht aber die axonale Degeneration aufhalten kann und somit auch nicht den vorzeitigen Tod der Tiere (Sagot et al., 1996a). Es scheint, dass GDNF zwar einen protektiven Einfluss auf das Perikaryon besitzt, jedoch keine Effekte auf die Degeneration des Axons. Diese Ergebnisse stehen auch in Einklang mit einer weiteren Studie, die gezeigt hatte, dass die lokale Applikation von CNTF und BDNF eine Verbesserung des retrograden Transportes bei *p^{mn}* Motoneuronen bewirkt, nicht aber GDNF (Sagot et al., 1998a). Obwohl der charakteristische Axonwachstumsdefekt der *p^{mn}* Motoneurone nach BDNF Behandlung noch nachweisbar war, wiesen diese *p^{mn}* Motoneurone signifikant weniger axonale Schwellungen auf und waren signifikant länger, als GDNF behandelte *p^{mn}* Motoneurone.

Die Behandlung der *p^{mn}* Motoneurone mit CNTF führte zur kompletten Remission des Axonwachstumsdefizit. Auch war die Anzahl der pathologischen axonalen Schwellungen gegenüber BDNF und GDNF *in vitro* signifikant reduziert. Damit scheint CNTF der erfolgversprechendste neurotrophe Faktor für eine Behandlung der *p^{mn}* Maus zu sein. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen aus *in vivo* Versuchen, die gezeigt hatten, dass CNTF nicht nur positive Effekte auf das Überleben der *p^{mn}* Mäuse besitzt, sondern auch den Phänotyp der *p^{mn}* Mäuse drastisch bessert (Sendtner et al., 1992a; Sagot et al., 1995; Sagot et al., 1998; Haase et al., 1997). Diese klinische Verbesserung der *p^{mn}* Mäuse lässt sich aufgrund der Daten dieser Arbeit vermutlich durch eine Reduktion der axonalen Pathologien, wie den axonalen Schwellungen, und damit einhergehend mit einem verbesserten axonalen Transport erklären. Bemerkenswerterweise korrelieren die Daten dieser Arbeit mit der

Beobachtung, dass die systemische Behandlung von *pmn* Mäusen mit BDNF und CNTF zu einer klinischen Verbesserung der Tiere führt, nicht aber die Behandlung mit GDNF (Sagot et al., 1996a). Die genaue molekulare Ursache dieses unterschiedlichen Therapieerfolges von BDNF, CNTF und GDNF ist noch immer nicht bekannt. Die Ergebnisse lassen jedenfalls darauf schließen, dass für erfolgreiche Therapie von degenerativen Motoneuronenerkrankungen mehr von Nöten ist als eine anti-apoptotische Therapie. Die erfolgreiche Behandlung dieser Erkrankungen beinhaltet nicht nur die Förderung neuronalen Überlebens, sondern vor allem auch die Wiederherstellung des normalen physiologischen Wirkungsspektrums der Motoneurone (Thoenen and Sendtner, 2002). Weiterhin deuten diese Ergebnisse auf die enorme Bedeutung des axonalen Transportes und der axonalen Integrität im Kontext der degenerativen Motoneuronenerkrankungen hin.

Auch populationsgenetische Befunde sprechen für die besondere Fähigkeit von CNTF, protektiven Einfluss auf Motoneuronenerkrankungen, wie der ALS, zu nehmen. Bei etwa 2% der gesunden Normalbevölkerung in Europa, Asien und den USA liegt eine *CNTF* Nullmutation (*CNTF* $-/-$) vor, bei der anstelle eines 200 Aminosäuren langen Proteins nur biologisch inaktives Protein synthetisiert wird. Obwohl diese *CNTF* Nullmutation per se nicht mit einer erhöhten Inzidenz an Motoneuronenerkrankungen assoziiert ist (Giess et al., 1998), scheint diese Mutation für den Verlauf der ALS von Bedeutung zu sein. Zwei Studien sprechen dafür, dass ALS Patienten, die einen *CNTF* $-/-$ Hintergrund aufweisen, früher und schwerer an der ALS erkranken als Patienten mit einem *CNTF* $+/+$ Hintergrund (Giess et al., 1998; Giess et al., 2002). In einer Familie mit einer dominanten heterozygoten Val148Gly Mutation im Exon 5 des *SOD-1*-Gens, fand sich bei einem männlichen Patienten mit *CNTF* $-/-$ Hintergrund ein sehr früher Krankheitsbeginn mit 25 Jahren und eine ausgeprägte rasche Krankheitsprogression, während seine 35 jährige Schwester, bei der dieselbe Mutation im *SOD-1* Gen vorlag aber heterozygot bezüglich *CNTF* war, noch keine Erkrankungszeichen aufwies (Giess et al., 2002a; Giess et al., 2002b). Auch wenn CNTF keine ursächliche Therapie für neurodegenerative

Erkrankungen wie der ALS darstellt, so scheint CNTF doch eine entscheidende Rolle als Erkrankungs-Modifizier zu spielen.

Andererseits demonstrieren die Daten dieser Arbeit einmal mehr die Bedeutung der synergistischen Wirkung neurotropher Faktoren. Die gemeinsame Applikation von BDNF, CNTF und GDNF war in der Lage, die Anzahl der pathologischen axonalen Schwellungen von *pmn* Motoneuronen *in vitro* sogar signifikant noch weiter zu senken, als die alleinige Behandlung mit CNTF. Außerdem wurde der axonale Wachstumsdefekt der *pmn* Motoneurone durch die simultane Behandlung mit BDNF, CNTF und GDNF aufgehoben, so dass kein signifikanter Unterschied mehr zu den Wildtyp Motoneurone bestand. Diese synergistischen Effekte lassen sich auch in anderen Mausmodellen für ALS beobachten. *H-SOD-1G93A* mutierte Motoneurone waren unter der kombinierten Gabe von BDNF und CNTF sowohl morphologisch im Bezug auf Neuritenwachstum als auch im Bezug auf das Überleben, von Kontrollmotoneuronen nicht mehr zu unterscheiden (Takeuchi et al., 2002; Jablonka et al., 2004).

4.6 Implikationen für weitere klinische Studien und Ausblick

Die vielversprechenden Daten aus den tierexperimentellen Studien forcierten in den neunziger Jahren des letzten Jahrhunderts klinische Studien mit BDNF und CNTF für humane degenerative Motoneuronenerkrankungen. Allerdings zeigten sowohl BDNF als auch CNTF in Phase III Studien an ALS Patienten bei subkutaner Injektion keine signifikanten klinischen Verbesserungen im Vergleich zur Placebogruppe, sowohl im Hinblick auf das Primärziel Überleben als auch auf Sekundärziele wie Muskelkraft oder Lebensqualität (Bongioanni et al., 2004; Miller et al., 1996b; ALS CNTF Treatment Study (ACTS) group, 1996; 1999; 1999). Des Weiteren traten unter der systemischer Applikation von CNTF zahlreiche Nebenwirkungen auf, wie beispielsweise Anorexie, Husten, Übelkeit und Asthenie, die den zytokinen Eigenschaften des neurotrophen Faktors zugeschrieben wurden (Miller et al., 1996a). Schon bald kamen daher Fragen

nach der besten Art der Applikationsmethode und der Dosierung auf, da die in den Studien eingesetzte Dosierungen die tierexperimentellen Dosen stark unterschritten (Thoenen and Sendtner, 2002). Mit GDNF wurden bisher keine groß angelegten klinischen Studien an ALS Patienten durchgeführt. Eine Studie hatte jedoch sogar einen erhöhten GDNF Spiegel im Liquor und Muskel von ALS Patienten festgestellt, so dass die zusätzliche Applikation dieses neurotrophen Faktors primär nicht sinnvoll erscheint (Grundstrom et al., 2000). Auch die Daten dieser Arbeit sprechen nicht dafür, dass ein Therapieversuch mit GDNF bei der Behandlung der ALS erfolgversprechend ist. Durch die vornehmlichen Wirkungen von GDNF auf das Perikaryon scheint GDNF zwar ein potenter Wachstumsfaktor für Dendriten zu sein, ohne dabei jedoch Einfluss auf die axonalen Pathologien der Motoneurone zu nehmen. Die mit GDNF behandelten *pnn* Motoneurone hatten wesentlich kürzere Axone als die mit BDNF oder CNTF behandelten Motoneurone und wiesen neben diesem typischen axonalen Wachstumsdefekt auch die höchste Anzahl der pathologischen axonalen Schwellungen auf. Demgegenüber sprechen die Daten dieser Arbeit durchaus dafür, weitere klinische Versuche mit CNTF, besonders in der Kombination mit BDNF, an ALS Patienten zu unternehmen. Denn einerseits ist derzeit nur für ein einziges Medikament, Riluzol (Rilutek®), eine Verlängerung des Lebens um durchschnittlich 2 Monate gesichert (Bensimon et al., 1994; Miller et al., 2002) und gleichzeitig sind die Daten aus zahlreichen tierexperimentellen Studien vielversprechend. *In vivo* ist CNTF in der Lage, die Symptomatik der *pnn* Mäuse zu verbessern und ihr Leben signifikant zu verlängern. Jetzt konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Behandlung der *pnn* Motoneurone mit CNTF *in vitro* sowohl eine Aufhebung des charakteristischen Wachstumsdefektes als auch eine hochsignifikante Reduktion der pathologischen axonalen Schwellungen bewirkt. Neue Studien sollten dabei auf eine gezielte und lokale Applikation von BDNF und CNTF an den Motoneuronen gerichtet sein, beispielsweise durch lentivirale Vektoren oder Implantation genetisch veränderter Zellen.

Als Ziel einer Behandlung neurodegenerativer Erkrankungen mit neurotrophen Faktoren kann jedoch nur die Linderung der Symptomatik, nie die Heilung der zugrunde liegenden Erkrankung gelten. In diesem Zusammenhang werden neurotrophe Faktoren in der näheren Zukunft mit Sicherheit eine wichtige Rolle einnehmen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Neurotrophe Faktoren wie BDNF, CNTF und GDNF regulieren zahlreiche wichtige Funktionen von Motoneuronen. Sie üben unter anderem einen positiven Einfluss auf das Überleben sowie das Aussprossen von Neuriten aus. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmalig die genaue subzelluläre Lokalisation der BDNF, CNTF und GDNF Rezeptoren auf embryonalen und adulten Motoneuronen charakterisiert. Die Rezeptoruntereinheiten und Signaltransduktionsproteine der BDNF und CNTF Rezeptoren, TrkB, p-TrkB, gp130 und p-Stat3, sind im Perikaryon, in Dendriten, im Axon und an den Axonterminalen von Motoneuronen lokalisiert. Bei embryonalen Motoneuronen befinden sich diese Signaltransduktionsproteine auch an den axonalen Wachstumskegeln. Dabei sind die nativen Formen TrkB und gp130 im Axon überwiegend membranständig, die aktivierten Formen p-TrkB und p-Stat3 hauptsächlich innerhalb des Axons lokalisiert. Demgegenüber sind die Rezeptoruntereinheiten des GDNF Rezeptors, Ret und p-Ret, besonders in den Dendriten lokalisiert. Auch im Perikaryon und an der Axonterminale neuromuskulärer Endplatten von Motoneuronen werden Ret und p-Ret exprimiert, nicht aber im Axon.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das durch neurotrophe Faktoren bedingte Neuritenwachstum genau quantifiziert und dabei zwischen einer Stimulation des Axon- bzw. des Dendritenwachstums differenziert. Obwohl BDNF, CNTF und GDNF alle das Dendritenwachstum von Motoneuronen stimulieren, werden die mit GDNF behandelten Dendriten im Schnitt etwa doppelt so lang wie Dendriten, der mit BDNF oder CNTF behandelten Motoneurone. GDNF ist somit ein potenter Stimulator des Dendritenwachstums bei isolierten primären Motoneuronen. Dieser Befund korreliert gut mit der starken Expression von Ret und p-Ret in den Dendriten. Demgegenüber findet sich statistisch kein signifikanter Unterschied zwischen den Axonlängen, der mit den drei verschiedenen neurotrophen Faktoren behandelten Motoneurone.

Das dritte Ziel der Arbeit war die Analyse einer möglichen Interaktion zwischen dem glutamatergen AMPA-Rezeptor und neurotrophen Faktoren im Hinblick auf das Axon- und Dendritenwachstum von Motoneuronen. Der kompetitive AMPA Rezeptorantagonist NBQX verringert das durch GDNF stark forcierte Dendritenwachstum; demgegenüber zeigen die mit BDNF und CNTF behandelten Kulturen durch die Inhibition des AMPA Rezeptors eine leicht signifikante Erhöhung der Dendritenlängen. Der Rezeptoragonist AMPA verändert die Dendritenlänge der mit BDNF oder GDNF behandelten Zellen nicht signifikant. Die Dendriten der mit CNTF behandelten Motoneurone werden in Anwesenheit des Agonisten AMPA jedoch signifikant kürzer. Allerdings scheint sich die Auswirkung der Interaktion zwischen neurotrophen Wachstumsfaktoren und dem AMPA Rezeptor auf das Dendritenwachstum zu beschränken, denn weder die Aktivierung noch auch die Antagonisierung des AMPA Rezeptors hat einen signifikanten Einfluss auf das Axonwachstum der Motoneurone.

Mehrere *in vivo* Studien konnten bereits zeigen, dass die Behandlung mit CNTF oder BDNF die Symptomatik der *p^{mn}* Maus, einem Modell für ALS, verbessern kann, während GDNF keine positive Wirkung zeigt. Im Rahmen dieser Arbeit konnten erstmals die differentiellen Wirkungen dieser neurotrophen Faktoren auf kultivierte *p^{mn}* Motoneurone gezeigt werden. *P^{mn}* Motoneurone, die mit BDNF oder GDNF kultiviert werden, weisen den charakteristischen axonalen Wachstumsdefekt der *p^{mn}* Motoneurone auf und werden nur etwa halb so lang wie Kontrollmotoneurone. Bemerkenswerterweise werden BDNF behandelte Axone jedoch noch signifikant länger als GDNF behandelte Axone. Die Behandlung der *p^{mn}* Motoneurone mit CNTF führt dagegen zu einer kompletten Remission des axonalen Wachstumsdefekts. Auch werden die Anzahl der pathologischen axonalen Schwellungen *in vitro* durch CNTF drastisch reduziert. Damit erscheint CNTF der erfolgversprechendste neurotrophe Faktor für eine Behandlung der *p^{mn}* Maus zu sein.

6 LITERATURVERZEICHNIS

(1999) A controlled trial of recombinant methionyl human BDNF in ALS: The BDNF Study Group (Phase III). *Neurology* 52:1427-1433.

Al-Chalabi A, Andersen PM, Nilsson P, Chioza B, Andersson JL, Russ C, Shaw CE, Powell JF, Leigh PN (1999) Deletions of the heavy neurofilament subunit tail in amyotrophic lateral sclerosis. *Hum Mol Genet* 8:157-164.

ALS CNTF Treatment Study (ACTS) group (1996) A double-blind placebo-controlled clinical trial of subcutaneous recombinant human ciliary neurotrophic factor (rhCNTF) in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 46:1244-1249.

Bahr BA, Bendiske J, Brown QB, Munirathinam S, Caba E, Rudin M, Urwyler S, Sauter A, Rogers G (2002) Survival signaling and selective neuroprotection through glutamatergic transmission. *Exp Neurol* 174:37-47.

Barbin G, Manthorpe M, Varon S (1984) Purification of the chick eye ciliary neuronotrophic factor. *J Neurochem* 43:1468-1478.

Barde Y-A, Edgar D, Thoenen H (1982) Purification of a new neurotrophic factor from mammalian brain. *EMBO J* 1:549-553.

Becker E, Soler RM, Yuste VJ, Gine E, Sanz-Rodriguez C, Egea J, Martin-Zanca D, Comella JX (1998) Development of survival responsiveness to brain-derived neurotrophic factor, neurotrophin 3 and neurotrophin 4/5, but not to nerve growth factor, in cultured motoneurons from chick embryo spinal cord. *J Neurosci* 18:7903-7911.

Bensimon G, Lacomblez L, Meininger V, ALS-Riluzole Study Group (1994) A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. *N Engl J Med* 330:585-591.

Blits B, Carlstedt TP, Ruitenbergh MJ, de WF, Hermens WT, Dijkhuizen PA, Claasens JW, Eggers R, van der SR, Tenenbaum L, Boer GJ, Verhaagen J (2004) Rescue and sprouting of motoneurons following ventral root avulsion and reimplantation combined with intraspinal adeno-associated viral vector-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor or brain-derived neurotrophic factor. *Exp Neurol* 189:303-316.

Bolin LM, Verity AN, Silver JE, Shooter EM, Abrams JS (1995) Interleukin-6 production by Schwann cells and induction in sciatic nerve injury. *J Neurochem* 64:850-858.

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.

Bongioanni P, Reali C, Sogos V (2004) Ciliary neurotrophic factor (CNTF) for amyotrophic lateral sclerosis/motor neuron disease. *Cochrane Database Syst Rev* CD004302-CD00430S.

Borrello MG, Pelicci G, Arighi E, De FL, Greco A, Bongarzone I, Rizzetti M, Pelicci PG, Pierotti MA (1994) The oncogenic versions of the Ret and Trk tyrosine kinases bind Shc and Grb2 adaptor proteins. *Oncogene* 9:1661-1668.

Boulanger L, Poo MM (1999) Presynaptic depolarization facilitates neurotrophin-induced synaptic potentiation. *Nat Neurosci* 2:346-351.

Boyd JG, Gordon T (2003) Glial cell line-derived neurotrophic factor and brain-derived neurotrophic factor sustain the axonal regeneration of chronically axotomized motoneurons in vivo. *Exp Neurol* 183:610-619.

Braun S, Croizat B, Lagrange MC, Warter JM, Poindron P (1996) Neurotrophins increase motoneurons' ability to innervate skeletal muscle fibers in rat spinal cord--human muscle cocultures. *J Neurol Sci* 136:17-23.

Brene S, Messer C, Okado H, Hartley M, Heinemann SF, Nestler EJ (2000) Regulation of GluR2 promoter activity by neurotrophic factors via a neuron-restrictive silencer element. *Eur J Neurosci* 12:1525-1533.

Bruijn LI, Miller TM, Cleveland DW (2004) Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu Rev Neurosci* 27:723-49.:723-749.

Carriedo SG, Yin HZ, Weiss JH (1996) Motor neurons are selectively vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated injury in vitro. *J Neurosci* 16:4069-4079.

Chao MV (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci* 4:299-309.

Charcot J-M, Joffroy A (1869) Deux cas d'atrophie musculaire progressive avec lésions de la substance grise et des faisceaux antérolatéraux de la moelle épinière. *Arch Physiol* 2:354,629,744-367,647,760.

Chen ZY, Chai YF, Cao L, Lu CL, He C (2001) Glial cell line-derived neurotrophic factor enhances axonal regeneration following sciatic nerve transection in adult rats. *Brain Res* 902:272-276.

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.

Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, Chao MV, Julius D (2001) Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature* 411:957-962.

Clatterbuck RE, Price DL, Koliatsos VE (1994) Further characterization of the effects of brain-derived neurotrophic factor and ciliary neurotrophic factor on axotomized neonatal and adult mammalian motor neurons. *J Comp Neurol* 342:45-56.

Cole N, Siddique T (1999) Genetic disorders of motor neurons. *Semin Neurol* 19:407-418.

Collard JF, Cote F, Julien JP (1995) Defective axonal transport in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 375:61-64.

Costrini NV, Kogan M (1981) Lectin-induced inhibition of nerve growth factor binding by receptors of sympathetic ganglia. *J Neurochem* 36:1175-1180.

Davis S, Aldrich TH, Stahl N, Pan L, Taga T, Kishimoto T, Ip NY, Yancopoulos GD (1993) LIFR β and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *SCI* 260:1805-1808.

Davis S, Aldrich TH, Valenzuela DM, Wong VV, Furth ME, Squinto SP, Yancopoulos GD (1991) The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* 253:59-63.

DeChiara TM, Vejsada R, Poueymirou WT, Acheson A, Suri C, Conover JC, Friedman B, McClain J, Pan L, Stahl N, Ip NY, Kato A, Yancopoulos GD (1995) Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth. *Cell* 83:313-322.

Deinhardt K, Berninghausen O, Willison HJ, Hopkins CR, Schiavo G (2006a) Tetanus toxin is internalized by a sequential clathrin-dependent mechanism initiated within lipid microdomains and independent of epsin1. *J Cell Biol* 174:459-471.

Deinhardt K, Salinas S, Verastegui C, Watson R, Worth D, Hanrahan S, Bucci C, Schiavo G (2006b) Rab5 and Rab7 control endocytic sorting along the axonal retrograde transport pathway. *Neuron* 52:293-305.

Delcroix JD, Valletta JS, Wu C, Hunt SJ, Kowal AS, Mobley WC (2003) NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron* 39:69-84.

Deng H-X, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung W-Y, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP, Warner C, Deng G, Soriano E, Smyth C, Parge HE, Ahmed A, Roses AD, Hallewell RA, Pericak-Vance MA, Siddique T (1993) Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *SCI* 261:1047-1051.

Dev KK, Petersen V, Honore T, Henley JM (1996) Pharmacology and regional distribution of the binding of 6-[3H]nitro-7-sulphamoylbenzo[f]-quinoxaline-2,3-dione to rat brain. *J Neurochem* 67:2609-2612.

Douma S, Van LT, Zevenhoven J, Meuwissen R, Van GE, Peeper DS (2004) Suppression of anoikis and induction of metastasis by the neurotrophic receptor TrkB. *Nature* 430:1034-1039.

Ekestern E (2004) Neurotrophic factors and amyotrophic lateral sclerosis. *Neurodegener Dis* 1:88-100.

Endrizzi M, Huang S, Scharf JM, Kelter AR, Wirth B, Kunkel LM, Miller W, Dietrich WF (1999) Comparative sequence analysis of the mouse and human Lgn1/SMA interval. *Genomics* 60:137-151.

Ericson J, Thor S, Edlund T, Jessell TM, Yamada T (1992) Early stages of motor neuron differentiation revealed by expression of homeobox gene Islet-1. *SCI* 256:1555-1560.

Fine EG, Decosterd I, Papaloizos M, Zurn AD, Aebischer P (2002) GDNF and NGF released by synthetic guidance channels support sciatic nerve regeneration across a long gap. *Eur J Neurosci* 15:589-601.

Friedman B, Kleinfeld D, Ip NY, Verge VM, Moulton R, Boland P, Zlotchenko E, Lindsay RM, Liu L (1995) BDNF and NT-4/5 exert neurotrophic influences on injured adult spinal motor neurons. *J Neurosci* 15:1044-1056.

Fukuda J, Kameyama M (1979) Enhancement of Ca spikes in nerve cells of adult mammals during neurite growth in culture. *Nature (London)* 279:540-548.

Fukuda T, Kiuchi K, Takahashi M (2002) Novel mechanism of regulation of Rac activity and lamellipodia formation by RET tyrosine kinase. *J Biol Chem* 277:19114-19121.

Galasko D, Salmon DP, Craig UK, Thal LJ, Schellenberg G, Wiederholt W (2002) Clinical features and changing patterns of neurodegenerative disorders on Guam, 1997-2000. *Neurology* 58:90-97.

Garces A, Haase G, Airaksinen MS, Livet J, Filippi P, deLapeyriere O (2000) GFRalpha 1 is required for development of distinct subpopulations of motoneuron. *J Neurosci* 20:4992-5000.

Giess R, Götz R, Schrank B, Ochs G, Sendtner M, Toyka KV (1998) Potential implications of a ciliary neurotrophic factor gene mutation in a German population of patients with motor neuron disease. *Muscle Nerve* 21:236-238.

Giess R, Holtmann B, Braga M, Grimm T, Muller-Myhsok B, Toyka KV, Sendtner M (2002a) Early onset of severe familial amyotrophic lateral sclerosis with a SOD-1 mutation: potential impact of CNTF as a candidate modifier gene. *Am J Hum Genet* 70:1277-1286.

Giess R, Maurer M, Linker R, Gold R, Warmuth-Metz M, Toyka KV, Sendtner M, Rieckmann P (2002b) Association of a null mutation in the CNTF gene with early onset of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 59:407-409.

Golden JP, Demaro JA, Osborne PA, Milbrandt J, Johnson EM, Jr. (1999) Expression of neurturin, GDNF, and GDNF family-receptor mRNA in the developing and mature mouse. *Exp Neurol* 158:504-528.

Grob PM, Bothwell MA (1983) Modification of nerve growth factor receptor properties by wheat germ agglutinin. *J Biol Chem* 258:14136-14143.

Grundstrom E, Lindholm D, Johansson A, Blennow K, Askmark H (2000) GDNF but not BDNF is increased in cerebrospinal fluid in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuroreport* 11:1781-1783.

Haas CA, Hofmann HD, Kirsch M (1999) Expression of CNTF/LIF-receptor components and activation of STAT3 signaling in axotomized facial motoneurons: evidence for a sequential postlesional function of the cytokines. *J Neurobiol* 41:559-571.

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.

Hadano S, et al. (2001) A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2. *Nat Genet* 29:166-173.

Hase A, Saito F, Yamada H, Arai K, Shimizu T, Matsumura K (2005) Characterization of glial cell line-derived neurotrophic factor family receptor alpha-1 in peripheral nerve Schwann cells. *J Neurochem* 95:537-543.

Hatt H (1999) Modification of glutamate receptor channels: molecular mechanisms and functional consequences. *Naturwissenschaften* 86:177-186.

Hayashi T, Umemori H, Mishina M, Yamamoto T (1999) The AMPA receptor interacts with and signals through the protein tyrosine kinase Lyn. *Nature* 397:72-76.

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.

Ho TW, Bristol LA, Coccia C, Li Y, Milbrandt J, Johnson E, Jin L, Bar-Peled O, Griffin JW, Rothstein JD (2000) TGFbeta trophic factors differentially modulate motor axon outgrowth and protection from excitotoxicity. *Exp Neurol* 161:664-675.

Hollmann M, Hartley M, Heinemann S (1991) Ca²⁺ permeability of KA-AMPA-gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252:851-853.

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.

Holtmann B, Zielasek J, Toyka KV, Sendtner M (1999) Comparative analysis of motoneuron loss and functional deficits in PMN mice: implications for human motoneuron disease. *J Neurol Sci* 169:140-147.

Ip NY, McClain J, Barrezueta NX, Aldrich TH, Pan L, Li YP, Wiegand SJ, Friedman B, Davis S, Yancopoulos GD (1993) The alpha component of the cntf receptor is required for signaling and defines potential cntf targets in the adult and during development. *Neuron* 10:89-102.

Ip NY, Nye S, Boulton T, Davis S, Taga T, Li Y, Birren S, Yasukawa K, Kishimoto T, Anderson D, Stahl N, Yancopoulos GD (1992) CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signalling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130. *Cell* 69:1121-1132.

Jablonka S, Wiese S, Sendtner M (2004) Axonal defects in mouse models of motoneuron disease. *J Neurobiol* 58:272-286.

Jacques-Fricke BT, Seow Y, Gottlieb PA, Sachs F, Gomez TM (2006) Ca²⁺ influx through mechanosensitive channels inhibits neurite outgrowth in opposition to other influx pathways and release from intracellular stores. *J Neurosci* 26:5656-5664.

Jing S, Wen D, Yu Y, Holst PL, Luo Y, Fang M, Tamir R, Antonio L, Hu Z, Cupples R, Louis JC, Hu S, Altmann BW, Fox GM (1996) GDNF-induced activation of the ret protein tyrosine kinase is mediated by GDNFR-alpha, a novel receptor for GDNF. *Cell* 85:1113-1124.

Jongen JL, Jaarsma D, Hossaini M, Natarajan D, Haasdijk ED, Holstege JC (2007) Distribution of RET immunoreactivity in the rodent spinal cord and changes after nerve injury. *J Comp Neurol* 500:1136-1153.

Jovanovic JN, Benfenati F, Siow YL, Sihra TS, Sanghera JS, Pelech SL, Greengard P, Czernik AJ (1996) Neurotrophins stimulate phosphorylation of synapsin I by MAP kinase and regulate synapsin I-actin interactions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:3679-3683.

Jovanovic JN, Czernik AJ, Fienberg AA, Greengard P, Sihra TS (2000) Synapsins as mediators of BDNF-enhanced neurotransmitter release. *Nat Neurosci* 3:323-329.

Keller-Peck CR, Feng G, Sanes JR, Yan Q, Lichtman JW, Snider WD (2001) Glial cell line-derived neurotrophic factor administration in postnatal life results

in motor unit enlargement and continuous synaptic remodeling at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 21:6136-6146.

Kirsch M, Terheggen U, Hofmann HD (2003) Ciliary neurotrophic factor is an early lesion-induced retrograde signal for axotomized facial motoneurons. *Mol Cell Neurosci* 24:130-138.

Kishino A, Ishige Y, Tatsuno T, Nakayama C, Noguchi H (1997) BDNF prevents and reverses adult rat motor neuron degeneration and induces axonal outgrowth. *Exp Neurol* 144:273-286.

Kleiman RJ, Tian N, Krizaj D, Hwang TN, Copenhagen DR, Reichardt LF (2000) BDNF-Induced potentiation of spontaneous twitching in innervated myocytes requires calcium release from intracellular stores. *J Neurophysiol* 84:472-483.

Klein R, Nanduri V, Jing S, Lamballe F, Tapley P, Bryant S, Cordon-Cardo C, Jones KR, Reichardt LF, Barbacid M (1991) The *trkB* tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 66:395-403.

Kohara K, Kitamura A, Morishima M, Tsumoto T (2001) Activity-dependent transfer of brain-derived neurotrophic factor to postsynaptic neurons. *Science* 291:2419-2423.

Kunita R, Otomo A, Mizumura H, Suzuki K, Showguchi-Miyata J, Yanagisawa Y, Hadano S, Ikeda JE (2004) Homo-oligomerization of ALS2 through its unique carboxyl-terminal regions is essential for the ALS2-associated Rab5 guanine nucleotide exchange activity and its regulatory function on endosome trafficking. *J Biol Chem* 279:38626-38635.

Kunst CB (2004) Complex genetics of amyotrophic lateral sclerosis. *Am J Hum Genet* 75:933-947.

Kuroda H, Sugimoto T, Horii Y, Sawada T (2001) Signaling pathway of ciliary neurotrophic factor in neuroblastoma cell lines. *Med Pediatr Oncol* 36:118-121.

Lankford KL, Letourneau PC (1989) Evidence that calcium may control neurite outgrowth by regulating the stability of actin filaments. *J Cell Biol* 109:1229-1243.

Larsen KE, Benn SC, Ay I, Chian RJ, Celia SA, Remington MP, Bejarano M, Liu M, Ross J, Carmillo P, Sah D, Phillips KA, Sulzer D, Pepinsky RB, Fishman PS, Brown RH, Jr., Francis JW (2006) A glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF):tetanus toxin fragment C protein conjugate improves delivery of GDNF to spinal cord motor neurons in mice. *Brain Res* %20;1120:1-12.

Lee FS, Chao MV (2001) Activation of Trk neurotrophin receptors in the absence of neurotrophins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:3555-3560.

Lee N, Neitzel KL, Devlin BK, MacLennan AJ (2004) STAT3 phosphorylation in injured axons before sensory and motor neuron nuclei: potential role for STAT3 as a retrograde signaling transcription factor. *J Comp Neurol* 474:535-545.

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.

Leitner ML, Molliver DC, Osborne PA, Vejsada R, Golden JP, Lampe PA, Kato AC, Milbrandt J, Johnson EM, Jr. (1999) Analysis of the retrograde transport of glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF), neurturin, and persephin suggests that in vivo signaling for the GDNF family is GFRalpha coreceptor-specific. *J Neurosci* 19:9322-9331.

Levi-Montalcini R (1987) The nerve growth factor: thirty-five years later. *EMBO J* 6:1145-1154.

Levi-Montalcini R (1966) The nerve growth factor: its mode of action on sensory and sympathetic nerve cells. *Harvey Lecture* 60:217-259.

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.

Limatola C (2004) Neurotrophic effects of AMPA. *Cerebellum* 3:2-10.

Lin L-FH, Doherty DH, Lile JD, Bektesh S, Collins F (1993) GDNF: A glial cell line-derived neurotrophic factor for midbrain dopaminergic neurons. *SCI* 260:1130-1132.

Liochev SI, Fridovich I (2003) Mutant Cu,Zn superoxide dismutases and familial amyotrophic lateral sclerosis: evaluation of oxidative hypotheses. *Free Radic Biol Med* 34:1383-1389.

Liou JC, Yang RS, Fu WM (1997) Regulation of quantal secretion by neurotrophic factors at developing motoneurons in xenopus cell cultures. *J Physiol (London)* 503:129-139.

Liu Q, Dreyfuss G (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J* 15:3555-3565.

Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:6307-6311.

MacLennan AJ, Neitzel KL, Devlin BK, Garcia J, Hauptman GA, Gloaguen I, Di MA, Laufer R, Lee N (2000) In vivo localization and characterization of functional ciliary neurotrophic factor receptors which utilize JAK-STAT signaling. *Neuroscience* 99:761-772.

Markus A, Zhong J, Snider WD (2002) Raf and akt mediate distinct aspects of sensory axon growth. *Neuron* 35:65-76.

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.

Masu Y, Wolf E, Holtmann B, Sendtner M, Brem G, Thoenen H (1993b) Disruption of the *CNTF* gene results in motor neuron degeneration. *Nature* 365:27-32.

Masu Y, Wolf E, Holtmann B, Sendtner M, Brem G, Thoenen H (1993a) Disruption of the *CNTF* gene results in motor neuron degeneration. *Nature* 365:27-32.

Mayer M, Bhakoo K, Noble M (1994) Ciliary neurotrophic factor and leukemia inhibitory factor promote the generation, maturation and survival of oligodendrocytes in vitro. *Development* 120:143-153.

Melillo RM, Santoro M, Ong SH, Billaud M, Fusco A, Hadari YR, Schlessinger J, Lax I (2001) Docking protein *FRS2* links the protein tyrosine kinase *RET* and its oncogenic forms with the mitogen-activated protein kinase signaling cascade. *Mol Cell Biol* 21:4177-4187.

Metzger F, Wiese S, Sendtner M (1998) Effect of glutamate on dendritic growth in embryonic rat motoneurons. *J Neurosci* 18:1735-1742.

Millan A, rias-Montano JA, Mendez JA, Hernandez-Kelly LC, Ortega A (2004) Alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptors signaling complexes in Bergmann glia. *J Neurosci Res* 78:56-63.

Miller RG, Bryan WW, Dietz MA, Munsat TL, Petajan JH, Smith SA, Goodpasture JC (1996a) Toxicity and tolerability of recombinant human ciliary

neurotrophic factor in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology* 47:1329-1331.

Miller RG, Mitchell JD, Lyon M, Moore DH (2002) Riluzole for amyotrophic lateral sclerosis (ALS)/motor neuron disease (MND). *Cochrane Database Syst Rev* CD001447-CD00144S.

Miller RG, Petajan JH, Bryan WW, Armon C, Barohn RJ, Goodpasture JC, Hoagland RJ, Parry GJ, Ross MA, Stromatt SC (1996b) A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group. *Ann Neurol* 39:256-260.

Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, McPherson JD (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet* 8:1177-1183.

Nakamura T, Ishizaka Y, Nagao M, Hara M, Ishikawa T (1994) Expression of the ret proto-oncogene product in human normal and neoplastic tissues of neural crest origin. *J Pathol* 172:255-260.

Newman JP, Verity AN, Hawatmeh S, Fee WE, Jr., Terris DJ (1996) Ciliary neurotrophic factors enhances peripheral nerve regeneration. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122:399-403.

Nguyen QT, Parsadanian AS, Snider WD, Lichtman JW (1998) Hyperinnervation of neuromuscular junctions caused by GDNF overexpression in muscle. *Science* 279:1725-1729.

Novikov L, Novikova L, Kellerth JO (1997) Brain-derived neurotrophic factor promotes axonal regeneration and long-term survival of adult rat spinal motoneurons in vivo. *Neuroscience* 79:765-774.

Oppenheim RW, Houenou LJ, Johnson JE, Lin LF, Li L, Lo AC, Newsome AL, Prevet DM, Wang S (1995) Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy- induced cell death by GDNF. *Nature* 373:344-346.

Oppenheim RW, Houenou LJ, Parsadanian AS, Prevet D, Snider WD, Shen L (2000) Glial cell line-derived neurotrophic factor and developing mammalian motoneurons: regulation of programmed cell death among motoneuron subtypes. *J Neurosci* 20:5001-5011.

Oyesiku NM, Wigston DJ (1996) Ciliary neurotrophic factor stimulates neurite outgrowth from spinal cord neurons. *J Comp Neurol* 364:68-77.

Paratcha G, Ledda F, Baars L, Couplier M, Besset V, Anders J, Scott R, Ibanez CF (2001) Released GFRalpha1 potentiates downstream signaling, neuronal survival, and differentiation via a novel mechanism of recruitment of c-Ret to lipid rafts. *Neuron* 29:171-184.

Perkinton MS, Sihra TS, Williams RJ (1999) Ca²⁺-permeable AMPA receptors induce phosphorylation of cAMP response element-binding protein through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent stimulation of the mitogen-activated protein kinase signaling cascade in neurons. *J Neurosci* 19:5861-5874.

Platania P, Seminara G, Aronica E, Troost D, Vincenza CM, Angela SM (2005) 17beta-estradiol rescues spinal motoneurons from AMPA-induced toxicity: a role for glial cells. *Neurobiol Dis* 20:461-470.

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.

Raju SV, Zheng M, Schuleri KH, Phan AC, Bedja D, Saraiva RM, Yiginer O, Vandegaer K, Gabrielson KL, O'donnell CP, Berkowitz DE, Barouch LA, Hare JM (2006) Activation of the cardiac ciliary neurotrophic factor receptor reverses

left ventricular hypertrophy in leptin-deficient and leptin-resistant obesity. Proc Natl Acad Sci U S A 103:4222-4227.

Ribchester RR, Thomson D, Haddow LJ, Ushkaryov YA (1998) Enhancement of spontaneous transmitter release at neonatal mouse neuromuscular junctions by the glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF). J Physiol 512:635-641.

Rosen DR, et al. (1993) Mutation in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. Nature 362:59-62.

Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kroning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M (2003) 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.

Rouleau GA, Clark AW, Rooke K, Pramatarova A, Krizus A, Suchowersky O, Julien JP, Figlewicz D (1996) SOD1 mutation is associated with accumulation of neurofilaments in amyotrophic lateral sclerosis. Ann Neurol 39:128-131.

Rowland LP, Shneider NA (2001) Amyotrophic lateral sclerosis. N Engl J Med 344:1688-1700.

Rusanescu G, Qi H, Thomas SM, Brugge JS, Halegoua S (1995) Calcium influx induces neurite growth through a Src-Ras signaling cassette. Neuron 15:1415-1425.

Sagot Y, Rosse T, Vejsada R, Perrelet D, Kato AC (1998) Differential effects of neurotrophic factors on motoneuron retrograde labeling in a murine model of motoneuron disease. J Neurosci 18:1132-1141.

Sagot Y, Tan SA, Baetge E, Schmalbruch H, Kato AC, Aebischer P (1995) 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.

Sagot Y, Tan SA, Hammang JP, Aebischer P, Kato AC (1996a) GDNF slows loss of motoneurons but not axonal degeneration or premature death of pmn/pmn mice. *J Neurosci* 16:2335-2341.

Sariola H, Saarma M (2003) Novel functions and signalling pathways for GDNF. *J Cell Sci* 116:3855-3862.

Schaar DG, Sieber B-A, Dreyfus CF, Black IB (1993) Regional and cell-specific expression of GDNF in rat brain. *Exp Neurol* 124:368-371.

Schmalbruch H, Jensen HJ, Bjaerg M, Kamieniecka Z, Kurland L (1991) A new mouse mutant with progressive motor neuronopathy. *J Neuropathol Exp Neurol* 50:192-204.

Schwaiger FW, Hager G, Schmitt AB, Horvat A, Hager G, Streif R, Spitzer C, Gamal S, Breuer S, Brook GA, Nacimiento W, Kreutzberg GW (2000) Peripheral but not central axotomy induces changes in Janus kinases (JAK) and signal transducers and activators of transcription (STAT). *Eur J Neurosci* 12:1165-1176.

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.

Sendtner M, Dittrich F, Hughes RA, Thoenen H (1994) Actions of CNTF and neurotrophins on degenerating motoneurons: Preclinical studies and clinical implications. *J Neurol Sci* 124 Suppl.:77-83.

Sendtner M, Gotz R, Holtmann B, Escary JL, Masu Y, Carroll P, Wolf E, Brem G, Brulet P, Thoenen H (1996) Cryptic physiological trophic support of

motoneurons by LIF revealed by double gene targeting of CNTF and LIF. *Curr Biol* 6:686-694.

Sendtner M, Götz R, Holtmann B, Thoenen H (1997) Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. *J Neurosci* 17:6999-7006.

Sendtner M, Schmalbruch H, Stockli 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.

Sendtner M, Stöckli KA, Thoenen H (1992c) Synthesis and location of ciliary neurotrophic factor in the rat sciatic nerve of the adult rat after lesion and during regeneration. *J Cell Biol* 118:139-148.

Shieh PB, Hu SC, Bobb K, Timmusk T, Ghosh A (1998) Identification of a signaling pathway involved in calcium regulation of BDNF expression. *Neuron* 20:727-740.

Siddique T, Nijhawan D, Hentati A (1996) Molecular genetic basis of familial ALS. *Neurology* 47(Suppl2):S27-S35.

Siegel SG, Patton B, English AW (2000) Ciliary neurotrophic factor is required for motoneuron sprouting. *Exp Neurol* 166:205-212.

Soppet D, Escandon E, Maragos J, Middlemas DS, Reid SW, Blair J, Burton LE, Stanton BR, Kaplan DR, Hunter T, . (1991) The neurotrophic factors brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 are ligands for the trkB tyrosine kinase receptor. *Cell* 65:895-903.

Squinto SP, Stitt TN, Aldrich TH, Davis S, Bianco SM, Radziejewski C, Glass DJ, Masiakowski P, Furth ME, Valenzuela DM, . (1991) trkB encodes a

functional receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 but not nerve growth factor. *Cell* 65:885-893.

Stahl N, Farruggella TJ, Boulton TG, Zhong Z, Darnell JEJ, Yancopoulos GD (1995) Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *SCI* 267:1349-1353.

Stankoff B, Aigrot MS, Noel F, Wattilliaux A, Zalc B, Lubetzki C (2002) Ciliary neurotrophic factor (CNTF) enhances myelin formation: a novel role for CNTF and CNTF-related molecules. *J Neurosci* 22:9221-9227.

Steljes TP, Kinoshita Y, Wheeler EF, Oppenheim RW, Von Bartheld CS (1999) Neurotrophic factor regulation of developing avian oculomotor neurons: differential effects of BDNF and GDNF. *J Neurobiol* 41:295-315.

Stephanou A, Isenberg DA, Akira S, Kishimoto T, Latchman DS (1998) The nuclear factor interleukin-6 (NF-IL6) and signal transducer and activator of transcription-3 (STAT-3) signalling pathways co-operate to mediate the activation of the hsp90beta gene by interleukin-6 but have opposite effects on its inducibility by heat shock. *Biochem J* 330:189-195.

Takeuchi H, Kobayashi Y, Yoshihara T, Niwa J, Doyu M, Ohtsuka K, Sobue G (2002) Hsp70 and Hsp40 improve neurite outgrowth and suppress intracytoplasmic aggregate formation in cultured neuronal cells expressing mutant SOD1. *Brain Res* 949:11-22.

Tan SA, Deglon N, Zurn AD, Baetge EE, Bamber B, Kato AC, Aebischer P (1996) Rescue of motoneurons from axotomy-induced cell death by polymer encapsulated cells genetically engineered to release CNTF. *Cell Transplant* 5:577-587.

Tansey MG, Baloh RH, Milbrandt J, Johnson EM, Jr. (2000) GFR α -mediated localization of RET to lipid rafts is required for effective downstream signaling, differentiation, and neuronal survival. *Neuron* 25:611-623.

Tao X, Finkbeiner S, Arnold DB, Shaywitz AJ, Greenberg ME (1998) Ca²⁺ influx regulates BDNF transcription by a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Neuron* 20:709-726.

Thoenen H, Sendtner M (2002) Neurotrophins: from enthusiastic expectations through sobering experiences to rational therapeutic approaches. *Nat Neurosci* 5 Suppl:1046-50.:1046-1050.

Tian G, Huang Y, Rommelaere H, Vandekerckhove J, Ampe C, Cowan NJ (1996) Pathway leading to correctly folded beta-tubulin. *Cell* 86:287-296.

Traynelis SF, Wahl P (1997) Control of rat GluR6 glutamate receptor open probability by protein kinase A and calcineurin. *J Physiol* 503:513-531.

Treanor JJ, Goodman L, de Sauvage F, Stone DM, Poulsen KT, Beck CD, Gray C, Armanini MP, Pollock RA, Hefti F, Phillips HS, Goddard A, Moore MW, Buj Bello A, Davies AM, Asai N, Takahashi M, Vandlen R, Henderson CE, Rosenthal A (1996) Characterization of a multicomponent receptor for GDNF. *Nature* 382:80-83.

Trojanowski JQ, Ishihara T, Higuchi M, Yoshiyama Y, Hong M, Zhang B, Forman MS, Zhukareva V, Lee VM (2002) Amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism dementia complex: transgenic mice provide insights into mechanisms underlying a common tauopathy in an ethnic minority on Guam. *Exp Neurol* 176:1-11.

Trupp M, Ryden M, Jornvall H, Funakoshi H, Timmusk T, Arenas E, Ibanez CF (1995) Peripheral expression and biological activities of GDNF, a new

neurotrophic factor for avian and mammalian peripheral neurons. *J Cell Biol* 130:137-148.

Tsui-Pierchala BA, Ginty DD (1999) Characterization of an NGF-P-TrkA retrograde-signaling complex and age-dependent regulation of TrkA phosphorylation in sympathetic neurons. *J Neurosci* 19:8207-8218.

Tsui-Pierchala BA, Milbrandt J, Johnson EM, Jr. (2002) NGF utilizes c-Ret via a novel GFL-independent, inter-RTK signaling mechanism to maintain the trophic status of mature sympathetic neurons. *Neuron* 33:261-273.

Uchida M, Enomoto A, Fukuda T, Kurokawa K, Maeda K, Kodama Y, Asai N, Hasegawa T, Shimono Y, Jijiwa M, Ichihara M, Murakumo Y, Takahashi M (2006) Dok-4 regulates GDNF-dependent neurite outgrowth through downstream activation of Rap1 and mitogen-activated protein kinase. *J Cell Sci* 119:3067-3077.

Vale RD, Shooter EM (1982) Alteration of binding properties and cytoskeletal attachment of nerve growth factor receptors in PC12 cells by wheat germ agglutinin. *J Cell Biol* 94:710-717.

Van Den BL, Van DP, Bogaert E, Robberecht W (2006) The role of excitotoxicity in the pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis. *Biochim Biophys Acta*.

Van Den BL, Vandenberghe W, Klaassen H, Van HE, Robberecht W (2000) Ca²⁺-permeable AMPA receptors and selective vulnerability of motor neurons. *J Neurol Sci* 180:29-34.

Voss OP, Milne S, Sharkey J, O'Neill MJ, McCulloch J (2006) Molecular mechanisms of neurite growth with AMPA receptor potentiation. *Neuropharmacology* ..

Wang CY, Yang F, He XP, Je HS, Zhou JZ, Eckermann K, Kawamura D, Feng L, Shen L, Lu B (2002) Regulation of neuromuscular synapse development by glial cell line-derived neurotrophic factor and neurturin. *J Biol Chem* 277:10614-10625.

Wang Y, Durkin JP (1995) alpha-Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid, but not N-methyl-D-aspartate, activates mitogen-activated protein kinase through G-protein beta gamma subunits in rat cortical neurons. *J Biol Chem* 270:22783-22787.

Wiese S, Metzger F, Holtmann B, Sendtner M (1999) Mechanical and excitotoxic lesion of motoneurons: effects of neurotrophins and ciliary neurotrophic factor on survival and regeneration. *Acta Neurochir Suppl (Wien)* 73:31-39.

Wilkins A, Majed H, Layfield R, Compston A, Chandran S (2003) Oligodendrocytes promote neuronal survival and axonal length by distinct intracellular mechanisms: a novel role for oligodendrocyte-derived glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* 23:4967-4974.

Wong V, Arriga R, Ip N, Lindsay RM (1993) The neurotrophins BDNF, NT-3 and NT-4/5, but not NGF, upregulate the cholinergic phenotype of developing motoneurons. *Europ J Neurosci* 5:466-474.

Yang LX, Nelson PG (2004) Glia cell line-derived neurotrophic factor regulates the distribution of acetylcholine receptors in mouse primary skeletal muscle cells. *Neuroscience* 128:497-509.

Yang Y, Hentati A, Deng HX, Dabbagh O, Sasaki T, Hirano M, Hung WY, Ouahchi K, Yan J, Azim AC, Cole N, Gascon G, Yagmour A, Ben Hamida M, Pericak-Vance M, Hentati F, Siddique T (2001) The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat Genet* 29:160-165.

Yano H, Chao MV (2004) Mechanisms of neurotrophin receptor vesicular transport. *J Neurobiol* 58:244-257.

Ye JH, Houle JD (1997) Treatment of the chronically injured spinal cord with neurotrophic factors can promote axonal regeneration from supraspinal neurons. *Exp Neurol* 143:70-81.

Zafra F, Hengerer B, Leibrock J, Thoenen H, Lindholm D (1990) Activity dependent regulation of BDNF and NGF mRNAs in the rat hippocampus is mediated by non-NMDA glutamate receptors. *EMBO J* 9:3545-3550.

Zhang J, Huang EJ (2006) Dynamic expression of neurotrophic factor receptors in postnatal spinal motoneurons and in mouse model of ALS. *J Neurobiol* 66:882-895.

Zhang Y, Moheban DB, Conway BR, Bhattacharyya A, Segal RA (2000) Cell surface Trk receptors mediate NGF-induced survival while internalized receptors regulate NGF-induced differentiation. *J Neurosci* 20:5671-5678.

Zhao Z, Alam S, Oppenheim RW, Prevetie DM, Evenson A, Parsadanian A (2004) Overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the CNS rescues motoneurons from programmed cell death and promotes their long-term survival following axotomy. *Exp Neurol* 190:356-372.

DANKSAGUNG

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. med. Michael Sendtner für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung aller für diese Arbeit erforderlichen Einrichtungen und Materialien des Instituts und vor allem für die exzellente persönliche Betreuung.

Als zweites gilt mein Dank natürlich PD Dr. Sybille Jablonka und auch Prof. Dr. Stefan Wiese, die mich gemeinsam vor allem während der ersten Jahre im Labor hervorragend betreut haben und mir in wissenschaftlichen und technischen Fragen stets zur Seite standen.

Prof. Dr. Moses Chao aus dem Skirball Institute for Biomolecular Medicine in New York (USA) danke ich für die freundliche Bereitstellung des p-TrkB Antikörpers.

Des Weiteren möchte ich mich besonders bei Dr. Bettina Holtmann und Helga Brünner für die Anpaarung, Betreuung und Fixierung der Mäuse danken, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Christine Schneider und Jennifer Rath sind hervorragende technische Assistentinnen, die mich in alle Geheimnisse der primären Motoneuronzellkultur eingeweiht haben. Sie standen mir immer mit Rat und Tat zur Seite und halfen mir bei der Herstellung der Gefrierschnitte sowie der Muskelzupfpräparate.

Und zuletzt gilt mein besonderer Dank den übrigen Doktoranden, insbesondere Florian Bender und Barbara Lechner, für die nette Atmosphäre im Labor und stetige Hilfsbereitschaft.

LEBENS LAUF

Saskia M. Pasedag

*22. Januar 1983 in Bocholt

Schule

1989 - 1993
1993 - 1998
1998 - 1999
1999 - 2001

Grundschule in Boca Raton (USA), Bocholt und Weilheim
Gymnasium in Weilheim i.OB.
Pattonville High School, Maryland Heights (USA)
High School Diploma summa cum laude (GPA 4.0)
German Swiss International School (Hong Kong)
Abitur (Reifeprüfung) Note: 1,0

Studium

10/01 - 03/04
03/04 - 01/07

Humanmedizin / Biomedizin an der
Julius-Maximilians Universität zu Würzburg
Vorklinischer Abschnitt
Ärztliche Vorprüfung (Physikum) März 2004
Klinischer Abschnitt
2. Ärztliche Prüfung Mai 2008 Note: 1,0

Praktisches Jahr

02/07 - 06/07
06/07 - 08/07
08/07 - 10/07
10/07 - 01/08

Humangenetik (Universität Würzburg)
Allgemeinchirurgie (Västerås, Universität Uppsala)
Traumachirurgie (Karolinska Universitätsklinikum, Stockholm)
Innere Medizin (Universitätsklinikum Würzburg)

Stipendium

2002 - 2008

Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes

Forschungsaufenthalt

02/05 - 04/05

Harvard Medical School
Molecular Pathology Unit, Prof. Dr. David Louis
Massachusetts General Hospital
Boston, USA

Klinische Praktika und Famulaturen

07/02 - 08/02
02/03 - 03/03
08/04
09/05 - 10/05
03/06 - 04/06
08/06

Pädiatrische Onkologie, Queen Mary Hospital (Hong Kong)
Innere Medizin, World Link Medical Centre (Shanghai)
Internistische Facharztpraxis Dr. Ertel (Weilheim i. OB)
Neurologie, BG Unfallklinik (Murnau)
Tropenmedizin und Pädiatrie, Bijilo Medical Center (Gambia)
Kinder - und Jugendarztpraxis (Weilheim i. OB)

Würzburg, den 1. Juni 2008

Saskia M. Pasedag