

**Aus dem Institut für Klinische Neurobiologie  
der Universität Würzburg**

**Vorstand: Professor Dr. med. M. Sendtner**

**Modulation des axonalen Wachstums primärer Motoneurone  
durch cAMP in einem Mausmodell für die Spinale  
Muskelatrophie**

**Inaugural - Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Barbara Dorothea Lechner**

**aus Benediktbeuern**

**Würzburg, März 2009**

## **Referentenblatt**

**Referent:** Prof. Dr. med. M. Sendtner

**Koreferentin:** Prof. Dr. med. E. Asan

**Dekan:** Prof. Dr. med. M. Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung:** 27. Oktober 2009

**Die Promovendin ist Ärztin**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Die Spinale Muskelatrophie (SMA)</b>	<b>1</b>
1.1.1	Inzidenz und Bedeutung	1
1.1.2	Klinik der Spinalen Muskelatrophie	1
1.1.3	Genetik der Spinalen Muskelatrophie	4
1.2	<b>Das Mausmodell</b>	<b>6</b>
1.3	<b>Funktion des SMN-Proteins</b>	<b>9</b>
1.4	<b>Fragestellung: Sind die zellulären Defizite bei der SMA im Mausmodell durch cAMP beeinflussbar?</b>	<b>11</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>13</b>
2.1	<b>Chemikalien und Lösungen, Herstellernachweis</b>	<b>13</b>
2.1.1	Chemikalien	13
2.1.2	Kulturmedien und Zusätze	15
2.1.3	Matrixproteine für die Zellkultur	15
2.1.4	Wachstumsfaktoren für die Zellkultur	15
2.1.5	In der Zellkultur verwendete Antibiotika	15
2.1.6	Enzymsysteme	16
2.1.7	Molekulargewichtsstandards	16
2.1.8	Antikörper	16
2.1.9	Primer	17
2.2	<b>Puffer und Lösungen für spezielle Methoden</b>	<b>17</b>
2.2.1	Zellkultur	17
2.2.2	Immunzytochemie	17
2.2.3	DNA-Isolierung	18
2.2.4	PCR und Gelelektrophorese	18
2.2.5	Protein-Isolierung	18
2.2.6	Western Blot	19
2.3	<b>Geräte und Verbrauchsmaterialien, Herstellernachweis</b>	<b>20</b>
2.4	<b>Software zur Datenanalyse</b>	<b>22</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

<b>2.5</b>	<b>Mausstämme</b>	<b>22</b>
<b>2.6</b>	<b>Motoneuron-Zellkultur</b>	<b>22</b>
2.6.1	Präparation	22
2.6.2	Lösung des Zellverbandes	23
2.6.3	Panning	23
2.6.4	Zellaussaat	23
<b>2.7</b>	<b>Immunzytochemie</b>	<b>24</b>
<b>2.8</b>	<b>Fluoreszenzmikroskopie</b>	<b>25</b>
<b>2.9</b>	<b>Auswertungen</b>	<b>25</b>
2.9.1	Längenmessungen	25
2.9.2	Wachstumskegelmessungen	25
2.9.3	Analyse der $\beta$ -Aktin-Verteilung	26
<b>2.10</b>	<b>Kultur Neuraler Stammzellen (NSC)</b>	<b>26</b>
2.10.1	Präparation	26
2.10.2	Lösung des Zellverbandes	26
2.10.3	Zellkultur	26
<b>2.11</b>	<b>Genotypisierung der Embryonen</b>	<b>27</b>
2.11.1	DNA-Isolation	27
2.11.2	Smn-PCR	27
2.11.3	SMN2-PCR	28
<b>2.12</b>	<b>Western Blot</b>	<b>29</b>
2.12.1	Aufbereitung der Protein-Extrakte aus den Zellen	29
2.12.2	Herstellung der Gele	29
2.12.3	Auftrennung der Proteine im Gel	30
2.12.4	Übertragung der Proteine auf Nitrozellulose	30
2.12.5	Auswertung	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>32</b>
<b>3.1</b>	<b>cAMP erhöht die SMN-Proteinexpression in primären Motoneuronen und Neurosphären bildenden Neuralen Vorläuferzellen (NSC)</b>	<b>32</b>
<b>3.2</b>	<b>cAMP normalisiert die Größe der Wachstumskegel in Smn-defizienten Motoneuronen, nicht aber die Axonlänge</b>	<b>34</b>

<b>3.3</b>	<b>Die axonale Fehlverteilung von <math>\beta</math>-Aktin in Smn-defizienten Motoneuronen wird durch cAMP behoben</b>	<b>37</b>
<b>3.4</b>	<b>cAMP kompensiert für das veränderte Wachstumsverhalten isolierter embryonaler Smn-defizienter Motoneurone auf der synapsenspezifischen Laminin-Isoform Laminin-221</b>	<b>39</b>
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>42</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>Bibliographie</b>	<b>51</b>
	<b>Danksagung</b>	
	<b>Lebenslauf</b>	

### Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

Abb., Abbildung

ALS, Amyotrophe Lateralsklerose

BDNF, brain derived neurotrophic factor

b-FGF, basic fibroblast growth factor

BSA, Bovines Serumalbumin

Ca<sup>++</sup>, Calcium-Ion

cAMP, cyclisches Adenosin-Monophosphat

Ca<sub>v</sub>2.2, Untereinheit 2.2 des spannungsabhängigen Calcium-Kanals

CBP, CREB binding protein

CK, Kreatinkinase

CNTF, ciliary derived neurotrophic factor

CRE, cAMP response element

CREB, cAMP response element binding

DMSO, Dimethylsulfoxid

DNA, Desoxyribonukleinsäure

EDTA, Ethylendiamintetraessigsäure

EGF, epidermal growth factor

EPAC, exchange protein directly activated by cAMP

ESE-site, exon splice enhancer site

F-Aktin, filamentöses Aktin; polymerisiertes G-Aktin

fw, forward

G-Aktin, globuläres Aktin

gems, gemini of coiled bodies

H<sub>2</sub>O, Wasser

HBSS, Hank`s balanced salt solution

HCl, Salzsäure

HeLa-Zellen, Zelllinie aus humanem Cervixkarzinom

HEPES, 2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure

hnRNP-R, heterogenous nuclear ribonucleoprotein R

kb, Kilobasen

KCl, Kaliumchlorid  
kD, Kilodalton  
MIM, Mendelian inheritance in Man; Datenbank der menschlichen Gene und genetischen Erkrankungen  
mRNA, messenger ribonucleic acid  
Na<sup>+</sup>, Natrium  
NaCl, Natriumchlorid  
NAIP, neuronal apoptosis inhibitory protein  
NT-3, Neurotrophin-3  
PBS, phosphate buffered saline  
PCR, polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion  
PFA, Paraformaldehyd  
pfn IIa, Profilin IIa  
PKA, Proteinkinase A  
PLS3, Plastin 3  
PORN, Poly-DL-Ornithin-Hydrobromid  
rev, reverse  
RNA, Ribonukleinsäure  
s. o., siehe oben  
s. u., siehe unten  
SDS, sodium-dodecyl-sulfate  
SEM, Standardfehler des Mittelwerts  
SMA, Spinale Muskelatrophie  
*SMN*, survival motor neuron-Gen, humanes  
*Smn*, survival motor neuron-Gen, murines  
SMN, survival motor neuron-Protein, humanes  
Smn, survival motor neuron-Protein, murines  
SMN $\Delta$ 7, trunkiertes SMN-Protein ohne Exon 7  
Tab., Tabelle  
TAE, Tris-acetat-EDTA  
TBS-T, Tris-buffered saline mit Tween  
Tris, Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

## Abkürzungsverzeichnis

---

U snRNP, Uridine-rich small nuclear ribonucleoprotein

VGCC, spannungsgesteuerter Calcium-Kanal

wt, Wildtyp



# 1 Einleitung

## 1.1 Die Spinale Muskelatrophie (SMA)

### 1.1.1 Inzidenz und Bedeutung

Die autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung des motorischen Systems bei Kindern wurde 1891 von Werdnig erstmals beschrieben.

Mit einer Inzidenz von 1:10.000 Lebendgeburten und einer Heterozygotenfrequenz von 1:40 – 1:60 ist sie nach der Cystischen Fibrose die zweithäufigste Krankheit mit autosomal-rezessivem Erbgang sowie die häufigste monogenetische Ursache für Tod im Kindesalter und eine wichtige Ursache für kindliche Morbidität aufgrund von Schwäche [Crawford and Pardo, 1996; Prior, 2007]. In Europa und Nordamerika stirbt Schätzungen zufolge jährlich etwa eines von 16.000 bis 25.000 Kindern an der schwersten Form der Erkrankung (Typ I), während etwa genauso viele an einer der leichteren Formen (Typ II oder Typ III) leiden. Die Spinale Muskelatrophie kommt weltweit vor.

### 1.1.2 Klinik der Spinalen Muskelatrophie

Die SMA gehört zur Gruppe der degenerativen Motoneuron-Erkrankungen, die sich durch Verlust des ersten Motoneurons (im präfrontalen Kortex) oder des zweiten Motoneurons (im Vorderhorn des Rückenmarks und eventuell in den motorischen Hirnnervenkernen) oder einer Kombination aus beiden Schädigungsmustern auszeichnen [James and Talbot, 2006].

Die Degeneration des ersten Motoneurons verursacht die Spastische Spinalparalyse mit dem Leitsymptom der fortschreitenden spastischen Lähmung. Ist das zweite Motoneuron betroffen, wie bei der SMA, so bildet sich eine schlaffe Lähmung der zugehörigen Muskeln aus. Die dritte Gruppe der Motoneuron-Erkrankungen, bei der sowohl erstes als auch zweites Motoneuron in den Krankheitsprozess einbezogen sind, führt zu kombinierten spastischen und schlaffen Lähmungssymptomen. Zu dieser Gruppe gehört die Amyotrophe Lateralsklerose (ALS), die sich im Gegensatz zur Spastischen Spinalparalyse

# 1 Einleitung

und zur SMA meist erst im Erwachsenenalter manifestiert [James and Talbot, 2006;Boillee et al., 2006;Figlewicz and Orrell, 2003].

Von der SMA betroffene Kinder zeigen eine zunehmende proximal betonte Muskelschwäche, die in den unteren Extremitäten ausgeprägter ist als in den oberen (myopathisches Verteilungsmuster) [Sumner, 2007]. Die Schwäche setzt subakut oder schleichend ein, es scheint, als würden die Patienten in der Entwicklung ihrer Muskelkraft stagnieren [Crawford and Pardo, 1996].

Nach dem Zeitpunkt der Manifestation und dem klinischen Krankheitsbild wird die SMA des Kindesalters in drei Typen unterteilt: Die SMA Typ I („Werdnig-Hoffmann“ oder „schwere infantile SMA“, MIM #253300) manifestiert sich meist vor dem dritten, immer aber vor dem sechsten Lebensmonat und nimmt klinisch die schwersten Verläufe. Die Patienten versterben meist vor Erreichen des zweiten Lebensjahres, die durchschnittliche Lebenserwartung beträgt 8 Monate. SMA Typ II („intermediäre SMA“, MIM #253550) ist durch mittelschwere klinische Verläufe mit einem Auftreten der Krankheit vor dem 18. Lebensmonat gekennzeichnet, wobei die Patienten nie das Laufen erlernen. Patienten mit SMA Typ III („Kugelberg-Welander“, MIM #253400) hingegen erkranken noch später, können sich aufrecht halten und erlernen definitionsgemäß regelrecht das Laufen (s. **Tab. 1**), ihre Lebenserwartung ist gering oder nicht

**Tabelle 1: Klassifikation und prognostische Parameter der autosomal rezessiven proximalen SMA, Daten nach Kaplan-Meier-Überlebenskurven auf der Basis von 445 Patienten [Zerres and Rudnik-Schoneborn, 1995].**

SMA Typ	Definition	Überlebenswahrscheinlichkeit nach Erkrankungsbeginn in %				
		2	4	10	20	40 Jahre
I	Sitzen nicht möglich	32	18	8	0	0
II	Sitzen erlernt, freies Gehen nicht möglich	100	100	98	77	..
SMA Typ	Definition	Wahrscheinlichkeit für den Erhalt der Gehfähigkeit nach Erkrankungsbeginn in %				
		2	4	10	20	40 Jahre
IIIa	Gehen möglich, Beginn < 3 Jahre	98	95	73	44	34
IIIb	Normale Entwicklung, Beginn 3 – 30 Jahre	100	100	97	89	67
IV	Beginn > 30 Jahre	(Daten nicht verfügbar)				

eingeschränkt. Daneben wird in der neueren Literatur ein Typ IV, die SMA des Erwachsenenalters (MIM #271150), definiert, mit einem Erkrankungsbeginn jenseits des 30. Lebensjahres und meist sehr milden und variablen Verläufen. Neben der klassischen proximalen Form der SMA existieren zahlreiche weitere Varianten mit unterschiedlichen genetischen Ursachen und Vererbungsmustern sowie unterschiedlicher klinischer Präsentation [Grohmann et al., 2004; Adams et al., 1998; La Spada et al., 1991; Harding et al., 1982; Reddel et al., 2008; Hall et al., 1982; Ramser et al., 2008] (**Tab. 2**).

Ursache der Muskelschwäche bei Patienten mit autosomal-rezessiver SMA ist eine selektive Degeneration von  $\alpha$ -Motoneuronen der Vorderhörner des Rückenmarks und des unteren Hirnstamms. Zusätzlich sind bei der schwersten SMA-Form, Typ I, auch sensorische Neurone betroffen, was sich in Zelldegenerationen in den Hinterwurzelganglien und im Hinterhorn und einer daraus resultierenden peripheren sensorischen Neuropathie äußert [Rudnik-Schoneborn et al., 2003; Jablonka et al., 2006].

In der elektrophysiologischen Untersuchung zeigen sich je nach Subtyp der

**Tabelle 2: Weitere Formen der SMA**

SMA Typ	Erbgang	Genlokus	Phänotyp/Symptome	Beginn
<b>SMARD-1 (SMA with respiratory distress) MIM # 604320</b>	autosomal-rezessiv	IGHMBP2; 11q13.2	distale Schwäche der unteren Extremität, Zwerchfellschwäche, auch sensorische und autonome Neurone betroffen	1-6 Monate
<b>X-chromosomale infantile SMA MIM # 301830</b>	gonosomal	UBE1; Xp11.3-q11.2	Arthrogryposis, Ateminsuffizienz, Skoliose, Thoraxdeformität, Verlust von Vorderhornzellen	Geburt
<b>SBMA (spinobulbäre Muskelatrophie, Kennedy-Syndrom) MIM # 313200</b>	gonosomal	Androgen-Rezeptor; Xq11.2-12	Proximale Muskelschwäche, Verlust von 2. Motoneuronen und Hinterwurzelganglienzellen, bulbäre Beteiligung	30-50 Jahre
<b>Distale SMA Typ V MIM # 600794</b>	autosomal-dominant	11q13, 7p15	Distale Muskeln betroffen, bilaterale Schwäche der Hände und oberen Extremität	12-36 Jahre
<b>Kongenitale SMA MIM % 600175</b>	autosomal-dominant	12q23-24	Arthrogryposis, nichtprogressive Schwäche der distalen unteren Extremität; einige Fälle mit Einbeziehung von Beckengürtel und trunkaler Muskulatur beschrieben	Geburt

Erkrankung Riesenpotentiale großer motorischer Einheiten (SMA Typ II und III), die durch ein Aussprossen überlebender Nerven zu verwaisten Muskelfasern zustande kommen, oder Fibrillationspotentiale akut denervierter Muskelfasern bei normal großen motorischen Einheiten (SMA Typ I) [Crawford and Pardo, 1996].

Die Diagnose der Spinalen Muskelatrophie wird aufgrund des klinischen Bildes, elektrophysiologischer Zeichen der akuten oder chronischen Denervierung und muskelbiptischer Befunde gestellt, die in chronischen Fällen eine gruppierte Faseratrophie mit Inseln hypertrophischer Fasern erkennen lassen [Lunn and Wang, 2008; Buchthal and Olsen, 1970]. Die Creatinkinase (CK) im Serum ist bei den Fällen mit frühem Erkrankungsbeginn (SMA I und II) allenfalls gering, bei SMA III jedoch oft bis zum Fünffachen der Norm erhöht [Rudnik-Schoneborn et al., 1998].

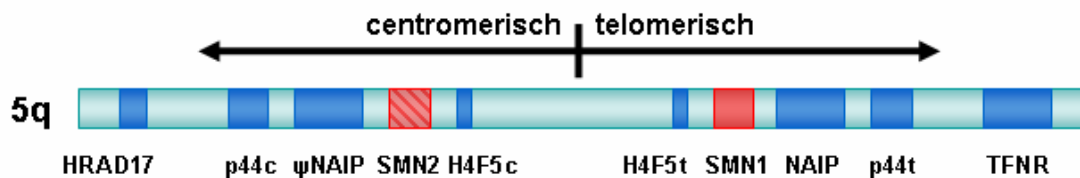
Bei typischer Befundkonstellation kann die Diagnose heute auch molekulargenetisch durch den Nachweis der homozygoten Deletion des *SMN1*-Gens (s. u.) durch Restriktionsenzym-Verdau ohne Biopsie gesichert werden [Prior, 2007]. Auch für die Präimplantations- und Pränataldiagnostik stehen inzwischen verschiedene Methoden zur Verfügung [Dreesen et al., 1998; Wu et al., 2005; Cobben et al., 1996].

### 1.1.3 Genetik der Spinalen Muskelatrophie

Lefebvre et al. beschrieben 1995 das *SMN*- (survival motor neuron) Gen in der kritischen Region auf Chromosom 5q12-q13, auf die die Mutationen bei Patienten mit SMA eingegrenzt worden waren. Das *SMN*-Gen hat eine Länge von circa 20 kb und besteht aus 9 Exons, von denen das zweite in die Abschnitte 2a und 2b unterteilt wird, so dass das letzte Exon mit der Ziffer 8 gezählt wird [Burglen et al., 1996].

Die etwa 500 kb großen duplizierte Region des Chromosoms 5, in der sich das *SMN*-Gen befindet, ist ungewöhnlich instabil, was ein Grund für das weltweite Vorkommen der Erkrankung und die relativ hohe Zahl an Neumutationen (etwa 10% aller Fälle) sein könnte [Crawford and Pardo, 1996; Lefebvre et al., 1998; Chen et al., 1998].

Die duplizierten Stränge stoßen gegenläufig direkt aneinander und kodieren somit für zwei Versionen des *SMN*-Gens, eine telomerische, die *SMN1* genannt wird, und eine zentromerische, die als *SMN2* bezeichnet wird (**Abb. 1**).



**Abbildung 1: Die SMN-Region auf Chromosom 5q13 [Wirth, 2000]**

Das *SMN*-Gen ist Teil einer duplizierten Genregion und liegt daher in zwei Versionen vor, einer telomerischen, die als *SMN1* (rot), und einer zentromerischen, die als *SMN2* (rot gestreift) bezeichnet wird. Die beiden gegenläufigen Versionen unterscheiden sich in fünf einzelnen Nukleotiden. Neben dem *SMN*-Gen finden sich in dieser Region die drei weiteren duplizierten Gene NAIP, H4F5 sowie p44, in denen bei einigen Patienten mit SMA Mutationen nachgewiesen werden können.

Ursache der Erkrankung ist bei 95-96% der Patienten der homozygote Verlust des in der telomerischen Region gelegenen *SMN1*-Gens [Lefebvre et al., 1995]. In seltenen Fällen liegen subtilere Mutationen wie Nonsense-, Frameshift- oder Missense-Mutationen, Deletionen, Inversionen oder Splice-site-Mutationen zugrunde [Wirth, 2000].

Daneben konnten mindestens drei weitere bei SMA-Patienten häufig mutierte Gene in derselben Region identifiziert werden: das NAIP- (neuronal apoptosis inhibitory protein) Gen [Roy et al., 1995], das p44-Gen, das für eine Untereinheit des Transkriptionsfaktors TFIIH kodiert [Burglen et al., 1997], sowie das H4F5-Gen [Scharf et al., 1998]. Da Mutationen dieser Gene jedoch auch in Gesunden zu finden sind, wird für sie insbesondere eine Rolle als Modifikatoren des Ausprägungsgrades der Erkrankung diskutiert.

Das *SMN2*-Gen unterscheidet sich neben seiner inversen Basensequenz durch fünf Einzelnukleotid-Austausche (Polymorphismen) vom *SMN1*-Gen. Vier davon liegen in Introns bzw. in der 3'-untranslatierten Region und scheinen keine funktionelle Auswirkung zu haben. Der fünfte, ein Austausch von Cytosin gegen Thymin (C-T-Transition), befindet sich in einem Exon Splice Enhancer Binding

## 1 Einleitung

---

Site (ESE-site) in Codon 280 (Exon 7) und verursacht einen differenziellen Splicevorgang, durch den Exon 7 bei etwa 90% der *SMN2*-Genprodukte fehlt (*SMN $\Delta$ 7*-Protein). Diese am C-Terminus um 16 Aminosäuren verkürzten Proteine sind instabil und nicht in der Lage, bei Vorliegen einer homozygoten Mutation des *SMN1*-Gens dessen Verlust zu kompensieren, was das klinische Bild der SMA verursacht [Monani et al., 1999;Lorson et al., 1999].

Etwa 10% der *SMN2*-Transkripte haben jedoch die volle Länge und sind funktionsfähig, so dass Patienten mit mehreren *SMN2*-Kopien im Genom eine mildere klinische Ausprägung des Krankheitsbildes (Typ II bzw. III) erfahren, wie genetische Studien in betroffenen Familien zeigen konnten [Lefebvre et al., 1998;Wirth et al., 2006b;Mailman et al., 2002].

Homozygote Deletionen des *SMN2*-Gens können bei etwa 3-5% der gesunden Bevölkerung nachgewiesen werden und haben keine klinische Relevanz [Lefebvre et al., 1995]

### 1.2 Das Mausmodell

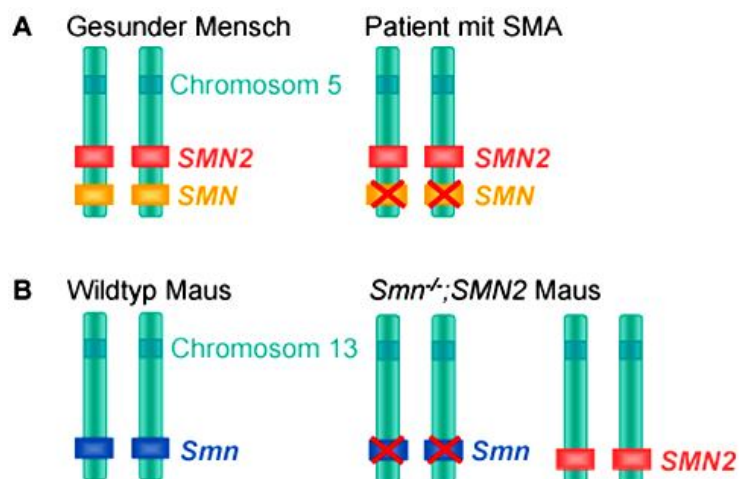
Menschen und Primaten besitzen zwei Kopien des *SMN*-Gens, von denen eine telomerisch (*SMN1*) und eine zentromerisch (*SMN2*) gelegen ist, und die sich u.a. in der oben beschriebenen Punktmutation in Exon 7 unterscheiden.

Bei der Maus, die nur ein *Smn*-Gen auf Chromosom 13 besitzt, ist der homozygote Knock-out des *Smn*-Gens letal; die Embryonen sterben noch vor der Implantation in das Uterusgewebe im frühen Blastozystenstadium ab, sobald das *Smn*-Protein aus der mütterlichen Eizelle aufgebraucht ist [Schrank et al., 1997].

Mäuse, die *Smn* heterozygot exprimieren (*Smn*<sup>+/-</sup>), zeigen einen postnatalen selektiven Untergang von  $\alpha$ -Motoneuronen, der einer milden SMA-Form ähnelt. In allen Geweben dieser Mäuse, auch im Rückenmark, ist das *Smn*-Protein um ca. 50% reduziert, phänotypisch sind sie jedoch unauffällig [Jablonka et al., 2000]. Um ein Mausmodell für die Spinale Muskelatrophie zu generieren, ist es deshalb notwendig, das humane *SMN2*-Gen in das Mausgenom zu integrieren und diese *SMN2* exprimierenden Mäuse mit *Smn*<sup>+/-</sup> - Tieren zu verkreuzen

[Monani et al., 2000]. In zweiter Generation (F2) ergeben sich dann durch Kreuzung der so entstandenen  $Smn^{+/-}; SMN2$  – Tiere untereinander nach Mendel'schem Erbgang die Genotypen  $Smn^{+/+}; SMN2$ ,  $Smn^{+/-}; SMN2$  und  $Smn^{-/-}; SMN2$  im Verhältnis 1:2:1. Mäuse mit dem Genotyp  $Smn^{-/-}; SMN2$  haben also eine dem menschlichen SMA-Patienten vergleichbare genetische Ausstattung mit vorhandenem (transgenem)  $SMN2$ -Gen bei fehlendem  $SMN1$ - (bzw.  $Smn$ -) Gen (**Abb. 2**).

Das Krankheitsbild von  $Smn^{-/-}; SMN2$ -Mäusen variiert analog zum Menschen je nach Anzahl der  $SMN2$ -Kopien. Tiere mit nur zwei bis drei  $SMN2$ -Kopien im Genom zeigen typische Merkmale der Muskelatrophie wie verminderte (Spontan-) Motorik, Atrophie der Interkostalmuskulatur, Saugschwäche und dadurch geringeres Körpergewicht und Gedeihstörung. Zum Zeitpunkt der Geburt weisen sie eine normale Anzahl an Vorderhornzellen im Rückenmark auf, die sich bis zum fünften postnatalen Tag, parallel zur Entwicklung des Phänotyps, um ca. 35% reduziert. Sie sterben postnatal zwischen Tag 6 und Tag 8 und stellen somit ein Modell für die schwerwiegende SMA Typ I dar,



**Abbildung 2: Schema zur Genetik der SMA beim Menschen im Vergleich zum Mausmodell.**

**A** Gesunde Menschen tragen auf Chromosom 5q13 sowohl das  $SMN1$ - als auch das  $SMN2$ -Gen. Der Verlust des  $SMN$ -Gens verursacht die SMA.

**B** Mäuse haben nur ein  $Smn$ -Gen auf Chromosom 13, dessen Knock-out früh embryonal letal ist. Durch Einbringen des  $SMN2$ -Gens in das Maus-Genom kann der  $Smn$ -Knock-out überlebt werden; die  $Smn^{-/-}; SMN2$ -Mäuse haben den gleichen Genotyp wie an SMA erkrankte Menschen, zeigen einen ähnlichen Phänotyp und dienen daher als Modell für die Erkrankung.

## 1 Einleitung

---

wohingegen die Lebensdauer von Tieren mit einer hohen Anzahl an Kopien (mindestens 8 Kopien) derjenigen von gesunden Kontrollmäusen vergleichbar ist [Monani et al., 2000; Jablonka et al., 2004]. Es liegt hier somit ein klassischer Gen-Dosis-Effekt vor; je mehr Smn-Protein verfügbar ist, desto geringer wird der Phänotyp ausgeprägt.

Die Pathologie der SMA im Mausmodell zeigt auch auf Ebene der Zellkultur primärer Motoneurone aus dem Rückenmark von *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*-Embryonen charakteristische morphologische Korrelate. Hierfür werden am Embryonaltag 14 die Motoneurone aus dem Rückenmark mit Hilfe eines Motoneuron-spezifischen Antikörpers gegen den niederaffinen Neurotrophinrezeptor p75 isoliert und auf einer Matrix aus Laminin, einem Strukturprotein der Basallamina, kultiviert.

Im Vergleich zu „gesunden“ Motoneuronen zeigen Smn-defiziente (*Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*) Motoneurone charakteristische Veränderungen des axonalen Wachstums: Werden sie auf einer Matrix aus Laminin-111, einem Bestandteil der extrazellulären Matrix vieler Gewebe, kultiviert, so sind ihre Wachstumskegel, distale axonale Auftreibungen, die eine essentielle Rolle beim Auswachsen des Axons sowie der präsynaptischen Differenzierung spielen, verkleinert, die Axone dementsprechend verkürzt. Gleichzeitig besteht in den distalen Anteilen und Wachstumskegeln der Axone von Smn-defizienten Motoneuronen ein Mangel an  $\beta$ -Aktin, einem Zytoskelettprotein, das insbesondere am Aufbau und der Fortbewegung der Wachstumskegel beteiligt ist [Rossoll et al., 2003; Jablonka et al., 2004]. Es stellt ein wichtiges Strukturelement für die Anordnung von Transmembranproteinen der Präsynapse dar und spielt als solches auch eine zentrale Rolle bei der Freisetzung von Transmittersubstanzen aus Vesikel-Strukturen der präsynaptischen Membran [Luo, 2002; Doussau and Augustine, 2000].

Das Überleben der Smn-defizienten Motoneurone ist dabei nicht beeinträchtigt [Rossoll et al., 2003].

Aktuelle Studien konnten zeigen, dass das Längendefizit kultivierter Smn-defizienter Motoneurone in vivo im Mausmodell nicht nachweisbar ist, die Axonbildung und das axonale Wachstum erscheinen normal. Jedoch ist



postnatal eine erhöhte Anzahl verwaister motorischer Endplatten ohne Axonkontakt erkennbar, die einen Hinweis auf eine embryonal stattfindende Denervierung darstellen, die möglicherweise auf einer synaptischen Entwicklungsstörung beruht [Kariya et al., 2008;McGovern et al., 2008].

### 1.3 Funktion des SMN-Proteins

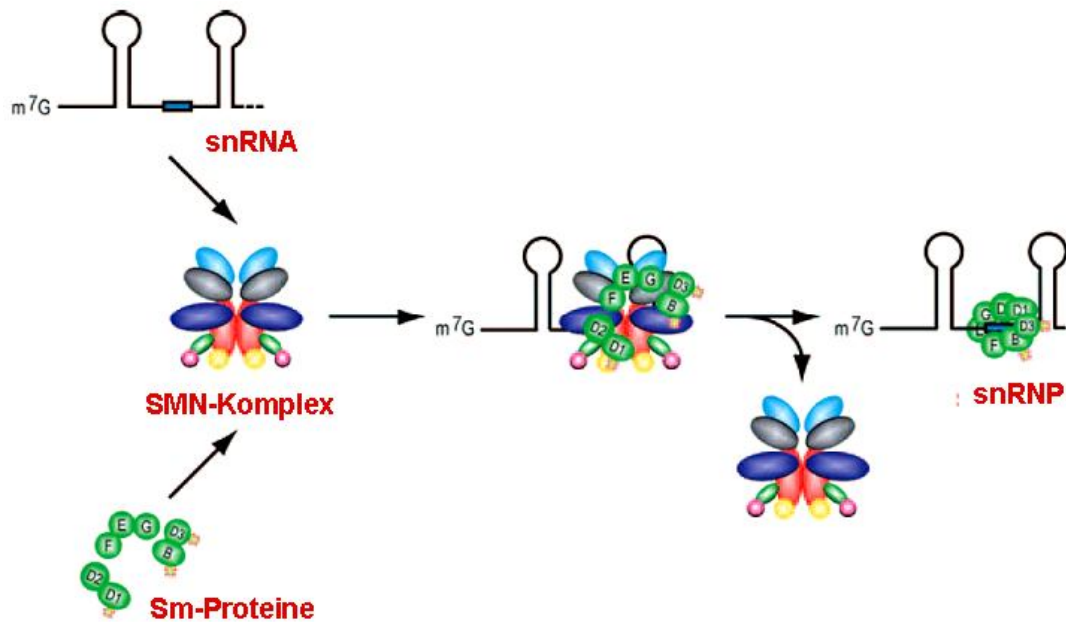
Das SMN-Protein, das aus 294 Aminosäuren besteht und ein Molekulargewicht von 38kD aufweist, wird ubiquitär, aber gewebsabhängig in unterschiedlichen Mengen exprimiert. Besonders reichlich findet es sich in spinalen Motoneuronen. Den höchsten Gehalt an SMN-Protein hat embryonales Gewebe; im Laufe der Entwicklung nimmt die Proteinmenge auch im Rückenmark kontinuierlich ab [Jablonka et al., 2000;Battaglia et al., 1997;Germain-Desprez et al., 2001].

Innerhalb der Zelle ist das SMN-Protein sowohl im Zytoplasma als auch im Zellkern lokalisiert, wo es mit spezifischen Strukturen, den gems (gemini of coiled bodies) assoziiert, die in direkter Nachbarschaft der coiled (Cajal-) bodies liegen [Young et al., 2000]. Es liegt hierbei als Dimer vor und bildet als solches das Zentrum des SMN-Komplexes, der aus dem SMN-Dimer und den weiteren Komponenten Gemin2 – 8 besteht [Carissimi et al., 2006;Gubitz et al., 2004;Carissimi et al., 2005]. Der SMN-Komplex wiederum interagiert mit den so genannten Sm-Proteinen, Komponenten der small nuclear ribonucleoproteins (U snRNPs), die beim Aufbau des spliceosomalen Komplexes und somit bei der Prozessierung von mRNA eine zentrale Rolle spielen [Gubitz et al., 2004]. Der SMN-Komplex sorgt hierbei für die korrekte Kombination von Protein- und RNA-Komponenten und für den Transport der snRNPs in den Zellkern. [Kolb et al., 2007;Fischer et al., 1997] (**Abb. 3**).

Da diese Funktion jedoch im Stoffwechsel nahezu jeder Körperzelle benötigt wird, kann sie bislang nur ungenügend den selektiven Untergang von Motoneuronen bei der SMA erklären. Einen Schritt zur Aufklärung des Pathomechanismus der SMA lieferte die Erkenntnis, dass ein weiterer Bindungspartner des SMN-Proteins, hnRNP-R, mit SMN in Axonen und

## 1 Einleitung

---



**Abbildung 3: Funktion des SMN-Komplexes beim Aufbau der small nuclear ribonucleoproteins (snRNPs)** (nach [Kolb et al., 2007]).

U snRNAs werden aus dem Zellkern ins Zytoplasma transportiert und treffen dort auf die Sm-Proteine. Der SMN-Komplex aus SMN (rot) und Gemin2-8 unterstützt die Bildung der ringartigen Sm-core-Partikel aus Sm-Proteinen und ihre korrekte Assoziation mit den snRNAs. Der SMN-Komplex bleibt anschließend mit den snRNPs verbunden, bis der Rücktransport in den Zellkern erfolgt ist.

Wachstumskegeln kolokalisiert und seinerseits in der Lage ist,  $\beta$ -Aktin-mRNA zu binden [Rossoll et al., 2002].

Da  $\beta$ -Aktin-mRNA und -Protein in distalen Axonen und Wachstumskegeln von Smn-defizienten Motoneuronen im Vergleich zu wildtypischen Zellen vermindert sind [Rossoll et al., 2003] und hnRNP-R zwar SMN-Protein, aber kein SMN $\Delta$ 7-Protein bindet [Rossoll et al., 2002], liegt die Vermutung nahe, dass der Spinalen Muskelatrophie ein axonaler Transportdefekt zugrunde liegt, der unter anderem die  $\beta$ -Aktin-mRNA betrifft.

Daneben wurden verschiedene weitere potentielle Interaktionspartner von SMN in Motoneuronen identifiziert, unter anderem die neuronenspezifische Profilin-Isoform IIa (pfn IIa), die als Aktin-bindendes Protein an der Regulation der Aktin-Dynamik beteiligt ist [Giesemann et al., 1999]. Mit Plastin 3 (PLS3), einem Protein, das in vitro in Motoneuronen mit SMN kolokalisiert und F-Aktin stabilisiert, konnte erst kürzlich ein Faktor identifiziert werden, der bei

weiblichen Individuen mit *SMN1*-Deletion den Ausbruch der Erkrankung verhindern kann [Oprea et al., 2008].

#### 1.4 Fragestellung: Sind die zellulären Defizite bei der SMA im Mausmodell durch cAMP beeinflussbar?

Aufgrund der an Patienten und SMA-Mäusen gemachten Beobachtung, dass die Anzahl der *SMN2*-Kopien den Schweregrad der Erkrankung modifizieren kann (s. o.), liegt es nahe, die Hochregulierung der Expression des in jedem Patienten vorhandenen *SMN2*-Gens als mögliche therapeutische Option in Betracht zu ziehen. Hierzu kann an verschiedenen molekulargenetischen Regulationsmechanismen angegriffen werden; aktuelle Forschungen konzentrieren sich vor allem auf die Korrektur des Splicing-Vorganges, der zum *SMN $\Delta$ 7*-Protein führt, sowie die Hochregulierung der *SMN2*-Expression durch Histon-Deacetylase-Inhibitoren wie Valproinsäure oder Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA). Daher stellte sich die Frage, ob eine Stimulation der *Smn/SMN2* Transkription die beschriebenen Defekte isolierter *Smn*-defizienter Motoneurone beheben kann.

Die vorliegende Arbeit baut auf der Entdeckung eines cAMP response-Elements (CRE) im Promotor des *SMN/SMN2*-Gens auf [Majumder et al., 2004]. Durch eine Erhöhung des intrazellulären second-messengers cAMP soll die Proteinkinase A (PKA) vermehrt aktiviert werden, was zu ihrer Dissoziation in katalytische (C) und regulatorische (R) Untereinheiten führt. Die katalytische Einheit diffundiert in den Zellkern, wo sie das cAMP-response-element binding protein (CREB) im Promotor des Zielgens (hier: *SMN2*) phosphoryliert und dadurch die Transkription des Gens durch Rekrutierung von CREB binding protein (CBP) fördert [Mayr and Montminy, 2001] (**Abb. 4**).

Daneben ist bekannt, dass cAMP auch direkt über verschiedene Signalwege durch eine generelle neuronale Aktivierung zu einer vermehrten lokalen Transkription von  $\beta$ -Aktin in Axonterminalen sowie zu einem verstärkten axonalen Wachstum führen kann, und dass die Anhebung der intrazellulären

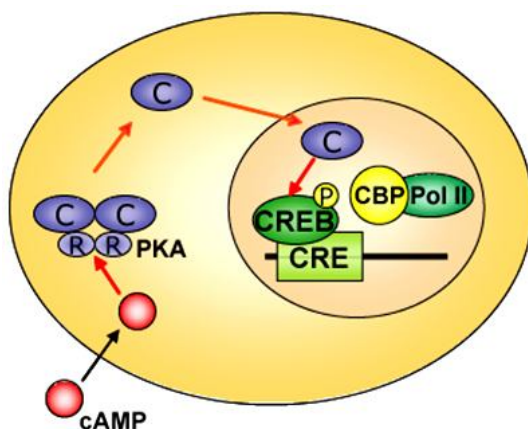
## 1 Einleitung

---

cAMP-Level das Überleben von Motoneuronen unabhängig von weiteren Wachstumsfaktoren fördert [Bassell et al., 1998; Hanson, Jr. et al., 1998].

Ein positiver Effekt von cAMP auf die SMN-Proteinmenge konnte bisher bereits in primären Hepatozyten SMN2-transgener Mäuse, in Fibroblasten von SMA Typ I – Mäusen und –Patienten sowie in HeLa-Zellen gezeigt werden [Majumder et al., 2004].

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, zu überprüfen, ob dieser positive Effekt von cAMP auch in primären isolierten Motoneuronen Smn-defizienter Mäuse nachweisbar ist, und ob eine Stimulation der SMN-Proteinexpression die beschriebenen morphologischen und funktionelle Defekte, insbesondere des axonalen Wachstums und der axonalen  $\beta$ -Aktin-Verteilung, kompensiert.



**Abbildung 4: Aktivierung der Transkription eines Zielgens über cAMP und CREB.**

cAMP diffundiert in die Zelle und aktiviert dort PKA; diese dissoziiert in eine katalytische (C) und eine regulatorische (R) Untereinheit. C phosphoryliert im Zellkern CREB, das daraufhin an CRE im Promotor des Zielgens bindet; der entstehende Komplex rekrutiert CBP und die DNA-Polymerase II. (Modifiziert nach [Mayr and Montminy, 2001].

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Lösungen, Herstellernachweis

#### 2.1.1 Chemikalien

Wo nicht abweichend angegeben, erfolgte der Bezug der Materialien aus Deutschland.

Aceton	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Acrylamid 40% /Bis Solution, 37.5:1	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
Agarose	Invitrogen, Paisley, Schottland, UK
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Aqua ad iniectabilia	DeltaSelect GmbH, Dreieich
Betain	Sigma-Aldrich Deutschland
Bradford-Lösung (Bio-Rad Protein-Assay)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Bromophenolblau	Sigma-Aldrich Deutschland
BSA (bovine serum albumine)	Sigma-Aldrich Deutschland
Butanol	Merck, Darmstadt
cAMP (8-CPT-cAMP, Sodium Salt)	Calbiochem®, Merck, Darmstadt
Chloroform	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Complete® Mini EDTA free Proteinase Inhibitor Cocktail Tablets	Roche Diagnostics, Mannheim
p-Coumarsäure	Sigma-Aldrich Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich Deutschland
EDTA (pH 8.0)	Sigma-Aldrich Deutschland
Essigsäure, glacial	Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Niederlande
Ethanol	Merck, Darmstadt

## 2 Material und Methoden

---

Ethidiumbromid 1% in H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Glycerin ROTIPURAN <sup>®</sup>	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Sigma-Aldrich Deutschland
Hepes	Sigma-Aldrich Deutschland
KCl	Merck, Darmstadt
Luminol	Sigma-Aldrich Deutschland
2-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Milchpulver, Blotting grade	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Mowiol	Sigma-Aldrich Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumdesoxycholate	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Na <sup>+</sup> -Pyrophosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Nonidet P-40/IGEPAL	Sigma-Aldrich Deutschland
PFA (Paraformaldehyd) 4%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ponceau-Rot Färbelösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
PORN (Poly-DL-Ornithin-Hydrobromid)	Sigma-Aldrich Deutschland
Sodium-dodecyl-Sulfat (SDS)	Sigma-Aldrich Deutschland
TEMED <sup>®</sup>	GIBCO, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Tris-base (pH8)	Merck, Darmstadt
Tris-HCl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma-Aldrich Deutschland
Tween-20 (polyoxyethylene-sorbitane- monolaurate)	Sigma-Aldrich Deutschland
Xylencyanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

### 2.1.2 Kulturmedien und Zusätze

Neurobasal™	GIBCO, Invitrogen Corporation, Karlsruhe
Horse Serum	Linaris, Wertheim-Bettingen
B27-Supplement (50x)	Invitrogen, Karlsruhe
GlutaMAX™-I Supplement	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.1.3 Matrixproteine für die Zellkultur

Laminin-111	Max-Planck-Institut für Psychiatrie, Martinsried
Purified Human Merosin (Laminin-221)	Chemicon Europe

### 2.1.4 Wachstumsfaktoren für die Zellkultur

BDNF (brain derived neurotrophic factor)	Chemicon Europe
CNTF (ciliary derived neurotrophic factor)	Institut für Klinische Neurobiologie Würzburg
b-FGF (basic fibroblast growth factor)	Cell Concepts, Umkirch
EGF (epidermal growth factor)	Cell Concepts, Umkirch

### 2.1.5 In der Zellkultur verwendete Antibiotika

Penicillin (5000 IE/ml)-Streptomycin (5000 µg/ml)-Lösung	Invitrogen, Karlsruhe
---	-----------------------

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1.6 Enzymsysteme

Proteinase K (20 mg/ml), rekombinant	Roche Diagnostics, Mannheim
Trypsin 1%	Sigma-Aldrich Deutschland
Trypsin-Inhibitor (egg yolk sack)	Sigma-Aldrich Deutschland
Taq-Polymerase	GeneCraft Deutschland

### 2.1.7 Molekulargewichtsstandards

GeneRuler Prestained DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder Plus	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

### 2.1.8 Antikörper

anti- $\beta$ -Aktin, monoklonal, Maus IgG1	Abcam, UK
anti- $\beta$ -III-Tubulin IgG	Institut für Klinische Neurobiologie, Würzburg
anti-Islet I/II, monoklonal, Maus IgG	
anti-p75 NGF Receptor, monoklonal, Maus IgG1 [ME20.4]	Abcam, UK
anti-tau, polyklonal, Kaninchen IgG	Sigma-Aldrich Deutschland
anti-SMN, monoklonal, Maus IgG1	BD Biosciences, Heidelberg
Cy2 conjugated anti-mouse IgG	Dianova, Hamburg
Cy2 conjugated anti-rabbit IgG	Dianova, Hamburg
Cy3 conjugated anti-mouse IgG	Dianova, Hamburg
Cy3 conjugated anti-rabbit IgG	Dianova, Hamburg
Horse-radish-Peroxidase (HRP) conjugated anti-mouse IgG	Roche Diagnostics, Mannheim



### 2.1.9 Primer

*Smn/LacZ* fw (GMS11): 5' – GGC CTG GAA TTC AAT ATG CTA GAC TGG CG

*Smn* rev (MSMN11): 5' – GTT TCA AAG GAG TTG TGG CAT TCT TC

*LacZ* rev (GNA3ab): 5' – CAA GGC GAT TAA GTT GGA TAA CG

*SMN2* fw (Exon 5): 5' – CCA CTT ACT ATC ATG CTG GGC TG

*SMN2* rev (Exon 8): 5' – CTA CAA CAC CCT TCT CAC AGG CC

(alle bezogen über Invitrogen, Karlsruhe).

## 2.2 Puffer und Lösungen für spezielle Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Boratpuffer (pH 8.35)	0.15 M Borsäure
HBSS (Hank`s balanced salt solution)	bezogen von LINARIS, Wertheim
PBS (pH 7.4)	bezogen von LINARIS, Wertheim
Trypsin-Inhibitor	20 mM HEPES in HBSS

### 2.2.2 Immunzytochemie

10x TBS-T (Tris-buffered saline mit Tween)	200 mM Tris-base (pH 8) 8% NaCl 1% Tween-20
Mowiol-Lösung	10 g Mowiol 40 ml PBS (pH 8.0) 20 ml Glycerin, wasserfrei (24 Stunden bei 60 °C rühren)

## 2 Material und Methoden

---

### 2.2.3 DNA-Isolierung

Lysispuffer (pH 7.4)	10 mM Tris HCl 100 mM EDTA 150 mM NaCl 0.5% SDS
----------------------	--

### 2.2.4 PCR und Gelelektrophorese

dNTP-Mix	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
----------	-----------------------------

Elektrophoresepuffer (1x TAE)	40 mM Tris base 20 mM Eisessigsäure 1 mM EDTA
-------------------------------	---

6x Ladepuffer	1x TAE mit 30% Glycerin Xylencyanol und Bromophenolblau als Farbstoffe
---------------	---

### 2.2.5 Protein-Isolierung

RIPA- (Radioimmunoprecipitation-) Puffer	50 mM Tris pH 7.5 150 mM NaCl 1% Nonidet P-40 0.5% Natriumdesoxycholate 0.1% SDS (+ Proteaseinhibitor Complete <sup>®</sup> )
--	--

Bio-Rad protein assay kit	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA
---------------------------	--

### 2.2.6 Western Blot

2x Sample Buffer (Laemmli-Puffer)	125 mM Tris pH 6.8 4% SDS 10% $\beta$ -Mercaptoethanol 20% Glycerol 0.004% Bromophenolblau
4x Upper Buffer	0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 0.4% SDS
4x Lower Buffer	1.5 M Tris-base (pH 8.7) 0.4% SDS
5x SDS-Laufpuffer	1.25 M Tris-base (pH 8.7) 1.25 M Glycin 0.02% SDS
Blotting Buffer (pH 8.3)	25 mM Tris-base 150 mM Glycin 10% Methanol
Chemilumineszenz- (ECL-) Reagenzien:	
Lösung A	0.1 M Tris (pH 8.3) 0.4 mM p-Coumarsäure (in DMSO) 2.5 mM Luminol (in DMSO)
Lösung B	0.1 M Tris (pH 8.3) 0.02% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

## 2 Material und Methoden

---

### 2.3 Geräte und Verbrauchsmaterialien, Herstellernachweis

Wo nicht abweichend angegeben, wurden die genannten Geräte in Deutschland bezogen.

Analysenwaage MP-3000	CHYO, bezogen über Hartenstein GmbH, Würzburg
Blotter EBU-4000	C.B.S. Scientific Co. , CA, USA
Coverslips Glas, Ø 10mm	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
Desinfektionsmittel für Medizinprodukte und Flächen Terralin <sup>®</sup> Liquid	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Filme FUJI Medical X-Ray Film Super RX, 100 NIF	FUJIFILM, bezogen über Hartenstein GmbH, Würzburg
Gefrierschrank, -20 °C	Liebherr Hausgeräte, Ochsenhausen
Gelelektrophoresekammer PerfectBlue Gelsystem Maxi M	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Elektrophorese-Trennkammer Mini Protean <sup>®</sup> (für Western Blot)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Hände-Desinfektionsmittel Sterilium <sup>®</sup>	BODE CHEMIE, Hamburg
Handschuhe SAFESKIN PFE	Kimberly-Clark, Zaventem, Belgien
Inkubator US AutoFlow CO <sub>2</sub>	NuAire (USA) über Integra Biosciences GmbH, Fernwald
Konfokales Mikroskop Leica TCS 4D	Leica Mikrosysteme, Bensheim
Kühlschrank, 4 °C	Handelsübliche Modelle
Kunststoff-Reagenzgefäße Multiply µStrip 0.2 ml Kette	Sarstedt, Nümbrecht
Kunststoff-Reagenzgefäße Safe-Lock Tubes 1.5 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Kunststoff-Reagenzgefäße Safe-Lock Tubes 2.0 ml	Eppendorf AG, Hamburg

Kunststoff-Röhrchen mit Schraubverschluss 15 und 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen
Messpipetten SILBERBRAND®	Brand GmbH + Co. KG, Wertheim
Monovetten für Photometer	Sarstedt, Nümbrecht
Netzgerät Electrophoresis Power Supply EPS 200	Amersham Pharmacia Biotech / GE Healthcare Europe, München
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel
Objektträger	R. Langenbrinck, Emmendingen
PCR-Cycler Mastercycler	Eppendorf AG, Hamburg
Phasenkontrastmikroskop Leica DM IRB	Leica Mikrosysteme, Bensheim
Photometer BioPhotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe Accu-jet	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
Pipetten 2, 20, 200 und 1000 µl	Gilson International
Pipettenspitzen, Plastik 2, 20, 200 und 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht
Schüttler Thermomixer comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Sterilbank Heraeus LaminAir	Kendro / Heraeus Instruments, Hanau
Vortexer L 46	GLW, Würzburg
Whartman-Papier 190 g/m <sup>2</sup>	Schleicher & Schuell MicroScience GmbH, Dassel
Zellkulturflaschen 25 und 75 cm <sup>2</sup>	Sarstedt, Newton, USA
Zellkulturschalen Ø 35mm Falcon™ Easy Grip™	BD Biosciences, Heidelberg
Zellkulturschalen 24-well Nunclon™ Surface	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Zellkulturschalen 4-well Ø 35 mm	Greiner bio-one, Frickenhausen

## 2 Material und Methoden

---

Zentrifugen	miniSpin	Eppendorf AG, Hamburg
	Biofuge® fresco	Kendo / Heraeus Instruments, Hanau
	Centrifuge 5804 R	Eppendorf AG, Hamburg

### 2.4 Software zur Datenanalyse

AIDA ImageAnalyzer V. 3.50	Raytest, Straubenhardt, Deutschland
GraphPad Prism 4.02	GraphPad Software, San Diego, CA, USA
ScionImage (Beta 4.0.2)	Scion Corporation, Frederick, MD, USA
Thumbs Plus 2002-R	S.A.D. GmbH, Ulm, Deutschland

### 2.5 Mausstämme

*Smn* k.o./*SMN2* transgene Mauslinie (FVB-Hintergrund), beschrieben in [Monani et al., 2000].

### 2.6 Motoneuron-Zellkultur

#### 2.6.1 Präparation

Trächtige Muttertiere wurden am Embryonaltag 14 durch cervikale Dislokation nach Äthernarkose getötet und die Embryonen aus dem Uterus präpariert. Unter dem Binokular wurde das lumbale Rückenmark jedes Embryos von Haut und Dura freigelegt und entnommen und in 180 µl HBSS gegeben. Bis zur Anlage der Zellkultur wurden die Präparate auf Eis aufbewahrt.

Zur Genotypisierung der Embryonen wurde zusätzlich der Kopf in jeweils 500 µl Lysispuffer mit 0.5 mg Proteinase K aufgenommen.

### 2.6.2 Lösung des Zellverbandes

Die Rückenmarksanteile in HBSS wurden 15 Minuten lang bei 37°C mit 0.05% Trypsin lysiert. Anschließend wurde das Trypsin durch Überführung der Gewebeteile in 180 µl Neurobasal (serumfreies Medium) und Zugabe von Trypsin-Inhibitor (0.05%) inhibiert. Durch vorsichtige Trituration wurde der Gewebeverband gelöst und die homogene Zellsuspension in 800 µl angewärmtes Neurobasal aufgenommen.

### 2.6.3 Panning

Die Zellsuspension wurde anschließend auf mit Antikörpern gegen das motoneuronspezifische Antigen p75 (anti-p75 NGF-Rezeptor, 0.940 mg/ml, 1:5000 verdünnt) beschichtete und mit Neurobasal gewaschene Platten überführt und 30 Minuten lang erschütterungsfrei bei Raumtemperatur inkubiert, um eine feste Bindung der Motoneurone an die Antikörper zu ermöglichen [Wiese et al., 2001].

Die übrigen Zellen wurden nach Ablauf der Inkubationszeit mit Neurobasal gewaschen und die verbleibenden Motoneurone mit Hilfe von je 0.5 ml 30 mM KCl in 0.8% NaCl abgelöst und in 1.5 ml Motoneuron-Medium (Neurobasal mit 500 µM Glutamax, 10% Horse Serum, 2% B27 und BDNF und CNTF 10 ng/µl) aufgenommen. Die Motoneurone wurden anschließend bei 1200 rpm und 25-37°C fünf Minuten lang zentrifugiert, das überstehende Medium bis auf 200 µl abgesaugt und mit 800 µl frischem warmem Motoneuron-Medium aufgefüllt.

### 2.6.4 Zellaussaat

Die Zellzahl in der Suspension wurde mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Anschließend wurden die Motoneurone je nach gewünschter Dichte auf mit 1% PORN (in Boratpuffer) und Laminin-111 (10 µg/ml) beschichteten Glasplättchen (Coverslips) in 4-well-Zellkulturschalen ausplattiert. Für die zur Axonlängen- und Wachstumskegel-Messung sowie zur Bestimmung der  $\beta$ -Aktinverteilung vorgesehenen Kulturen wurde eine Zelldichte von 3000 pro cm<sup>2</sup> gewählt.

## 2 Material und Methoden

---

### 2.7 Immunzytochemie

Nach sieben Tagen in Kultur wurden die Zellen mit 4% Paraformaldehyd (PFA) fixiert. Dazu wurde zunächst 1 ml 4% PFA in jede Zellkulturschale zum Motoneuron-Medium dazugegeben und anschließend nach 1-2 Minuten das Medium abgesaugt und durch 1.5 ml 4% PFA ersetzt.

Nach 15 Minuten wurden die Zellen dreimal mit je 1.5 ml 1x TBS-T (tris-buffered saline mit Tween-20) gewaschen, dann genau fünf Minuten lang mit 1.5 ml Aceton inkubiert und die Glasplättchen mit den Zellen in neue Zellkulturschalen überführt. Um das Aceton zu entfernen wurde wiederum dreimal mit 1x TBS-T gewaschen.

Danach wurden die Zellen 30 Minuten lang bei Raumtemperatur mit 1.5 ml 10% Bovinem Serumalbumin (BSA) in 1x TBS-T inkubiert, um unspezifische Bindungen zu sättigen.

Die Primärantikörper wurden in folgenden Verdünnungen in 1% BSA in 1x TBS-T eingesetzt:

Islet-1/2 (monoklonal, mouse)	1:2
β-Aktin (monoklonal, mouse)	1:1000
tau (polyklonal, rabbit)	1:1000
SMN (monoklonal, mouse)	1:1000

Nach Inkubation der Zellen mit den Primärantikörpern für 12 Stunden bei 4°C wurden überschüssige Antikörper durch dreimaliges Waschen mit 1x TBS-T entfernt, anschließend wieder für 30 Minuten unspezifische Bindungen mit 10% BSA in 1x TBS-T gesättigt und die Zellen 30-60 Minuten lang im Dunkeln mit folgenden Sekundärantikörpern in 1% BSA in 1x TBS-T inkubiert:

Cy2 anti-mouse (grün)	1:200
Cy2 anti-rabbit	1:200
Cy3 anti-mouse (rot)	1:300
Cy3 anti-rabbit	1:300

Danach wurden durch Waschen mit 1x TBS-T überschüssige Antikörper entfernt.



Um die Glasplättchen mit den gefärbten Zellen auf Objektträgern zu fixieren wurde auf die Objektträger ein Tropfen Mowiol aufgebracht und die Glasplättchen mit der beschichteten Seite nach unten vorsichtig auf den Tropfen Mowiol gelegt. Nach 24 Stunden horizontaler Lagerung im Kühlschrank bei 4°C konnten die Zellen mikroskopiert werden.

### 2.8 Fluoreszenzmikroskopie

Die gefärbten Präparate wurden am konfokalen Mikroskop (Leica TCS 4D) mit einem 20x0.5 Objektiv (Leica PL FLUOTAR, Axone) bzw. einem 63x/1.40/Oil Objektiv (Leica PL APO, mit Immersionsöl, Wachstumskegel) mikroskopiert und dabei digital fotografiert.

### 2.9 Auswertungen

#### 2.9.1 Längenmessungen

Die digitalen Bilder wurden mit der Software *ScionImage* (Release Beta 4.0.2) geöffnet und dort jeweils das längste Axon nachgefahren und gemessen. Für die Auswertungen wurden nur Zellen verwendet, bei denen eine eindeutige morphologische Zuordnung von Axon und Dendriten möglich war.

Die Resultate wurden mit *GraphPad Prism 4.02* statistisch analysiert.

#### 2.9.2 Wachstumskegelmessungen

Mit der *ScionImage* Software wurden die Umrise der Wachstumskegel nachgezeichnet und die umfahrene Fläche in  $\mu\text{m}^2$  berechnet.

Die Daten wurden in *GraphPad Prism* analysiert.

## 2 Material und Methoden

---

### 2.9.3 Analyse der $\beta$ -Aktin-Verteilung

Die Gesamtaufnahmen von Motoneuronen mit  $\beta$ -Aktin-Färbung wurden mit Hilfe von *Adobe Photoshop* in schwarz-weiß-Bilder konvertiert. Dann wurden im *AIDA ImageAnalyzer* gleich große Rechtecke jeweils über das distale und das proximale Axondrittel sowie über einen Hintergrundausschnitt gelegt und die Intensitäten (in Einheit pro Fläche, basierend auf der Signalstärke pro Pixel, nach den Anweisungen des Herstellers) gemessen.

Schließlich wurde aus den gewonnenen Werten der Aktin-Quotient (AQ) für jedes Axon berechnet:

$$AQ = (\text{Intensität distal} - \text{Hintergrund}) / (\text{Intensität proximal} - \text{Hintergrund})$$

Die Aktin-Quotienten wurden anschließend in *GraphPad Prism* analysiert.

## 2.10 Kultur Neuraler Stammzellen (NSC)

### 2.10.1 Präparation

Die Embryonen wurden wie oben beschrieben an Embryonaltag 11.5 aus dem Uterus präpariert. Der Kopf wurde unter dem Binokular-Mikroskop abgetrennt, die von Häuten freipräparierte Vorderhirnregion entnommen und in 100  $\mu$ l Neurobasal aufgenommen. Der restliche Körper wurde für die Genotypisierung in 500  $\mu$ l Lysispuffer mit 0.5 mg Proteinase K über Nacht bei 60°C geschüttelt.

### 2.10.2 Lösung des Zellverbandes

Die Vorderhirne wurden für 5-10 Minuten in 0.05% Trypsin in Neurobasal bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde Trypsin-Inhibitor (0.05%) zugegeben und trituriert, bis eine homogene Zellsuspension entstanden war.

### 2.10.3 Zellkultur

Die Zellsuspension wurde in vorbereitete Zellkulturflaschen (10 ml) mit 4 ml warmem NSC-Medium (Neurobasal mit 500  $\mu$ M Glutamax, 1% Penicillin/Streptomycin, 2% B27 und bFGF und EGF je 20 ng/ml) überführt.

In der folgenden Zeit wurden die Kulturen täglich auf die Bildung von Neurosphären kontrolliert und bei Bedarf das Medium gewechselt.

### 2.11 Genotypisierung der Embryonen

#### 2.11.1 DNA-Isolation

Um für die Genotypisierung der präparierten Embryonen DNA zu gewinnen wurden die Embryoköpfe über Nacht in 500  $\mu$ l Lysispuffer mit 0.5 mg Proteinase K bei 60°C lysiert. Zu dem lysierten Gewebe wurden 430  $\mu$ l 5% SDS, 170  $\mu$ l NaCl und 750  $\mu$ l Chloroform gegeben und alles gut geschüttelt. Zellreste und gelöste Proteine wurden bei 4°C und 14000 rpm 10 Minuten lang abzentrifugiert und vom Überstand 500  $\mu$ l abgenommen. Dazu wurden 250  $\mu$ l Aqua bidest. und 750  $\mu$ l Chloroform gegeben und alles geschüttelt und zentrifugiert. Der vorangegangene Schritt wurde anschließend wiederholt und der Überstand mit 1 ml 100% Ethanol versetzt. Durch leichtes Schwenken wurde die DNA ausgefällt und bei Raumtemperatur und 14000 rpm zu einem Pellet abzentrifugiert. Nach Dekantieren des Überstandes wurde das Pellet mit 500  $\mu$ l 70% Ethanol gewaschen, nochmals für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgekippt und das Pellet in 100-200  $\mu$ l Aqua bidest. aufgenommen. Um die DNA zu lösen wurde sie für 60 Minuten bei 60°C im Linearschüttler geschüttelt und anschließend eine Konzentrationsbestimmung mittels Photometrie bei 423 nm durchgeführt.

#### 2.11.2 *Smn*-PCR

Um die Genotypen der einzelnen Embryonen zu bestimmen wurde mit jeder DNA-Probe die Expression des *Smn*-Gens (WT) sowie der Neo-LacZ-Kassette (KO, als Marker für den *Smn*-Knockout) überprüft. (LacZ ist das  $\beta$ -Galaktosidase codierende Gen aus dem Lactose-Operon von *Escherichia coli*). Eine Bande bei 840 bp in der *Smn*-PCR bei Fehlen einer Bande in der LacZ-PCR bedeutet damit, dass der betreffende Embryo den Genotyp *Smn*<sup>+/+</sup> trägt, eine Bande in beiden PCRs bedeutet den Genotyp *Smn*<sup>+/-</sup>, und ein Fehlen der

## 2 Material und Methoden

---

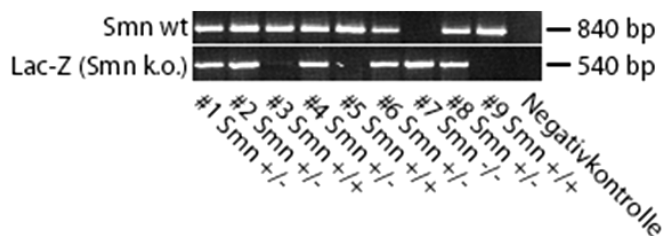
Bande in der *Smn*-PCR bei Vorhandensein einer Bande (540 bp) in der LacZ-PCR deutet auf einen Genotypen *Smn*<sup>-/-</sup> hin (vgl. **Abb. 5**).

Die PCR-Proben wurden wie folgt angesetzt:

Pro Embryo	2 µl	DNA (100 ng/µl)
	1 µl	dNTPs (10 mM)
	1 µl	Primer 1 (fw, 1:50)
	1 µl	Primer 2 (rev, 1:50)
	10 µl	Betain (5 M)
	5 µl	10x Taq-Puffer
	0.5 µl	Taq-DNA-Polymerase (5 U/µl)
	29.5 µl	Aqua dest.

Die PCR wurde in insgesamt 36 Zyklen mit folgenden Parametern durchgeführt:

Denaturierung	94°C	0.5 min.
Annealing	54°C	0.5 min.
DNA-Synthese	72°C	1.5 min.



**Abbildung 5: *Smn*-PCR zur Genotypisierung bezüglich des Maus-*Smn*-Gens.**

Banden in der Gelelektrophorese auf Höhe des entsprechenden Markers (rechts) zeigen Anwesenheit des *Smn*-Gens (oben) bzw. der statt des *Smn*-Gens inserierten Lac-Z-Kassette (unten) an.

Unten: Resultierende Genotypen.

### 2.11.3 SMN2-PCR

Zur Überprüfung der Embryonen auf das transgene humane *SMN2*-Gen wurden die Primer *SMN2* fw und *SMN2* rev (s. Kap. 2.1.9) verwendet.

Die Zusammensetzung der Proben für die *SMN2*-PCR entsprach derjenigen für die *Smn*-PCR.

Die Parameter für die *SMN2*-PCR lauteten:

Denaturierung	94°C	0.5 min.
Annealing	56°C	0.5 min.
Synthese	72°C	1.5 min.

Die Proben beider PCRs wurden anschließend mit je 10 µl 6x-Ladepuffer auf ein 1.5%iges Agarosegel mit Ethidiumbromid (0.1 µg/ml) aufgetragen und mittels Elektrophorese in TAE-Elektrophoresepuffer aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte unter UV-Licht.

## 2.12 Western Blot

### 2.12.1 Aufbereitung der Protein-Extrakte aus den Zellen

Nach dreimaligem Waschen mit je 1 ml PBS (phosphate buffered saline) wurden die Zellen und die Matrix auf Eis in 500 µl PBS vom Boden der Kulturschale abgeschabt und mit der Flüssigkeit in ein Reaktionsgefäß aufgenommen. Nach Zentrifugation mit 3000 rpm bei Raumtemperatur wurde die überstehende Flüssigkeit abgesaugt, die Zellen mit 50 µl RIPA-Puffer mit Complete<sup>®</sup> (Proteinase-Inhibitor) versetzt und bis zur vollständigen Lösung der Zellen trituriert.

Die enthaltene Proteinmenge wurde anschließend durch Bradford-Messung nach dem vom Hersteller (BioRad) angegebenen Protokoll photometrisch bestimmt.

### 2.12.2 Herstellung der Gele

Zur Herstellung eines 12%igen SDS-Polyacrylamidgels wurde zunächst das Trenngel aus 9.3 ml Aqua bidest., 6.7 ml Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 5.3 ml Lower Buffer, 200 µl 10% APS und 10 µl TEMED<sup>®</sup> vorbereitet, zwischen zwei fixierte Glasplatten gegossen und mit ca. 1 ml H<sub>2</sub>O-gesättigtem Butanol überschichtet. Das Sammelgel wurde aus 7.1 ml Aqua bidest., 1.5 ml Acrylamid, 1.25 ml Upper Buffer, 100 µl 10% APS und 10 µl TEMED<sup>®</sup> gemischt

## **2 Material und Methoden**

---

und nach Aushärtung des Trenngels und Entfernung des Butanols auf das Trenngel gegossen und der Kamm oben zwischen die Glasplatten gesteckt.

### **2.12.3 Auftrennung der Proteine im Gel**

Die ausgehärteten Gele wurden nach Anleitung des Herstellers (Bio-Rad) in die Gelkammer eingesetzt und die Kammer mit Laufpuffer aufgefüllt.

Die mit 2x Laemmli-Puffer 1:1 versetzten Proteinproben wurden in die Taschen des Sammelgels aufgetragen und für ca. 45-60 Minuten wurde eine Spannung von 20 mA angelegt, bis die Lauffront am unteren Ende des Gels angekommen war.

### **2.12.4 Übertragung der Proteine auf Nitrozellulose**

Eine Nitrozellulose-Membran und sechs Lagen Whatman-Papier wurden auf Gelgröße zugeschnitten und in Blotting-Puffer angefeuchtet.

Der Blotaufbau erfolgte in einer Semi-dry-Blotkammer nach folgendem Schema: Die Membran wurde auf drei Lagen Whatman-Papier gelegt, darauf folgte das Gel, das wiederum mit drei Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei überschichtet wurde. Für 120 Minuten wurde eine Spannung von 100 mA pro Gel angelegt.

### **2.12.5 Auswertung**

Unspezifische Bindungsstellen auf der Membran wurden durch 30minütige Inkubation in 5% Milchpulver-Suspension in 1x TBS-T geblockt. Die Erstantikörper gegen SMN (1:1000) und  $\beta$ -III-Tubulin (1:500) wurden in 5% Milchpulver-Suspension in 1x TBS-T verdünnt und die Membran über Nacht bei 4°C mit den Antikörpern inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal mit 1x TBS-T gewaschen, mit dem Sekundärantikörper (goat anti-mouse HRP-konjugierter IgG-Antikörper; 1:10000) in 5% Milchpulver-Suspension in 1x TBS-T für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und wiederum dreimal gewaschen. Anschließend wurden die SMN-immunoreaktiven Banden mit Hilfe

von Chemilumineszenz- (ECL-) Lösung (Lösung A und B 1:1) visualisiert und die chemilumineszenten Emissionen mit einem Röntgenfilm detektiert.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 cAMP erhöht die SMN-Proteinexpression in primären Motoneuronen und Neurosphären bildenden Neuralen Vorläuferzellen (NSC)

Ziel der ersten Versuchsreihe war es, zu untersuchen, ob eine Stimulierung der *SMN2*-Transkription mittels Behandlung mit 8-CPT-cAMP *in vitro* zu einer Erhöhung der SMN-Proteinmenge führt. Aufgrund der geringen Zahl an Motoneuronen, die aus dem Rückenmark eines einzelnen Mausembryos gewonnen werden können, war die quantitative Proteinbestimmung aus Motoneuronkulturen einzelner Embryonen, bestehend aus durchschnittlich je 8000-10000 Zellen, mittels Western Blot nicht möglich. Daher wurden Massenkulturen mit Motoneuronen von 8-10 Embryonen, die *Smn* heterozygot auf einem *SMN2*-transgenen Hintergrund exprimieren (*Smn*<sup>+/-</sup>; *SMN2*) angelegt und für sieben Tage mit 100 µM 8-CPT-cAMP, einem Zellmembran-permeablen cAMP-Analogon, behandelt. Diese Konzentration wurde gewählt, da hiermit in verschiedenen Zellreihen bereits eine Hochregulation von SMN gezeigt werden konnte [Majumder et al., 2004], und da eine Konzentration von 125 µM CPT-cAMP das Überleben isolierter Motoneurone unabhängig von Wachstumsfaktoren fördert [Hanson, Jr. et al., 1998]. Alle 48 Stunden wurde das Medium erneuert.

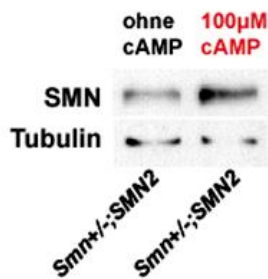
Um die Auswirkungen von cAMP differenziert in gesunden Kontrollen (*Smn*<sup>+/+</sup>, *SMN2*), *Smn*-heterozygoten, gesunden Zellen (*Smn*<sup>+/-</sup>; *SMN2*) und *Smn*-defizienten Zellen (*Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*) betrachten zu können, wurden Kulturen Neurosphären bildender Neuraler Vorläuferzellen aus dem Vorderhirnregion 11.5 Tage alter Mausembryonen herangezogen. NSC mit den oben genannten Genotypen wurden auf einer Matrix aus Polyornithin und Laminin-111 mit bzw. ohne Zugabe von 8-CPT-cAMP zum Medium kultiviert. Nach drei Tagen wurden Proteinextrakte aus den Zellen gewonnen und mittels Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle wurde die Expression von  $\beta$ -III-Tubulin, einem neuronalen Strukturprotein, herangezogen.



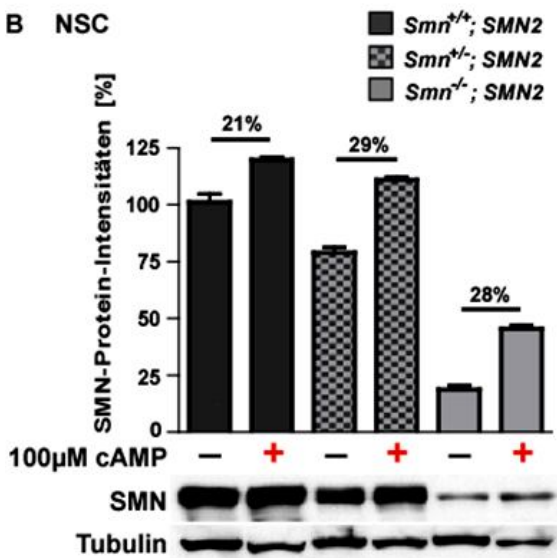
Die Analysen der extrahierten Proteine ergaben eine Hochregulation der Expression von *Smn*/*SMN2* in der Gruppe der mit 100  $\mu$ M 8-CPT-cAMP behandelten primären Motoneurone. (**Abb. 6 A**).

In NSC konnte in allen drei Versuchsgruppen, in *SMN*<sup>+/+</sup>; *SMN2*-Kontrollen, heterozygoten *Smn*<sup>+/-</sup>; *SMN2*-, wie auch in *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*-Zellen, eine Steigerung der *Smn*-/*SMN*-Proteinmenge durch die Behandlung mit 100  $\mu$ M 8-CPT-cAMP im Vergleich zu unbehandelten Kulturen nachgewiesen werden, bezogen auf die Expression von  $\beta$ -III-Tubulin. In der Gruppe der *Smn*<sup>+/+</sup>-Kontrollen nahm die *Smn*-/*SMN*-Proteinmenge um ca. 21% zu, in *Smn*-heterozygoten Zellen um ca. 29% und in *Smn*-defizienten Zellen um ca. 28% (**Abb. 6 B**).

**A Primäre Motoneurone**



**B NSC**



**Abbildung 6: Hochregulation der SMN-Proteinexpression in primären Motoneuronen und Neurosphären bildenden Neuralen Vorläuferzellen (NSC) durch 8-CPT-cAMP.**

Western Blots mit Proteinextrakten aus Motoneuronen (**A**, 7 Tage in Kultur) und NSC (**B**, drei Tage in Kultur), mit und ohne Behandlung mit 100 $\mu$ M 8-CPT-cAMP. Als Referenz diente die  $\beta$ -Tubulin-Expression, Balken zeigen relative SMN-Proteinmengen, bezogen auf  $\beta$ -Tubulin.

Prozentwerte geben Steigerung der SMN-Proteinmenge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle an.

**+**, Behandlung mit 100  $\mu$ M 8-CPT-cAMP; **-**, unbehandelte Kontrollgruppe.

**A** In *Smn*-heterozygoten Motoneuronen zeigte sich in der Versuchsgruppe mit 100 $\mu$ M 8-CPT-cAMP eine deutliche Stimulation der *Smn*-Expression;

**B** In *Smn*<sup>+/+</sup>, heterozygoten (*Smn*<sup>+/-</sup>) und *Smn*-defizienten (*Smn*<sup>-/-</sup>) NSC wird durch 100 $\mu$ M 8-CPT-cAMP ebenfalls die SMN-Expression stimuliert, die Proteinmenge erhöht sich in Abhängigkeit vom Genotyp um bis zu 29%.

### 3 Ergebnisse

---

100  $\mu\text{M}$  8-CPT-cAMP ist also in der Lage, die Expression des *Smn*- bzw. *SMN2*-Gens zu stimulieren, wenn auch nicht stark genug, um in *Smn*-defizienten Kulturen normale SMN-Proteinmengen zu erreichen.

#### 3.2 cAMP normalisiert die Größe der Wachstumskegel in *Smn*-defizienten Motoneuronen, nicht aber die Axonlänge

Um die Auswirkungen der durch cAMP induzierten Hochregulation von SMN auf das axonale Wachstum primärer Motoneurone *in vitro* zu untersuchen, wurden Motoneurone aus dem lumbalen Rückenmark 14 Tage alter *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*- und Kontrollembryonen isoliert und für sieben Tage in Kultur genommen. Als Überlebensfaktoren wurden dem Medium die neurotrophen Faktoren BDNF und CNTF in einer Konzentration von je 10 ng/ $\mu\text{l}$  zugegeben.

Als Matrix für die Zellkultur dienten Polyornithin (negative Ladungen) und Laminin-111, ein Glykoprotein und Bestandteil der Basallamina, das das Neuritenwachstum fördert [Patton, 2000].

Um Axonlänge und Wachstumskegelflächen der Motoneurone zu bestimmen, wurden sie nach sieben Tagen fixiert, mit Primärantikörpern gegen  $\beta$ -Aktin (Wachstumskegel) bzw. Islet/tau (Axonlängen; Islet = motoneuronspezifischer Transkriptionsfaktor; tau = Mikrotubuli stabilisierendes Protein) und fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern gefärbt und digital vermessen. Alle Daten wurden durch mindestens drei voneinander unabhängige Experimente gewonnen; N gibt die Anzahl der in die Berechnung eingegangenen Messwerte an.

*Smn*-defiziente Motoneurone zeigen *in vitro* unter diesen Kulturbedingungen im Vergleich zu Kontroll-Motoneuronen (*Smn*<sup>+/+</sup>; *SMN2*) kleinere Wachstumskegel und kürzere Axone.

Auch in den vorliegenden Versuchen konnten diese Daten bestätigt werden: Die Wachstumskegel von *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*-Motoneuronen waren mit einer durchschnittlichen Fläche von 30.66  $\mu\text{m}^2$  ( $\pm 1.59$ ; N=111) signifikant kleiner ( $P < 0.001$ ; One-way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test) als

diejenigen von Kontroll-Motoneuronen mit einer durchschnittlichen Größe von  $41.49 \mu\text{m}^2$  ( $\pm 1.78$ ;  $N=108$ ; **Abb. 7 A, B, C**).

*Smn*-defiziente Motoneurone, die sieben Tage lang mit  $100 \mu\text{M}$  8-CPT-cAMP behandelt wurden, zeigten hingegen eine durchschnittliche Wachstumskegelfläche von  $44.34 \mu\text{m}^2$  ( $\pm 2.20$ ;  $N=108$ ), was einer Größenzunahme um ca. 45% entspricht. Mit  $100 \mu\text{M}$  8-CPT-cAMP behandelte *Smn*-defiziente Motoneurone haben demnach normal große Wachstumskegel (**Abb. 7 A, C, E**).

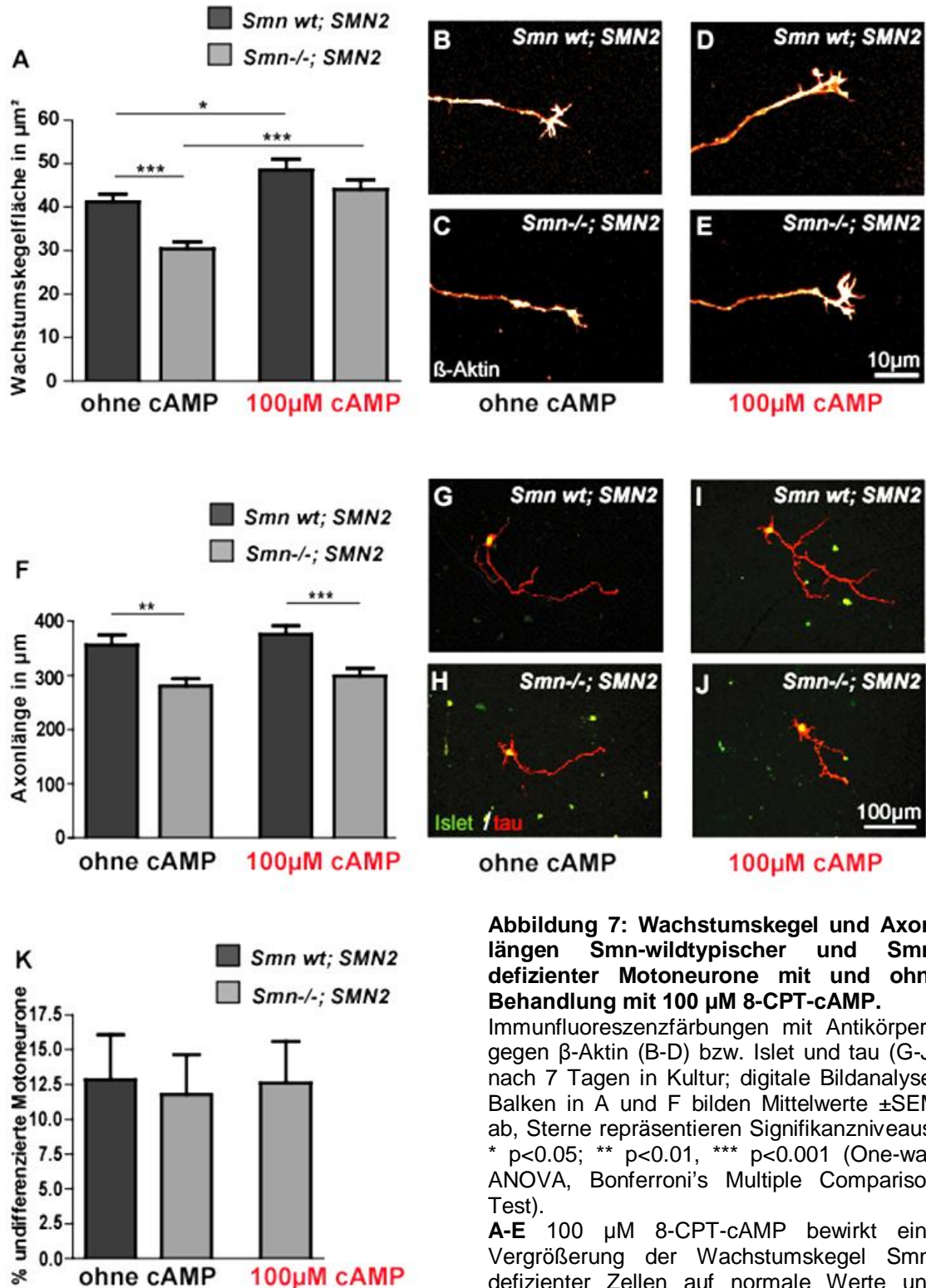
Auch bei Kontroll-Motoneuronen beeinflusste die Zugabe von  $100 \mu\text{M}$  8-CPT-cAMP zum Medium die Größe der Wachstumskegel positiv; hier zeigte sich eine Größenzunahme um ca. 18% auf durchschnittlich  $48.85 \mu\text{m}^2$  ( $\pm 2.461$ ;  $N=99$ ;  $P=0.015$ ; **Abb. 7 A, B, D**).

Obwohl Wachstumskegel für das axonale Längenwachstum entscheidende Strukturen darstellen und die Behandlung mit  $100 \mu\text{M}$  8-CPT-cAMP die Wachstumskegelgröße in *Smn*-defizienten Motoneuronen normalisierte, wurde das Längendefizit der *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*-Motoneurone durch 8-CPT-cAMP nicht beeinflusst. Mit  $286.10 \mu\text{m}$  ( $\pm 14.11$ ;  $N=170$ ) ohne 8-CPT-cAMP und  $298.80 \mu\text{m}$  ( $\pm 13.96$ ;  $N=164$ ) mit  $100 \mu\text{M}$  8-CPT-cAMP waren ihre Axone jeweils signifikant kürzer ( $P=0.0026$  bzw.  $0.0132$ ) als die unbehandelten Kontroll-Motoneurone (**Abb. 7 F, G, H, J**). Auch bei den mit 8-CPT-cAMP behandelten *Smn*<sup>+/+</sup>; *SMN2*-Kontrollen ließ sich kein Effekt auf die Axonlänge nachweisen ( $376.30 \mu\text{m}$   $\pm 15.68$ ;  $N=173$ ; **Abb. 7 F, I**).

Um auszuschließen, dass 8-CPT-cAMP zu einer Ausdifferenzierung unreifer Motoneurone führt, die dann jedoch kürzere Axone haben und den Durchschnittswert für die Axonlänge verkleinern, wurde der Anteil an unreifen Motoneuronen (in % der Zellzahl) in behandelten und unbehandelten Kulturen bestimmt. Als unreif wurden Islet-1-positive Zellen gewertet, bei denen keine eindeutige Unterscheidung von Axon und Dendriten aufgrund der Längendifferenz möglich war.

In unbehandelten Kulturen ergab sich kein unterschiedlicher Anteil unreifer Motoneurone in *Smn*-defizienten ( $11.78\% \pm 2.87$ ) und Kontroll-Kulturen ( $12.85\% \pm 3.22$ ). Auch durch  $100 \mu\text{M}$  8-CPT-cAMP wurde der Anteil unreifer Zellen in *Smn*-defizienten Kulturen nicht verändert ( $12.62\% \pm 2.98$ ; **Abb. 7 K**).

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 7: Wachstumskegel und Axonlängen Smn-wildtypischer und Smn-defizienter Motoneurone mit und ohne Behandlung mit 100  $\mu\text{M}$  8-CPT-cAMP.**

Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Aktin (B-D) bzw. Islet 1 und tau (G-J) nach 7 Tagen in Kultur; digitale Bildanalyse. Balken in A und F bilden Mittelwerte  $\pm$ SEM ab, Sterne repräsentieren Signifikanzniveaus: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  (One-way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test).

**A-E** 100  $\mu\text{M}$  8-CPT-cAMP bewirkt eine Vergrößerung der Wachstumskegel Smn-defizienter Zellen auf normale Werte und induziert auch in Kontrollzellen eine Größenzunahme der Wachstumskegel.

**F-J** Das Längenwachstum der Axone wird durch 100  $\mu\text{M}$  8-CPT-cAMP nicht beeinflusst; sowohl mit als auch ohne Behandlung sind die Axone Smn-defizienter Motoneurone kürzer als die von Kontrollen.

**K** Dies ist nicht durch eine vermehrte Ausreifung von Motoneuronen, induziert durch 8-CPT-cAMP, erklärbar, da sich der Anteil undifferenzierter Motoneurone (kein sicher erkennbarer morphologischer Unterschied zwischen Axon und Dendrit/en) durch 8-CPT-cAMP nicht verändert.

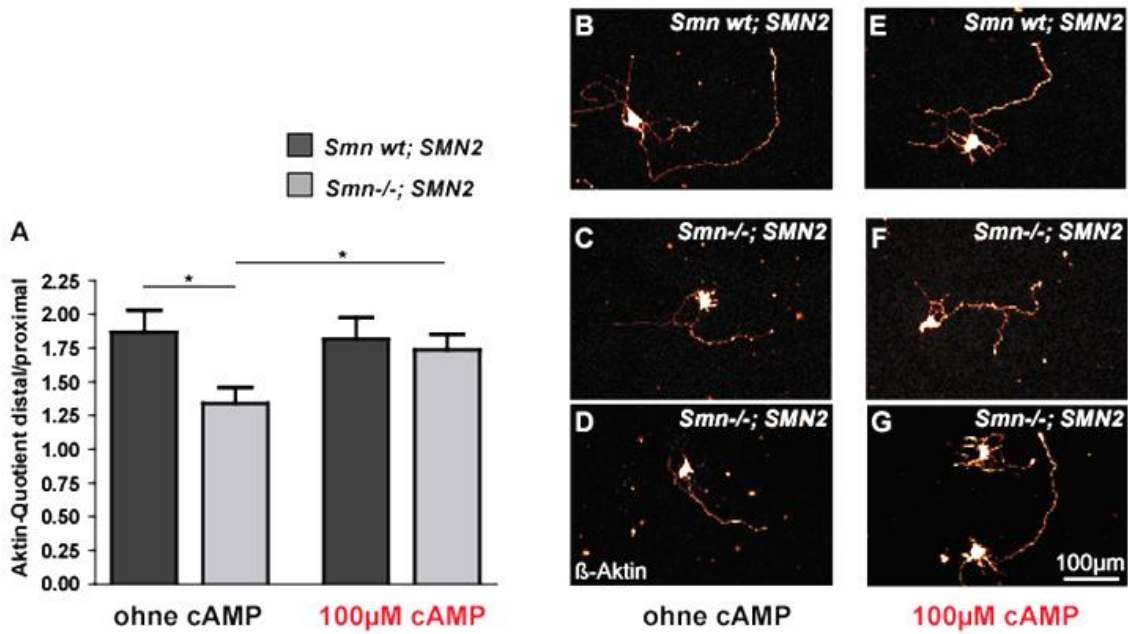
### 3.3 Die axonale Fehlverteilung von $\beta$ -Aktin in Smn-defizienten Motoneuronen wird durch cAMP behoben

Untersuchungen an isolierten Smn-defizienten Motoneuronen haben im Vergleich zu gesunden Kontrollzellen eine Fehlverteilung von  $\beta$ -Aktin, einem wichtigen Zytoskelettprotein, sowie seiner mRNA, ergeben. Die zelluläre Gesamtmenge an  $\beta$ -Aktin-Protein ist dabei nicht vermindert [Rossoll et al., 2003]. In Wachstumskegeln von Neuronen wird das Axonwachstum durch Polymerisierung von  $\beta$ -Aktin gesteuert. Dabei wird  $\beta$ -Aktin-mRNA auch lokal in den Axonterminalen transkribiert, und die lokale Proteinsynthese kann durch neuronale Aktivierung gesteigert werden [Bassell and Singer, 2001; Bassell et al., 1998; Zhang et al., 2001; Zhang et al., 1999]

Zur Untersuchung der Auswirkungen einer Behandlung mit 100  $\mu$ M 8-CPT-cAMP auf die axonale  $\beta$ -Aktin-Verteilung wurden primäre Motoneurone Smn-defizienter und Kontroll-Embryonen kultiviert, nach sieben Tagen fixiert und mit Antikörpern gegen  $\beta$ -Aktin und fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern gefärbt. Anschließend wurden die Zellen mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops vergrößert dargestellt, fotografiert und die Intensitäten der  $\beta$ -Aktin-Färbung jeweils im distalen (ohne Wachstumskegel) und proximalen Axondrittel digital vermessen. Aus den Messwerten wurde ein Quotient errechnet, anhand dessen die  $\beta$ -Aktin-Fehlverteilung und mögliche durch 8-CPT-cAMP bedingte Effekte quantifiziert wurden.

Für unbehandelte *Smn*<sup>+/+</sup>; *SMN2*-Kontrollen ergab sich ein Aktin-Quotient von 1.87 ( $\pm$ 0.16; N=78), der die distale Akkumulation von  $\beta$ -Aktin reflektiert (**Abb. 8 A, B**). Der Aktin-Quotient unbehandelter *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*-Mutanten war mit 1.34 ( $\pm$ 0.12; N=82) signifikant kleiner (P=0.0088; One-way ANOVA, Bonferroni's post-test), was die Beobachtung der fehlenden distalen Akkumulation bestätigt (**Abb. 8 A, C, D**).

Die Behandlung Smn-defizienter Motoneurone mit 100  $\mu$ M 8-CPT-cAMP führte zu einer Erhöhung des Quotienten auf 1.74 ( $\pm$ 0.12; N=90) und damit zu einer Wiederherstellung der normalen Verteilung von  $\beta$ -Aktin (**Abb. 8 A, F, G**). Die  $\beta$ -Aktin-Verteilung in Kontroll-Motoneuronen wurde durch die Behandlung nicht beeinflusst (**Abb. 8 A, E**).



**Abbildung 8: Verteilung von  $\beta$ -Aktin in Axonen von Smn-defizienten und Kontroll-Motoneuronen mit und ohne 8-CPT-cAMP.**

Antikörperfärbung gegen  $\beta$ -Aktin und densitometrische Bestimmung der Färbintensität nach 7 Tagen in Kultur. Smn-defiziente Zellen (*Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*) weisen ein  $\beta$ -Aktin-Defizit im distalen Axon im Vergleich zu gesunden Zellen auf, dies kann durch Bildung eines Quotienten aus den Werten für die  $\beta$ -Aktin-Intensität im distalen und proximalen Axondrittel erfasst werden (s. Text und Methodenteil 2.9.3). Balken in A bilden Mittelwerte  $\pm$  SEM ab, Sterne repräsentieren Signifikanzniveau: \*  $p < 0.05$  (One-way ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test).

**A** Unbehandelt ist der Aktin-Quotient Smn-defizienter Zellen signifikant niedriger als in Kontrollen. Bei mit 8-CPT-cAMP behandelten Smn-defizienten Zellen zeigte sich eine signifikante Zunahme der  $\beta$ -Aktin-Intensität im distalen Axondrittel im Vergleich zu unbehandelten Zellen (hellgraue Balken), was zu einer Angleichung der Aktin-Quotienten von cAMP-behandelten Smn-defizienten Zellen und Kontrollen und führt.

**B-D** Unbehandelte Zellen

**E-G** Motoneurone nach Behandlung mit 100  $\mu$ M 8-CPT-cAMP

### 3.4 cAMP kompensiert für das veränderte Wachstumsverhalten isolierter embryonaler Smn-defizienter Motoneurone auf der synapsenspezifischen Laminin-Isoform Laminin-221

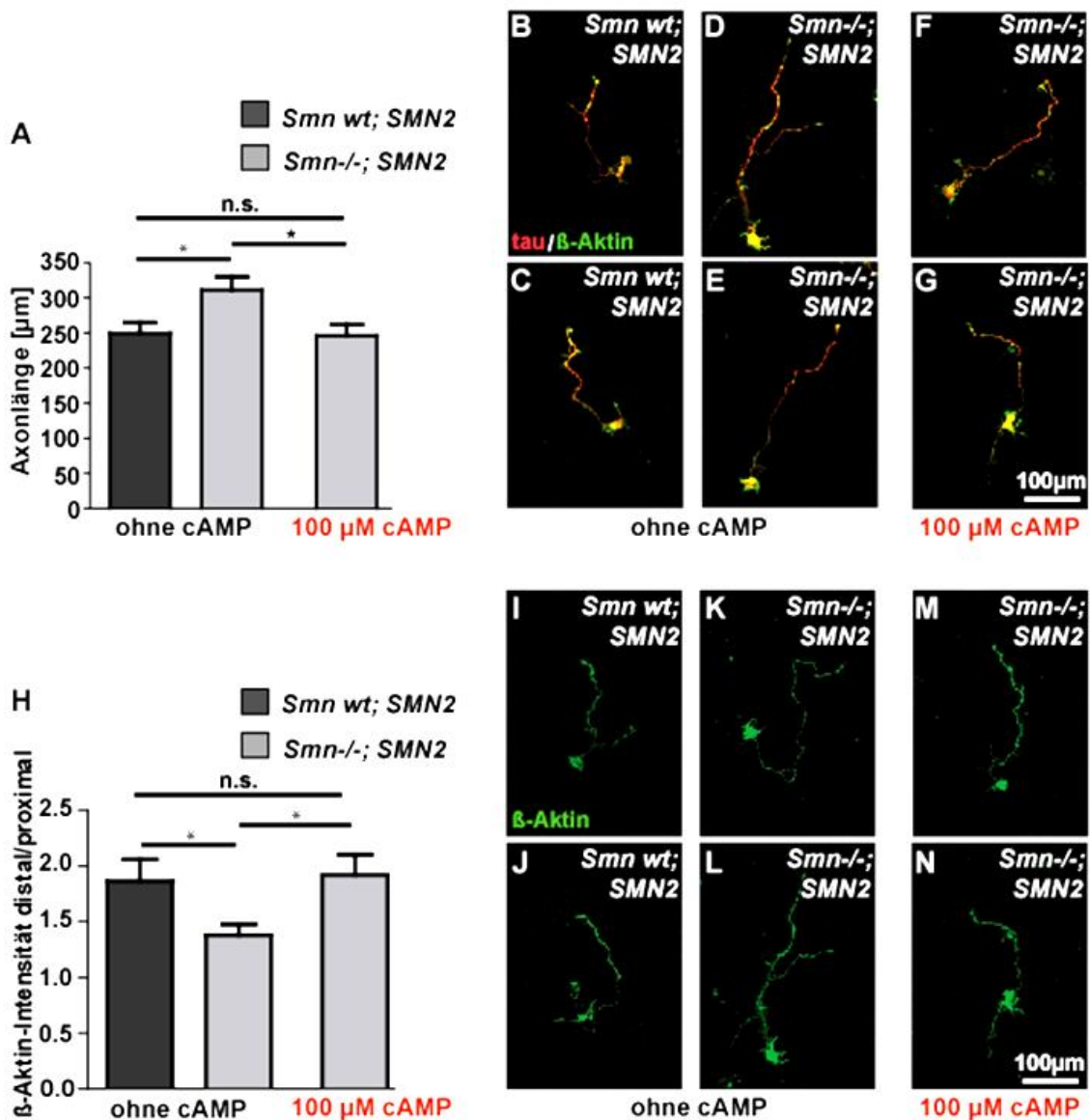
Isolierte spinale Motoneurone, die auf einer Matrix kultiviert werden, die Laminin-221 enthält, haben kürzere Axone als auf Laminin-111 kultivierte Zellen [Porter et al., 1995]. Ursächlich hierfür ist eine Interaktion der  $\beta 2$ -Untereinheit des Laminin-221 mit extrazellulären Domänen ( $Ca_v2.2$ ) spannungsgesteuerter Kalzium-Kanäle (VGCC) der Subsynapse, die ein Signal zur präsynaptischen Differenzierung an den Wachstumskegel vermittelt [Nishimune et al., 2004].

Diese Signalübermittlung geschieht zwar unabhängig von einer Aktivierung des Kalzium-Kanals, dennoch ist es denkbar, dass einerseits das Erregungsniveau der Zelle und andererseits die Verfügbarkeit interaktionsfähiger VGCCs in der präsynaptischen Membran, die von einem intakten  $\beta$ -Aktin-Zytoskelett abhängig ist, Einfluss auf die Signalübermittlung nehmen.

Da die Behandlung mit 100  $\mu$ M 8-CPT-cAMP, wie in den vorhergehenden Versuchen gezeigt, in der Lage ist, die morphologischen Veränderungen Smn-defizienter Neurone auf Laminin-111 zumindest teilweise zu kompensieren, sollte nun unter den genannten Voraussetzungen untersucht werden, ob und wie das Wachstumsverhalten auf Laminin-221 durch die SMN-Mutation beeinträchtigt wird, und ob bestehende Veränderungen durch 8-CPT-cAMP beeinflussbar sind. Um das Wachstum von *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*-Motoneuronen und Kontrollen mit und ohne Einfluss von 100  $\mu$ M 8-CPT-cAMP auf  $\beta 2$ -Laminin (Laminin-221, Merosin) zu untersuchen, wurden die Motoneurone wie oben beschrieben isoliert und für sieben Tage auf Poly-Ornithin und  $\beta 2$ -Laminin kultiviert.

Interessanterweise ist das axonale Längenwachstum Smn-defizienter Motoneurone auf  $\beta 2$ -Laminin im Vergleich zu *Smn*<sup>+/+</sup>; *SMN2*-Kontrollen nicht weiter beeinträchtigt; im Gegenteil sind die Axone Smn-defizienter Motoneurone auf  $\beta 2$ -Laminin mit  $312.20 \pm 18.49 \mu\text{m}$  (N=65) signifikant ( $P < 0.05$ ; One-way ANOVA und Bonferroni's Multi-Comparison test) länger als diejenigen von gesunden Kontrollkulturen mit  $250.60 \pm 15.31 \mu\text{m}$  (N=44) (**Abb. 9 A** ohne cAMP, **B-E**).

### 3 Ergebnisse



**Abbildung 9: Längenwachstum und  $\beta$ -Aktin-Verteilung von *Smn*-defizienten Motoneuronen auf  $\beta$ 2-Laminin (Merosin) nach 7 Tagen in Kultur.**

Immunfluoreszenz-Färbung mit Antikörpern gegen tau und  $\beta$ -Aktin (B-G) bzw.  $\beta$ -Aktin (I-N). Graphen in A und H bilden Mittelwerte  $\pm$ SEM ab, Sterne zeigen Signifikanzen an: \*  $p < 0.05$ , n.s., nicht signifikant (One-way-ANOVA, Bonferroni's Multiple Comparison Test).

**A, B-G** Die Axone *Smn*-defizienter Motoneurone sind auf einer Matrix mit  $\beta$ 2-Laminin länger als Axone von Kontrollen. Dieser Effekt wird durch 100  $\mu$ M 8-CPT-cAMP vollständig kompensiert.

**H, I-N** Wie auf Laminin-111 weisen die Axone von *Smn*-defizienten Motoneuronen auch auf  $\beta$ 2-Laminin ein distales  $\beta$ -Aktin-Defizit auf, das durch Behandlung mit 100  $\mu$ M 8-CPT-cAMP behoben wird.

Dies ist ein Hinweis auf ein vermindertes Ansprechen der *Smn*-defizienten Motoneurone auf das von  $\beta$ 2-Laminin dargebotene Differenzierungssignal.



Therapiert man auf  $\beta$ 2-Laminin kultivierte Smn-defiziente Motoneurone für sieben Tage mit 100  $\mu$ M 8-CPT-cAMP, so zeigt sich eine deutliche Reduktion der Axonlängen im Vergleich zu den unbehandelten Smn-defizienten Kulturen auf eine durchschnittliche Länge, die sich von der gesunder unbehandelter Zellen nicht unterscheidet (247.20  $\pm$ 15.63  $\mu$ m; N=61 vs. 250.60  $\pm$ 15.31  $\mu$ m; **Abb. 9 A, B-G**).

Die Stimulation mit 8-CPT-cAMP kompensiert demnach das funktionelle Defizit durch das Fehlen von Smn und normalisiert die Reaktion auf das durch  $\beta$ 2-Laminin vermittelte Signal. Daneben weisen auch auf  $\beta$ 2-Laminin kultivierte Smn-defiziente Motoneurone eine Fehlverteilung von  $\beta$ -Aktin im Axon auf. Der Mittelwert für den Quotienten aus den Aktin-Färbeintensitäten im distalen und proximalen Axondritzel beträgt für Smn-defiziente Motoneurone auf  $\beta$ 2-Laminin 1.36 ( $\pm$ 0.09; N=82), für Kontrollen 1.84 ( $\pm$ 0.19; N=78).

Analog zu den Kulturen auf Laminin-111 lässt sich auch auf  $\beta$ 2-Laminin durch 100  $\mu$ M 8-CPT-cAMP eine Normalisierung der  $\beta$ -Aktin-Verteilung bewirken (1.90  $\pm$ 0.18; N=90) (**Abb. 9 H, I-N**).

### 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass zyklisches AMP die beschriebenen morphologischen und funktionellen Defekte isolierter embryonaler *Smn*-defizienter Motoneurone eines Mausmodells für Spinale Muskelatrophie Typ I kompensieren kann. Es handelt sich hierbei also um einen sogenannten *Proof of Principle*. Der entwickelte in-vitro-Assay ist Grundlage für die Suche nach weiteren Stimulanzen der *SMN2*-Transkription im Rahmen neuer Therapieansätze gegen die klassische Form der SMA, für die bislang keine Therapie verfügbar ist.

Durch Western Blot-Analysen gelang der Nachweis einer Steigerung der Expression von SMN-Protein durch Behandlung kultivierter Motoneurone sowie neuraler Vorläuferzellen (NSC) mit 8-CPT-cAMP.

Gleichzeitig wurde gezeigt, dass das Längendefizit der Axone *Smn*-defizienter Motoneurone in vitro auf Laminin-111 mit einer Reduktion der  $\beta$ -Aktin-Proteinmenge im distalen Axon und im Wachstumskegel im Vergleich zu gesunden Zellen einher geht. Diese Fehlverteilung von  $\beta$ -Aktin ist auch in *Smn*-defizienten Motoneuronen nachweisbar, die auf  $\beta$ 2-Laminin (Merosin, Laminin-221) kultiviert werden und auf diesem Substrat signifikant längere Axone aufweisen als gesunde Kontrollzellen.

Durch Behandlung der Motoneurone mit 100  $\mu$ M 8-CPT-cAMP konnten die Größe der Wachstumskegel und die axonale  $\beta$ -Aktin-Verteilung auf Laminin-111 und Laminin-221 normalisiert werden. Auch auf Wachstumskegel von heterozygoten *Smn*<sup>+/-</sup>; *SMN2* Kontroll-Motoneuronen hatte 8-CPT-cAMP eine vergrößernde Wirkung. Die Axonlänge der auf  $\beta$ 2-Laminin kultivierten *Smn*-defizienten Motoneurone reduzierte sich auf normale Werte, das funktionelle Defizit konnte also behoben werden. Hingegen wurden die Axonlängen von *Smn*-defizienten und Kontrollzellen auf Laminin-111 nicht beeinflusst.

$\beta$ -Aktin ist ein zentrales Strukturprotein in Neuronen, insbesondere in den Wachstumskegeln der Axone, wo es in Filopodien und Lamellipodien lokalisiert ist. Durch  $\beta$ -Aktin-Polymerisierung und -Depolymerisierung finden dort das

Axonwachstum, die Reaktion auf zytotaktische und inhibierende Signale der extrazellulären Matrix, sowie letztlich die Ausbildung des präsynaptischen Anteils der neuromuskulären Synapse statt [Lin and Forscher, 1995;Luo, 2002;Son et al., 1999].

Das hierfür benötigte  $\beta$ -Aktin-Protein wird lokal im Axon und Wachstumskegel synthetisiert; man findet dort  $\beta$ -Aktin-mRNA sowie Ribosomen und andere zur Translation benötigte Komponenten [Sotelo-Silveira et al., 2006;Mohr and Richter, 2003]. Der Transport von  $\beta$ -Aktin-mRNA in distale Kompartimente der Motoneurone wird durch die Neurotrophine NT-3 und BDNF reguliert, kann in vitro jedoch auch durch cAMP stimuliert werden [Bassell et al., 1998;Zhang et al., 2001;Zhang et al., 1999] und findet unter Beteiligung von SMN statt [Rossoll et al., 2003;Sharma et al., 2005]. SMN interagiert weiterhin mit dem Aktin-bindenden Protein Profilin (pfn-IIa) [Sharma et al., 2005], das die Aktin-Polymerisierung reguliert; mit dem Aktin-stabilisierenden Plastin 3 (PLS3) konnte ein Modifikationsfaktor des Ausprägungsgrades der SMA identifiziert werden [Oprea et al., 2008].

Wie durch die Experimente in dieser Arbeit gezeigt wurde, ist in kultivierten Smn-defizienten Motoneuronen die  $\beta$ -Aktin-Proteinmenge im distalen Axon und im Wachstumskegel im Vergleich zu gesunden Zellen vermindert. Gleichzeitig weisen die Axone Smn-defizienter Motoneurone auf einer Matrix aus Laminin-111, das ein starkes permissives Wachstumssignal darstellt [Manthorpe et al., 1983], ein vermindertes Längenwachstum auf. Der wachstumsfördernde Effekt von Laminin wird durch die Aktivierung des Laminin-Rezeptors der  $\beta$ 1-Integrin-Familie erreicht [Gehlsen et al., 1988;Gehlsen et al., 1989], die über einen Anstieg des intrazellulären Kalziums und eine Kalzium-/Calmodulin-abhängige Kinase (CaMKII) eine mechanische Interaktion und zugfeste Verbindung zwischen extrazellulärer Matrix, Integrin und Aktin-Zytoskelett ermöglicht [Schmidt et al., 1995;Kuhn et al., 1995;Easley et al., 2006]. Die Insertion von Laminin-Rezeptoren der  $\beta$ 1-Integrin-Familie in die Zellmembran der Filopodien setzt ein intaktes Aktin-Zytoskelett voraus [Grabham et al., 2000]. Die physikalische feste Interaktion von immobilem Substrat mit dem Netzwerk aus

## 4 Diskussion

---

Aktinfilamenten mit rückwärts gerichtetem Zytoplasmafluss bewirkt schließlich die Ausbildung von Filopodien [Suter and Forscher, 1998].

Laminine sind heterotrimere Glykoproteine aus je einer  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Kette, von denen bislang fünf verschiedene  $\alpha$ -, drei  $\beta$ - und drei  $\gamma$ -Subtypen (in Mäusen und im Menschen) isoliert wurden. Mindestens 16 unterschiedlich zusammengesetzte Trimere sind bekannt [Aumailley et al., 2005]. Als Bestandteile der Basallamina sind sie auf den Oberflächen fast aller Gewebe zu finden. Der Skelettmuskel synthetisiert mehrere unterschiedliche Isoformen, die verschiedenen Aufgaben dienen: den Großteil der Oberfläche bilden Laminine, die die  $\beta$ 1-Untereinheit enthalten (Laminin-111 und -211), während speziell an der Subsynapse der neuromuskulären Endplatte Laminine mit der Untereinheit  $\beta$ 2 vorherrschen (Laminin-221, -421 und -521). Eine Ausnahme hiervon stellt die Embryonalphase dar, während der in der synaptischen Basallamina sowohl die  $\beta$ 2- als auch die  $\beta$ 1-Untereinheit vorkommen, wobei  $\beta$ 2-Laminin erst später als  $\beta$ 1-Laminin nachweisbar ist [Patton et al., 1997].

Die  $\beta$ 2-Untereinheit hat die Eigenschaft, auf das Neuritenwachstum von Motoneuronen *in vitro* als „Stopp-Signal“ zu wirken [Hunter et al., 1989; Porter et al., 1995; Porter and Sanes, 1995]. Sie induziert *in vivo* eine präsynaptische Differenzierung des Wachstumskegels; Mäuse mit Mutationen im Gen für die  $\beta$ 2-Kette zeigen eine schwere Reifungsstörung der neuromuskulären Synapsen [Patton, 2000; Patton et al., 1997; Noakes et al., 1995].

Das Differenzierungssignal von  $\beta$ 2-Laminin wird durch eine direkte Interaktion eines Tripeptides Leucin-Arginin-Glutamat (LRE) in der  $\beta$ 2-Kette von Laminin mit den extrazellulären Domänen der  $Ca_v2.1$ - und  $Ca_v2.2$ -Untereinheiten von spannungsgesteuerten Kalzium-Kanälen (VGCC) vermittelt [Nishimune et al., 2004]. Nachfolgend wird eine Anreicherung von VGCCs sowie von präsynaptischen Vesikeln in benachbarten Membranabschnitten induziert. Diese präsynaptische Differenzierung ist unabhängig von Kalzium-Einstrom durch die VGCCs.

Wurden in den vorliegenden Versuchen die *Smn*-defizienten Motoneurone auf einer Matrix aus  $\beta$ 2-Laminin (Laminin-221) kultiviert, so waren erstaunlicherwei-

se die Axone Smn-defizienter Zellen länger als die gesunder Zellen [Jablonka et al., 2007]. Dies weist darauf hin, dass das Fehlen von  $\beta$ -Aktin Auswirkungen auf die Reaktionsfähigkeit der Wachstumskegel auf Signale der extrazellulären Matrix haben muss und eine Störung der Wachstumskegel-Motilität aufgrund von absolutem oder relativem Mangel an  $\beta$ -Aktin als alleinige Erklärung für das axonale Wachstumsdefizit nicht ausreicht.

Hypothesen über eine Synapsenpathologie bei der SMA bestehen bereits: In einem Mausmodell für die SMA Typ I konnte nachgewiesen werden, dass ein relativ moderater Verlust von Motoneuronen (17%) erst postnatal am dritten bis fünften Lebenstag eintritt, parallel zum Auftreten des Phänotyps [Monani et al., 2000]. Dieser geringe Verlust von Motoneuronen erklärt nicht die Schwere des Krankheitsbildes. Daher lässt sich postulieren, dass die Degeneration im präsynaptischen Bereich beginnt, und die axonale Degeneration dann „rückwärts“ zum Soma fortschreitet. Schließlich zeigen zwei aktuelle Publikationen, dass im Mausmodell für die schwere SMA das embryonale axonale Wachstum unbeeinträchtigt erscheint, während postnatal jedoch eine erhöhte Anzahl an nicht durch Axone kontaktierten („verwaisten“) Postsynapsen sowie irregulär geformten Acetylcholin-Rezeptor-Clustern der Postsynapsen als Hinweise auf Denervierung bzw. gestörte Synapsenreifung nachweisbar sind [Kariya et al., 2008;McGovern et al., 2008].

Durch Behandlung der Smn-defizienten Motoneurone mit 100  $\mu$ M 8-CPT-cAMP, einem membranpermeablen cAMP-Analogen, konnte eine Steigerung der fl-SMN-Proteinmenge erreicht werden. Gleichzeitig wurde die normale Verteilung von  $\beta$ -Aktin in Axonen mit distaler Anreicherung wiederhergestellt, verbunden mit einer Zunahme der Größe der Wachstumskegel auf normale Werte.

cAMP ist ein ubiquitäres intrazelluläres Signalmolekül, das in Neuronen als Antwort auf die Aktivierung verschiedener Transmittersysteme durch Adenylatcyclasen aus ATP synthetisiert wird (*second messenger*). cAMP kann seine Funktion sowohl durch Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) oder anderer Effektorproteine (z.B. EPAC) als auch durch Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration ausüben.

## 4 Diskussion

---

So ist cAMP in neuronalen Zellen beispielsweise an der Regulation des axonalen Wachstums oder der Transduktion von Überlebenssignalen neurotropher Faktoren und anderer Transmitter beteiligt [Hanson, Jr. et al., 1998; Meyer-Franke et al., 1998; Murray and Shewan, 2008], hat aber auch genomische Wirkungen, die es über die Aktivierung eines cAMP-response-Elements (CRE) im Promotor des jeweiligen Gens entfaltet.

An der Regulation des axonalen Wachstums ist cAMP weiterhin insofern beteiligt, als es in der Lage ist, direkt den axonalen Transport von  $\beta$ -Aktin-mRNA in den Wachstumskegel zu stimulieren [Bassell et al., 1998]. Im distalen Axonkompartiment fördert es außerdem die lokale Proteinsynthese.

Der Promotor des *Smn-/SMN2*-Gens enthält eine CRE-Sequenz [Majumder et al., 2004], und in den hier beschriebenen Versuchen konnte erwartungsgemäß eine Stimulation der *Smn-/SMN2*-Expression durch 8-CPT-cAMP in Motoneuronen und neuronalen Vorläuferzellen erreicht werden. Die verwendete Konzentration von 100  $\mu$ M 8-CPT-cAMP konnte jedoch keine vollständige Normalisierung der SMN-Proteinmenge bewirken.

Die Wirkung von exogenem cAMP auf das Axonwachstum ist sowohl vom intrazellulären cAMP-Spiegel als auch von der Art des Zellkultursubstrates (z.B. Laminin-111 oder Fibronectin) oder der Expression und Aktivierung von Integrinen in der Membran des Wachstumskegels abhängig [Lemons and Condic, 2006; Condic and Letourneau, 1997]. Bei einer relativ hohen Konzentration von Laminin-111 wie in den Experimenten dieser Arbeit (10  $\mu$ g/ml), ist von einer hohen intrazellulären cAMP-Konzentration auszugehen, so dass bei zusätzlicher Anhebung des intrazellulären cAMP kein stimulierender Effekt auf das Axonwachstum zu erwarten wäre [Lemons and Condic, 2006].

Für die oben beschriebenen positiven Effekte von 8-CPT-cAMP auf die pathologische Morphologie *Smn*-defizienter Motoneurone, insbesondere im Hinblick auf die veränderte axonale  $\beta$ -Aktin-Verteilung, bestehen folglich mehrere mögliche Mechanismen, die sich gegenseitig ergänzen:

- 1) Durch die vermehrte Expression von fl-SMN wird das SMN-Defizit (teilweise) ausgeglichen und somit die Funktionen des Proteins (axonaler mRNA-Transport, snRNP-Aufbau) wiederhergestellt.

- 2) Die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration stimuliert den axonalen Transport von  $\beta$ -Aktin-mRNA und führt so zur Behebung des  $\beta$ -Aktin-Defizits in den distalen axonalen Kompartimenten.
- 3) Durch die Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration wird auch die lokale Proteinsynthese im distalen Axon stimuliert, was ebenfalls eine Zunahme der Menge an  $\beta$ -Aktin im distalen Axon und so einen Ausgleich des vorhandenen Defizits bewirkt.

cAMP erhöht weiterhin die Rate spontaner Kalzium-Einströme ( $\text{Ca}^{++}$ -Transienten) in *Xenopus*-Motoneuronen [Gorbunova and Spitzer, 2002], die ein Maß für die zelluläre Aktivität darstellt.  $\text{Ca}^{++}$ -Transienten und zyklische cAMP-Erhöhungen interagieren in den Zellen dynamisch und beeinflussen beispielsweise die Reaktion auswachsender Wachstumskegel auf Orientierungssignale der umgebenden Gewebe [Gomez et al., 2001].

Durch Messungen der spontanen  $\text{Ca}^{++}$ -Transienten in Motoneuronen konnte kürzlich gezeigt werden, dass insbesondere die Funktionalität der spannungsgesteuerten  $\text{Ca}^{++}$ -Kanäle bei der Pathogenese der SMA eine zentrale Rolle spielen muss: Die morphologischen Defizite der *Smn*-defizienten Motoneurone korrelieren mit einem Mangel an  $\text{Ca}^{++}$ -Kanälen in den Wachstumskegeln und einer signifikant reduzierten Rate an spontanen  $\text{Ca}^{++}$ -Transienten, die wiederum durch Zugabe von 8-CPT-cAMP (100  $\mu\text{M}$ ) normalisiert werden kann [Jablonka et al., 2007].

So lässt sich schließlich ein integratives in-vitro-Modell für die Pathomechanismen der SMA ableiten, bei dem die Fehlverteilung von  $\beta$ -Aktin zu einer verminderten Anzahl von spannungsgesteuerten  $\text{Ca}^{++}$ -Kanälen in der präsynaptischen Membran führt. Hieraus resultiert einerseits ein reduziertes zelluläres Aktivitätsniveau, andererseits auch eine Abnahme der Interaktionen zwischen  $\text{Ca}^{++}$ -Kanälen und der extrazellulären Matrixkomponente Laminin mit der Folge mangelnder präsynaptischer Differenzierungsreize.

In Zusammenschau spricht dies für die Annahme, dass es sich bei der SMA nicht um eine reine Wachstumsstörung der Motoneurone handelt, sondern um

## 4 Diskussion

---

eine Reifungsstörung der neuromuskulären Synapse, die ein Absterben der Motoneurone aufgrund mangelnder rückwärts gerichteter Überlebenssignale zur Folge hat.

Diese in-vitro-Daten müssen in Zukunft im Tiermodell bestätigt werden; für die Forschung zu weiteren Therapieansätzen für die Spinale Muskelatrophie bedeutet dies möglicherweise einen neuen Ansatzpunkt: Medikamentöse Strategien könnten neben der Hochregulation von SMN beispielsweise durch Inhibitoren der Histon-Deacetylase wie Valproinsäure oder SAHA [Wirth et al., 2006a] auch die Steigerung der intrazellulären  $Ca^{++}$ -Konzentration und damit des zellulären Erregungsniveaus und der synaptischen Transmission zum Ziel haben. Die Auswirkungen eines solchen Vorgehens auf die Funktionalität der Wachstumskegel, synaptische Differenzierung und Signalübertragung wären hierbei zentrale Fragestellungen für zukünftige Untersuchungen.



## 5 Zusammenfassung

Die Spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine häufige autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung des motorischen Nervensystems bei Kindern. Ursache der Degeneration von spinalen Motoneuronen ist der homozygote Verlust des *SMN*- (survival of motoneuron) Gens und ein dadurch bedingter Mangel an SMN-Protein. Untersuchungen an Motoneuronen von *Smn*-defizienten Mäusen ergaben Störungen des axonalen Längenwachstums aufgrund einer Fehlverteilung des Zytoskelettproteins  $\beta$ -Aktin und seiner mRNA in den Axonterminalen.

Das Axonwachstum wird durch Aktin-Polymerisierung im Wachstumskegel gesteuert.  $\beta$ -Aktin-mRNA findet sich auch in Axonen, und die lokale Proteinsynthese kann durch neuronale Aktivierung gesteigert werden. Das SMN-Protein ist am axonalen Transport von  $\beta$ -Aktin beteiligt.

Durch 8-CPT-cAMP lässt sich in neuralen Stammzellen (NSC) sowie spinalen Motoneuronen *in vitro* eine Steigerung der SMN-Proteinexpression erzielen.

Zur Untersuchung der Auswirkungen der erhöhten SMN-Proteinmenge auf die Pathologie der Motoneurone wurde in der vorliegenden Arbeit ein *in-vitro*-Assay entwickelt, mit dessen Hilfe gezeigt werden konnte, dass eine Behandlung mit 100  $\mu$ M 8-CPT-cAMP die axonalen Veränderungen isolierter embryonaler *Smn*-defizienter Motoneurone kompensieren kann.

Motoneurone von 14 Tage alten *Smn*-defizienten und Kontroll-Mausembryonen wurden über sieben Tage hinweg auf einer Matrix aus Poly-Ornithin und Laminin-111 bzw. Laminin-121/221 kultiviert und mit 100 $\mu$ M cAMP und neurotrophen Faktoren behandelt. Nach Fixierung wurden die Zellen mit Antikörpern gegen Islet-1/2, tau und  $\beta$ -Aktin gefärbt, mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops fotografiert und digital vermessen.

8-CPT-cAMP erhöht den  $\beta$ -Aktin-Gehalt in den axonalen Wachstumskegeln von *Smn*-defizienten Motoneuronen. Die Größe der Wachstumskegel nimmt durch die Behandlung um das 2-3fache zu und erreicht normale Werte. Auf Laminin-111 bleibt das Längenwachstum der Axone durch 100 $\mu$ M 8-CPT-cAMP unbeeinflusst, auf Laminin-121/221 wird das Längenwachstum normalisiert. Die

## 5 Zusammenfassung

---

$\beta$ -Aktin-Verteilung innerhalb der Axone und Wachstumskegel von *Smn*-defizienten Motoneuronen erscheint durch die cAMP-Behandlung nahezu normalisiert.

Die Wiederherstellung der  $\beta$ -Aktin-Verteilung in Wachstumskegeln durch cAMP kann große Auswirkungen auf die Funktionalität der Motoneurone haben. Die Ergebnisse sind möglicherweise ein erster Schritt auf dem Weg zu einer Therapie für die Spinale Muskelatrophie.

## 6 Bibliographie

- Adams C, Suchowersky O, Lowry RB (1998) Congenital autosomal dominant distal spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 8: 405-408
- Aumailley M, Bruckner-Tuderman L, Carter WG, Deutzmann R, Edgar D, Ekblom P, Engel J, Engvall E, Hohenester E, Jones JC, Kleinman HK, Marinkovich MP, Martin GR, Mayer U, Meneguzzi G, Miner JH, Miyazaki K, Patarroyo M, Paulsson M, Quaranta V, Sanes JR, Sasaki T, Sekiguchi K, Sorokin LM, Talts JF, Tryggvason K, Uitto J, Virtanen I, von der MK, Wewer UM, Yamada Y, Yurchenco PD (2005) A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* 24: 326-332
- Bassell GJ, Singer RH (2001) Neuronal RNA localization and the cytoskeleton. *Results Probl Cell Differ* 34:41-56
- Bassell GJ, Zhang H, Byrd AL, Femino AM, Singer RH, Taneja KL, Lifshitz LM, Herman IM, Kosik KS (1998) Sorting of beta-actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture. *J Neurosci* 18: 251-265
- Battaglia G, Princivalle A, Forti F, Lizier C, Zeviani M (1997) Expression of the SMN gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in the mammalian central nervous system. *Hum Mol Genet* 6: 1961-1971
- Boillee S, Vande VC, Cleveland DW (2006) ALS: a disease of motor neurons and their nonneuronal neighbors. *Neuron* 52: 39-59
- Buchthal F, Olsen PZ (1970) Electromyography and muscle biopsy in infantile spinal muscular atrophy. *Brain* 93: 15-30
- Burglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, Munnich A, Melki J (1996) Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics* 32: 479-482
- Burglen L, Seroz T, Miniou P, Lefebvre S, Burlet P, Munnich A, Pequignot EV, Egly JM, Melki J (1997) The gene encoding p44, a subunit of the

## 6 Bibliographie

---

transcription factor TFIIH, is involved in large-scale deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease. *Am J Hum Genet* 60: 72-79

Carissimi C, Baccon J, Straccia M, Chiarella P, Maiolica A, Sawyer A, Rappsilber J, Pellizzoni L (2005) Unrip is a component of SMN complexes active in snRNP assembly. *FEBS Lett* 579: 2348-2354

Carissimi C, Saieva L, Baccon J, Chiarella P, Maiolica A, Sawyer A, Rappsilber J, Pellizzoni L (2006) Gemin8 is a novel component of the survival motor neuron complex and functions in small nuclear ribonucleoprotein assembly. *J Biol Chem* 281: 8126-8134

Chen Q, Baird SD, Mahadevan M, Besner-Johnston A, Farahani R, Xuan J, Kang X, Lefebvre C, Ikeda JE, Korneluk RG, MacKenzie AE (1998) Sequence of a 131-kb region of 5q13.1 containing the spinal muscular atrophy candidate genes SMN and NAIP. *Genomics* 48: 121-127

Cobben JM, Scheffer H, De Visser M, van der SG, Verhey JB, Osinga J, Burton M, Mensink RG, Grootsholten PM, Ten Kate LP, Buys CH (1996) Prenatal prediction of spinal muscular atrophy. Experience with linkage studies and consequences of present SMN deletion analysis. *Eur J Hum Genet* 4: 231-236

Condic ML, Letourneau PC (1997) Ligand-induced changes in integrin expression regulate neuronal adhesion and neurite outgrowth. *Nature* 389: 852-856

Crawford TO, Pardo CA (1996) The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis* 3: 97-110

Doussau F, Augustine GJ (2000) The actin cytoskeleton and neurotransmitter release: an overview. *Biochimie* 82: 353-363

Dreesen JC, Bras M, de Die-Smulders C, Dumoulin JC, Cobben JM, Evers JL, Smeets HJ, Geraedts JP (1998) Preimplantation genetic diagnosis of spinal muscular atrophy. *Mol Hum Reprod* 4: 881-885

- Easley CA, Faison MO, Kirsch TL, Lee JA, Seward ME, Tombes RM (2006) Laminin activates CaMK-II to stabilize nascent embryonic axons. *Brain Res* 1092: 59-68
- Figlewicz DA, Orrell RW (2003) The genetics of motor neuron diseases. *Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord* 4: 225-231
- Fischer U, Liu Q, Dreyfuss G (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* 90: 1023-1029
- Gehlsen KR, Dickerson K, Argraves WS, Engvall E, Ruoslahti E (1989) Subunit structure of a laminin-binding integrin and localization of its binding site on laminin. *J Biol Chem* 264: 19034-19038
- Gehlsen KR, Dillner L, Engvall E, Ruoslahti E (1988) The human laminin receptor is a member of the integrin family of cell adhesion receptors. *Science* 241: 1228-1229
- Germain-Desprez D, Brun T, Rochette C, Semionov A, Rouget R, Simard LR (2001) The SMN genes are subject to transcriptional regulation during cellular differentiation. *Gene* 279: 109-117
- Giesemann T, Rathke-Hartlieb S, Rothkegel M, Bartsch JW, Buchmeier S, Jockusch BM, Jockusch H (1999) A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J Biol Chem* 274: 37908-37914
- Gomez TM, Robles E, Poo M, Spitzer NC (2001) Filopodial calcium transients promote substrate-dependent growth cone turning. *Science* 291: 1983-1987
- Gorbunova YV, Spitzer NC (2002) Dynamic interactions of cyclic AMP transients and spontaneous Ca(2+) spikes. *Nature* 418: 93-96
- Grabham PW, Foley M, Umeojiako A, Goldberg DJ (2000) Nerve growth factor stimulates coupling of beta1 integrin to distinct transport mechanisms in the filopodia of growth cones. *J Cell Sci* 113: 3003-3012

## 6 Bibliographie

---

- Grohmann K, Rossoll W, Kobsar I, Holtmann B, Jablonka S, Wessig C, Stoltenburg-Didinger G, Fischer U, Hubner C, Martini R, Sendtner M (2004) Characterization of Ighmbp2 in motor neurons and implications for the pathomechanism in a mouse model of human spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1 (SMARD1). *Hum Mol Genet* 13: 2031-2042
- Gubitz AK, Feng W, Dreyfuss G (2004) The SMN complex. *Exp Cell Res* 296: 51-56
- Hall JG, Reed SD, Scott CI, Rogers JG, Jones KL, Camarano A (1982) Three distinct types of X-linked arthrogryposis seen in 6 families. *Clin Genet* 21: 81-97
- Hanson MG, Jr., Shen S, Wiemelt AP, McMorris FA, Barres BA (1998) Cyclic AMP elevation is sufficient to promote the survival of spinal motor neurons in vitro. *J Neurosci* 18: 7361-7371
- Harding AE, Thomas PK, Baraitser M, Bradbury PG, Morgan-Hughes JA, Ponsford JR (1982) X-linked recessive bulbospinal neuronopathy: a report of ten cases. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 45: 1012-1019
- Hunter DD, Porter BE, Bullock JW, Adams SP, Merlie JP, Sanes JR (1989) Primary sequence of a motor neuron-selective adhesive site in the synaptic basal lamina protein S-laminin. *Cell* 59: 905-913
- Jablonka S, Beck M, Lechner BD, Mayer C, Sendtner M (2007) Defective Ca<sup>2+</sup> channel clustering in axon terminals disturbs excitability in motoneurons in spinal muscular atrophy. *J Cell Biol* 179: 139-149
- Jablonka S, Karle K, Sandner B, Andreassi C, von Au K, Sendtner M (2006) Distinct and overlapping alterations in motor and sensory neurons in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 15: 511-518
- Jablonka S, Schrank B, Kralewski M, Rossoll W, Sendtner M (2000) Reduced survival motor neuron (Smn) gene dose in mice leads to motor neuron

degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III. *Hum Mol Genet* 9: 341-346

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

James PA, Talbot K (2006) The molecular genetics of non-ALS motor neuron diseases. *Biochim Biophys Acta* 1762: 986-1000

Kariya S, Park GH, Maeno-Hikichi Y, Leykekhman O, Lutz C, Arkovitz MS, Landmesser LT, Monani UR (2008) Reduced SMN protein impairs maturation of the neuromuscular junctions in mouse models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 17: 2552-2569

Kolb SJ, Battle DJ, Dreyfuss G (2007) Molecular functions of the SMN complex. *J Child Neurol* 22: 990-994

Kuhn TB, Schmidt MF, Kater SB (1995) Laminin and fibronectin guideposts signal sustained but opposite effects to passing growth cones. *Neuron* 14: 275-285

La Spada AR, Wilson EM, Lubahn DB, Harding AE, Fischbeck KH (1991) Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy. *Nature* 352: 77-79

Lefebvre S, Burglen L, Frezal J, Munnich A, Melki J (1998) The role of the SMN gene in proximal spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 7: 1531-1536

Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, . (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80: 155-165

Lemons ML, Condic ML (2006) Combined integrin activation and intracellular cAMP cause Rho GTPase dependent growth cone collapse on laminin-1. *Exp Neurol* 202: 324-335

## 6 Bibliographie

---

- Lin CH, Forscher P (1995) Growth cone advance is inversely proportional to retrograde F-actin flow. *Neuron* 14: 763-771
- 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
- Lunn MR, Wang CH (2008) Spinal muscular atrophy. *Lancet* 371: 2120-2133
- Luo L (2002) Actin cytoskeleton regulation in neuronal morphogenesis and structural plasticity. *Annu Rev Cell Dev Biol* 18:601-35
- Mailman MD, Heinz JW, Papp AC, Snyder PJ, Sedra MS, Wirth B, Burghes AH, Prior TW (2002) Molecular analysis of spinal muscular atrophy and modification of the phenotype by SMN2. *Genet Med* 4: 20-26
- Majumder S, Varadharaj S, Ghoshal K, Monani U, Burghes AH, Jacob ST (2004) Identification of a novel cyclic AMP-response element (CRE-II) and the role of CREB-1 in the cAMP-induced expression of the survival motor neuron (SMN) gene. *J Biol Chem* 279: 14803-14811
- Manthorpe M, Engvall E, Ruoslahti E, Longo FM, Davis GE, Varon S (1983) Laminin promotes neuritic regeneration from cultured peripheral and central neurons. *J Cell Biol* 97: 1882-1890
- Mayr B, Montminy M (2001) Transcriptional regulation by the phosphorylation-dependent factor CREB. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 599-609
- McGovern VL, Gavriline TO, Beattie CE, Burghes AH (2008) Embryonic motor axon development in the severe SMA mouse. *Hum Mol Genet* 17: 2900-2909
- Meyer-Franke A, Wilkinson GA, Kruttgen A, Hu M, Munro E, Hanson MG, Jr., Reichardt LF, Barres BA (1998) Depolarization and cAMP elevation rapidly recruit TrkB to the plasma membrane of CNS neurons. *Neuron* 21: 681-693



- Mohr E, Richter D (2003) Molecular determinants and physiological relevance of extrasomatic RNA localization in neurons. *Front Neuroendocrinol* 24: 128-139
- 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
- Monani UR, Sendtner M, Coover DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, Jablonka S, Schrank B, Rossol W, Prior TW, Morris GE, Burghes AH (2000) The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 9: 333-339
- Murray AJ, Shewan DA (2008) Epac mediates cyclic AMP-dependent axon growth, guidance and regeneration. *Mol Cell Neurosci* 38: 578-588
- Nishimune H, Sanes JR, Carlson SS (2004) A synaptic laminin-calcium channel interaction organizes active zones in motor nerve terminals. *Nature* 432: 580-587
- Noakes PG, Gautam M, Mudd J, Sanes JR, Merlie JP (1995) Aberrant differentiation of neuromuscular junctions in mice lacking s-laminin/laminin beta 2. *Nature* 374: 258-262
- Oprea GE, Krober S, McWhorter ML, Rossoll W, Muller S, Krawczak M, Bassell GJ, Beattie CE, Wirth B (2008) Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science* 320: 524-527
- Patton BL (2000) Laminins of the neuromuscular system. *Microsc Res Tech* 51: 247-261
- Patton BL, Miner JH, Chiu AY, Sanes JR (1997) Distribution and function of laminins in the neuromuscular system of developing, adult, and mutant mice. *J Cell Biol* 139: 1507-1521

## 6 Bibliographie

---

- Porter BE, Sanes JR (1995) Gated migration: neurons migrate on but not onto substrates containing S-laminin. *Dev Biol* 167: 609-616
- Porter BE, Weis J, Sanes JR (1995) A motoneuron-selective stop signal in the synaptic protein S-laminin. *Neuron* 14: 549-559
- Prior TW (2007) Spinal muscular atrophy diagnostics. *J Child Neurol* 22: 952-956
- Ramser J, Ahearn ME, Lenski C, Yariz KO, Hellebrand H, von Rhein M, Clark RD, Schmutzler RK, Lichtner P, Hoffman EP, Meindl A, Baumbach-Reardon L (2008) Rare missense and synonymous variants in UBE1 are associated with X-linked infantile spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 82: 188-193
- Reddel S, Ouvrier RA, Nicholson G, Dierick I, Irobi J, Timmerman V, Ryan MM (2008) Autosomal dominant congenital spinal muscular atrophy - A possible developmental deficiency of motor neurones? *Neuromuscul Disord* 18: 530-535
- 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
- Rossoll W, Kroning AK, Ohndorf UM, Steegborn C, Jablonka S, Sendtner M (2002) Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? *Hum Mol Genet* 11: 93-105
- Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner Johnston A, Lefebvre C, Kang X, et al (1995) The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy [see comments]. *Cell* 80: 167-178
- Rudnik-Schoneborn S, Goebel HH, Schlote W, Molaian S, Omran H, Ketelsen U, Korinthenberg R, Wenzel D, Lauffer H, Kreiss-Nachtsheim M, Wirth B,

- Zerres K (2003) Classical infantile spinal muscular atrophy with SMN deficiency causes sensory neuronopathy. *Neurology* 60: 983-987
- Rudnik-Schoneborn S, Lutzenrath S, Borkowska J, Karwanska A, Hausmanowa-Petrusewicz I, Zerres K (1998) Analysis of creatine kinase activity in 504 patients with proximal spinal muscular atrophy types I-III from the point of view of progression and severity. *Eur Neurol* 39: 154-162
- Scharf JM, Endrizzi MG, Wetter A, Huang S, Thompson TG, Zerres K, Dietrich WF, Wirth B, Kunkel LM (1998) Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics. *Nat Genet* 20: 83-86
- Schmidt CE, Dai J, Lauffenburger DA, Sheetz MP, Horwitz AF (1995) Integrin-cytoskeletal interactions in neuronal growth cones. *J Neurosci* 15: 3400-3407
- Schrank B, Gotz R, Gunnensen JM, Ure JM, Toyka KV, Smith AG, Sendtner M (1997) Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9920-9925
- Sharma A, Lambrechts A, Hao IT, Le TT, Sewry CA, Ampe C, Burghes AH, Morris GE (2005) A role for complexes of survival of motor neurons (SMN) protein with gemins and profilin in neurite-like cytoplasmic extensions of cultured nerve cells. *Exp Cell Res* 309: 185-197
- Son YJ, Patton BL, Sanes JR (1999) Induction of presynaptic differentiation in cultured neurons by extracellular matrix components. *Eur J Neurosci* 11: 3457-3467
- Sotelo-Silveira JR, Calliari A, Kun A, Koenig E, Sotelo JR (2006) RNA trafficking in axons. *Traffic* 7: 508-515
- Sumner CJ (2007) Molecular mechanisms of spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* 22: 979-989

## 6 Bibliographie

---

- Suter DM, Forscher P (1998) An emerging link between cytoskeletal dynamics and cell adhesion molecules in growth cone guidance. *Curr Opin Neurobiol* 8: 106-116
- Wiese S, Pei G, Karch C, Troppmair J, Holtmann B, Rapp UR, Sendtner M (2001) Specific function of B-Raf in mediating survival of embryonic motoneurons and sensory neurons. *Nat Neurosci* 4: 137-142
- Wirth B (2000) An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat* 15: 228-237
- Wirth B, Brichta L, Hahnen E (2006a) Spinal muscular atrophy and therapeutic prospects. *Prog Mol Subcell Biol* 44:109-32
- Wirth B, Brichta L, Schrank B, Lochmuller H, Blick S, Baasner A, Heller R (2006b) Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Hum Genet* 119: 422-428
- Wu T, Ding XS, Li WL, Yao J, Deng XX (2005) Prenatal diagnosis of spinal muscular atrophy in Chinese by genetic analysis of fetal cells. *Chin Med J (Engl)* 118: 1274-1277
- Young PJ, Le TT, thi MN, Burghes AH, Morris GE (2000) The relationship between SMN, the spinal muscular atrophy protein, and nuclear coiled bodies in differentiated tissues and cultured cells. *Exp Cell Res* 256: 365-374
- Zerres K, Rudnik-Schoneborn S (1995) Natural history in proximal spinal muscular atrophy. Clinical analysis of 445 patients and suggestions for a modification of existing classifications. *Arch Neurol* 52: 518-523
- Zhang HL, Eom T, Oleynikov Y, Shenoy SM, Liebelt DA, Dichtenberg JB, Singer RH, Bassell GJ (2001) Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* 31: 261-275

Zhang HL, Singer RH, Bassell GJ (1999) Neurotrophin regulation of beta-actin mRNA and protein localization within growth cones. *J Cell Biol* 147: 59-70

## Danksagung

---

## Danksagung

Herrn Professor Dr. M. Sendtner möchte ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel sowie das mir entgegengebrachte Vertrauen und seine bereitwillige Unterstützung danken.

Für ihre kompetente, motivierende und geduldige Anleitung danke ich meiner Betreuerin, Frau Priv.-Doz. Dr. Sibylle Jablonka. Sie hat dadurch ohne Zweifel großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit.

Auch bei den (teilweise ehemaligen) wissenschaftlichen Mitarbeitern des Instituts für klinische Neurobiologie möchte ich mich für ihre kollegiale Hilfe und Unterstützung bedanken, allen voran Frau Dr. B. Holtmann, Frau Dr. N. Orel und Fr. Dr. N. Funk sowie Herrn D. Pühringer.

Meinem Doktoranden-Kollegen K. Rak danke ich sehr für die stets reibungslose Zusammenarbeit.

An Frau Ch. Schneider, MTA, richtet sich mein besonderer Dank für ihre geduldige Einarbeitung in die komplizierten Zellkulturmethoden und ihre zuverlässige Hilfe in technischen Angelegenheiten.

Ein großer Dank gilt nicht zuletzt auch meinen Eltern, die meine finanzielle Unterstützung während des Studiums wie selbstverständlich um ein halbes Jahr verlängert und damit eine Arbeit dieses Ausmaßes erst ermöglicht haben, sowie Herrn Dr. med. Th. Grünewald, der stets ein offenes Ohr und gute Ratschläge für mich hatte.

## Lebenslauf

**Barbara Dorothea Lechner**

**geb. am 15. Oktober 1981 in Weilheim i. OB**

### Schulbildung

- 09/1988 – 07/1992 **Grundschule Benediktbeuern**  
09/1992 – 06/2001 **Gymnasium Penzberg**, Abitur 2001, Note: sehr gut (1,0)

### Studium

- 10/2001 - 06/2008 **Studium der Humanmedizin**,  
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
- 09/2003 **Physikum (Ärztliche Vorprüfung)**, Note: gut (1,66)
- 10/2003 – 10/2006 **Klinische Praktika und Famulaturen**  
Schmerztherapie, Krankenhaus der Missionsbenediktinerinnen,  
Tutzing  
Neurologie, Royal Hallamshire Hospital, University of  
Sheffield (England)  
Kardiologie, Medizinische Klinik I, Universitätsklinik Würzburg  
Neuropädiatrie, Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus  
Virchow  
Pädiatrie, Hospital de Niños Dr. R. Gutiérrez, Buenos Aires  
(Argentinien)  
Kinder- und Jugendpsychiatrie, Klinik Hochried/Murnau am  
Staffelsee
- 02/2007 – 01/2008 **Praktisches Jahr**  
Medizinische Klinik I, Universitätsklinik Würzburg  
Freeman Hospital, University of Newcastle upon Tyne (England)  
Zentrum für Operative Medizin, Universitätsklinik Würzburg  
Klinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie, Psychosomatik und  
Psychotherapie, Universitätsklinik Würzburg
- 06/2008 **Staatsexamen Humanmedizin**, Note: sehr gut (1,0)

### Förderung und Auszeichnungen

- 11/2001 – 04/2007 **Stipendiatin der e-fellows.net GmbH**
- 03/2002 – 06/2008 **Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes e.V.**
- 11/2004 **6. Promomed-Kongress der Universität Würzburg**  
Präsentation der Doktorarbeit; ausgezeichnet mit dem 1. Preis in  
der Kategorie „Vorträge“