

**Lokale axonale Wirkungen der  
CNTF-STAT3 Signalkaskade  
in Motoneuronen der *pnn*-Maus - einem Mausmodell für die  
Amyotrophe Lateralsklerose**



**Dissertation**

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

Vorgelegt von

Nicolas Clemens Frank

geboren in Bamberg

Würzburg, Oktober 2015

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Erster Gutachter: Prof. Dr. Michael Sendtner

Zweiter Gutachter: Prof. Dr. Erich Buchner

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation wurden von Oktober 2007 bis Juli 2012 am Institut für Klinische Neurobiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg unter Betreuung von Prof. Dr. Michael Sendtner durchgeführt.

Für meine über alles geliebte Tochter Laura

# Inhaltsverzeichnis

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Zusammenfassung</b> .....	<b>7</b>
<b>2. Summary</b> .....	<b>9</b>
<b>3. Einleitung</b> .....	<b>10</b>
<b>3.1 Humane Motoneuronen Erkrankungen</b> .....	<b>10</b>
3.1.1 Amyotrophe Lateral Sklerose (ALS) .....	10
3.1.2 Spinale Muskelatrophie (SMA) .....	12
<b>3.2 Die <i>pnn-Maus</i> als Model für humane Motoneuronenerkrankungen</b> .....	<b>14</b>
<b>3.3 Funktion, Aufbau und Dynamik von Mikrotubuli</b> .....	<b>16</b>
<b>3.4 Stathmin als Regulator der dynamischen Instabilität von Mikrotubuli</b> .....	<b>20</b>
<b>3.5 Axonaler Mitochondrientransport in Motoneuronen</b> .....	<b>21</b>
<b>3.6 JAK/STAT signaling</b> .....	<b>23</b>
<b>3.7 Die Rolle von STAT3 im Nervensystem</b> .....	<b>25</b>
<b>4. Ziel der Arbeit</b> .....	<b>27</b>
<b>5 Material und Methoden</b> .....	<b>29</b>
<b>5.1 Material/Mauslinien</b> .....	<b>29</b>
5.1.1 Versuchstiere .....	29
5.1.1.1 <i>pnn</i> -Mauslinie .....	29
5.1.1.2 NFL-Cre Mauslinie .....	29
5.1.1.3 STAT3 <sup>flox/flox</sup> und STAT3 <sup>KO/wt</sup> Mauslinien .....	29
5.1.2 Zelllinien .....	30
5.1.2.1 PC12 Zelllinie .....	30
5.1.2.2 HEK293T Zellen .....	30
5.1.2.3 NSC-34 Zelllinie .....	30
5.1.3 Bakterienstämme .....	30
5.1.4 Antikörper .....	31
5.1.5 Nucleinsäuren .....	32
5.1.5.1 Vektoren .....	32
5.1.5.2 Mutagenese Oligomere .....	33
5.1.5.3 knock-down Oligomere .....	33
5.1.5.4 Sequenzieroligos für STAT3 .....	33
5.1.5.5 Genotypisierungsoligos .....	33
5.1.6 Chemikalien und Lösungsmittel .....	34
5.1.7 Puffer und Lösungen für Proteinbiochemie .....	34
5.1.8 Puffer zur Isolation mitochondrialer Proteine: .....	35
5.1.9 Organellenspezifische Farbstoffe für die Lebendzellbeobachtung .....	37
5.1.10 Puffer und Lösungen für Immunzytochemie .....	38
5.1.11 Kulturmedien .....	40
5.1.11.1 Kulturmedien für Zelllinien und primäre Zellen .....	40

# Inhaltsverzeichnis

5.1.11.2 Medien für Bakterienkulturen: .....	42
5.1.12 Kits .....	43
5.1.13 Technische Geräte .....	43
5.1.14 Software .....	44
<b>5.2 Methoden .....</b>	<b>45</b>
5.2.1 DNA Isolation aus Geweben .....	45
5.2.2 Transformation chemokompetenter Bakterien mit Plasmiden .....	45
5.2.3 Aufreinigung und Prozessierung von Plasmiden .....	46
5.2.4 Polymerase Ketten Reaktion (PCR) .....	49
5.2.5 Ortsspezifische Mutagenese .....	50
5.2.6 Kultur von embryonalen Motoneuronen der Maus .....	50
5.2.7 Genotypisierung .....	51
5.2.7.1 <i>pnn</i> -Mauslinie .....	51
5.2.7.2 STAT3 Mauslinien .....	54
5.2.8 DNA-Sequenzierung .....	55
5.2.9 Immunzytochemie .....	56
5.2.10 Westernblot Analyse .....	56
5.2.11 Organellenfärbung für Live-Imaging .....	57
5.2.12 Pharmakologische Inhibition der Transkription .....	58
5.2.13 Herstellung von Lentiviren .....	58
5.2.14 Fluoreszenz Recovery after Photobleaching (FRAP) .....	60
5.2.15 Kolokalisierung von Proteinen in Immunfluoreszenzfärbungen .....	62
5.2.16 Quantifizierung der Fluoreszenz-Intensität .....	63
5.2.17 Untersuchung des axonalen Transports .....	64
5.2.18 ATP-Assay .....	64
5.2.19 Isolierung einer Mitochondrienfraktion aus kultivierten Motoneuronen .....	65
<b>6. Ergebnisse .....</b>	<b>66</b>
<b>6.1 Welche Rolle spielt axonales STAT3 nach CNTF Applikation? .....</b>	<b>66</b>
6.1.1 CNTF, BDNF und GDNF sind vergleichbar in ihrer Fähigkeit das Überleben primärer Motoneurone zu unterstützen .....	66
6.1.2 Die Mobilität von axonalem STAT3 in primären embryonalen Motoneuronen- Transfektion von Motoneuronen mit STAT3-EYFP und EGFP .....	67
6.1.3 Generierung von Vektoren zur lentiviralen Überexpression von STAT3-EYFP .....	68
6.1.4 Analyse der axonalen Diffusion von EGFP in kultivierten Motoneuronen .....	69
6.1.5 Analyse der axonalen Mobilität von STAT3-EYFP nach CNTF-Gabe .....	72
6.1.6 Die Wirkung der CNTF-STAT3 Signalkaskade auf das Axonwachstum in <i>pnn</i> mutierten Motoneuronen ist transkriptionsunabhängig .....	77
6.1.7 Stathmin ist ein Ziel des CNTF/STAT3 Signalwegs .....	84
<b>6.2 Wie wirkt sich die Gabe von CNTF auf den axonalen Mitochondrientransport in <i>pnn</i> mutierten Motoneuronen aus? .....</b>	<b>87</b>
6.2.1 Axonaler Transport von Mitochondrien .....	87
6.2.2. Charakterisierung von Farbstoffeigenschaften zur Analyse des axonalen Transports in kultivierten Motoneuronen .....	87

# Inhaltsverzeichnis

6.2.3 CNTF und der knock-down von Stathmin retten das axonale Transportdefizit in <i>pnn</i> mutierten Motoneuronen .....	91
6.2.4 Analyse des Membranpotentials axonal transportierter Mitochondrien .....	94
6.2.5 CNTF steigert die Aufnahme von JC-1 in axonalen Mitochondrien .....	97
6.2.6 CNTF erhöht die ATP-Menge in kultivierten Motoneuronen .....	98
6.2.7 Kolokalisation von pSTAT3 <sup>S727</sup> mit Mitochondrien .....	100
6.2.7 CNTF rettet das reduziertes Axonwachstum primärer Motoneurone bei TBCB Knock down .....	103
<b>7. Diskussion .....</b>	<b>105</b>
<b>7.1 Die differentielle Wirkung von CNTF auf Axone .....</b>	<b>105</b>
<b>7.2 CNTF wirkt über STAT3 auf die Erhaltung von Axonen .....</b>	<b>106</b>
<b>7.3 STAT3 wirkt lokal im Axon von <i>pnn</i> mutierten Motoneuronen.....</b>	<b>107</b>
<b>7.4 Die lokale axonale Wirkung von STAT3 basiert auf der Interaktion mit Stathmin .....</b>	<b>109</b>
<b>7.5 Die CNTF induzierte pSTAT3Y705 – abhängige Interaktion mit Stathmin stabilisiert Mikrotubuli in <i>pnn</i> mutierten Motoneuronen.....</b>	<b>111</b>
<b>7.8 Axonaler Mitochondrientransport in <i>pnn</i> mutierten Motoneuronen .....</b>	<b>114</b>
7.8.1 CNTF und der knock-down von Stathmin beheben das axonale Transportdefizit in <i>pnn</i> mutierten Motoneuronen .....	114
7.8.2 CNTF steigert das Membranpotential von axonalen Mitochondrien in kultivierten Motoneuronen.....	117
<b>7.9 Versuch einer Synthese von lokaler axonaler Wirkung von STAT3 und der „signalling endosome Theorie“ .....</b>	<b>118</b>
<b>8. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>121</b>
<b>9. Erklärung.....</b>	<b>134</b>
<b>10. Publikationen.....</b>	<b>135</b>
<b>11. Danksagung .....</b>	<b>136</b>

### 1. Zusammenfassung

Während der Embryogenese und nach Verletzungen von Nerven regulieren neurotrophe Faktoren Signalwege für Apoptose, Differenzierung, Wachstum und Regeneration von Neuronen. *In vivo* Experimente an neugeborenen Nagern haben gezeigt, dass der Verlust von Motoneuronen nach peripherer Nervenläsion durch die Behandlung mit GDNF, BDNF, und CNTF reduziert werden kann. In der *pmn*-Mausmutante, einem Modell für die Amyotrophe Lateralsklerose, führt die Gabe von CNTF, nicht aber von GDNF zu einem verzögerten Krankheitsbeginn und einem verlangsamten Fortschreiten der Motoneuronendegeneration. Auslöser der Motoneuronendegeneration in der *pmn*-Maus ist eine Mutation im Tubulin spezifischen Chaperon E (Tbce) Gen, das für eines von fünf Tubulin spezifischen Chaperonen (TBCA-TBCE) kodiert und an der Bildung von  $\alpha/\beta$ -Tubulinheterodimeren beteiligt ist. Diese Arbeit sollte dazu beitragen, die CNTF-induzierten Signalwege zu entschlüsseln, die sich lindernd auf den progredienten Verlauf der Motoneuronendegeneration in der *pmn*-Maus auswirken.

Primäre *pmn* mutierte Motoneurone zeigen ein reduziertes Axonwachstum und eine erhöhte Anzahl axonaler Schwellungen mit einer anomalen Häufung von Mitochondrien - ein frühes Erkennungsmerkmal bei ALS-Patienten. Die Applikation von CNTF nicht aber von BDNF oder GDNF, kann *in vitro* die beobachteten Wachstumsdefekte und das bidirektionale axonale Transportdefizit in *pmn* mutierten Motoneurone verhindern.

Aus älteren Untersuchungen war bekannt, dass CNTF über den dreiteiligen transmembranen Rezeptorkomplex, bestehend aus CNTFR $\alpha$ , LIFR $\beta$  und gp130, Januskinasen aktiviert, die STAT3 an Tyrosin 705 phosphorylieren (pSTAT3<sup>Y705</sup>). Ich konnte beobachten, dass axonales fluoreszenzmarkiertes pSTAT3<sup>Y705</sup> nach CNTF-Gabe nicht retrograd in den Nukleus transportiert wird. Stattdessen führt die CNTF-induzierte Phosphorylierung von STAT3 an Tyrosin 705 zu einer transkriptionsunabhängigen lokalen Reaktion im Axon. Diese pSTAT3<sup>Y705</sup> abhängige Reaktion ist notwendig und ausreichend, um das reduzierte Axonwachstum *pmn* mutierter Motoneurone zu beheben. Wie die Kombination einer CNTF Behandlung mit dem shRNA vermittelten knock-down von Stathmin in *pmn* mutierten Motoneuronen zeigt, zielt die CNTF-STAT3 Signalkaskade auf die Stabilisierung axonaler Mikrotubuli ab und wirkt sich positiv auf die anterograde und retrograde Mobilität von axonalen Mitochondrien aus.

Interessanter Weise konnte ich außerdem feststellen, dass eine akute Gabe von CNTF das mitochondriale Membranpotential in Axonen primärer *pmn* mutierter und wildtypischer

## Zusammenfassung

Motoneurone erhöht und einen Anstieg von ATP auslöst. Meine Beobachtungen legen nahe, dass CNTF unerwarteter Weise auch eine transiente Phosphorylierung an STAT3 Serin 727 (pSTAT3<sup>S727</sup>) auslöst, die zur anschließenden Translokation von pSTAT3<sup>S727</sup> in Mitochondrien führt. Diese Ergebnisse zeigen, dass STAT3 mehrere lokale Ziele im Axon besitzt, nämlich axonale Mikrotubuli und Mitochondrien.

## Summary

### 2. Summary

Both during development and after injury neurotrophic factors induce signaling pathways that regulate apoptosis, differentiation, growth and regeneration of neurons. In newborn rodents, treatment with GDNF, BDNF and CNTF can reduce the loss of motoneurons after peripheral nerve lesion. In the *pnn* mutant mouse, a model for amyotrophic lateral sclerosis, CNTF but not GDNF delays disease onset and slows down the course of motoneurons degeneration. *Pnn* mutant mice, suffer from a point mutation in tubulin specific chaperon E (Tbce) gene that codes for one of five tubulin specific chaperones (TBCE) and is necessary for proper  $\alpha/\beta$ -tubulin heterodimer formation. The work presented here was designed to study the specific signaling pathways that are used by CNTF for attenuating progression of motoneuron degeneration in *pnn* mutant mice.

Primary motoneurons from *pnn* mutant mice show reduced axon growth and irregular axonal swellings with abnormal accumulation of mitochondria – an early hallmark of pathology in ALS patients. *In vitro*, CNTF but not BDNF or GDNF was able to rescue defective axon growth and to prevent bidirectional transport interruption.

It has already been shown that CNTF acts via the tripartite transmembrane receptor complex, composed of CNTFR $\alpha$ , LIFR $\beta$  and gp130 to recruit Janus kinases that subsequently phosphorylate STAT3 on tyrosine 705 (pSTAT3<sup>Y705</sup>). After application of CNTF, I observed that axonal pSTAT3<sup>Y705</sup> fused to a fluorescent tag is not retrogradely transported to the nucleus. In contrast, CNTF induced phosphorylation of STAT3 at tyrosine 705 leads to a transcriptional independent local reaction in motor axons which is necessary and sufficient to rescue axon growth in *pnn* mutant motoneurons. Combining CNTF treatment with shRNA mediated knock-down of Stathmin in *pnn* mutant motoneurons shows that CNTF-STAT3 signaling leads to microtubule stabilization in axons as well as improving anterograde and retrograde mobility of axonal mitochondria.

Interestingly, I additionally found that an acute application of CNTF increases the membrane potential of axonal mitochondria that is accompanied with a rise of ATP levels in *pnn* mutant and wildtype motoneurons. Unexpectedly, I found STAT3 phosphorylated on serine 727 co-localizing with mitochondria after CNTF application. These results demonstrate that multiple local targets of STAT3 exist in axons that modulate structure and function of microtubules and mitochondria.

## 3. Einleitung

### 3.1 Humane Motoneuronen Erkrankungen

Humane Motoneuronen Erkrankungen sind gekennzeichnet durch Funktionsverlust und progredienten Zelltod der Nervenzellen, die für Aktivierung der Muskulatur notwendig sind. Beim gesunden Menschen leiten z.B. die Motoneurone des motorischen Cortex (oberes oder 1. Motoneuron) ihre Signale an Motoneurone des Hirnstamms und des Rückenmarks (unteres oder 2. Motoneuron) weiter. Letztere innervieren die Zielmuskulatur, um dort die Kontraktion einzelner Muskelfasern oder Muskelbündel zu steuern. Bei Patienten mit Motoneuronen-Erkrankung können sich Pathologien auf das obere (z.B. Primäre Lateral Sklerose) bzw. untere (z.B. infantile spinale Muskelatrophie) Motoneuron beschränken, oder aber das obere und das untere Motoneuron gemeinsam betreffen (Amyotrophe Lateral Sklerose; ALS). Es können familiäre Motoneuron Erkrankungen (spinale Muskelatrophie, Hereditäre Spastische Spinalparese, familiäre Form der ALS) von sporadisch auftretenden Motoneuron Erkrankungen (sporadische ALS) in Ätiologie und Pathogenese unterschieden werden.

#### 3.1.1 Amyotrophe Lateral Sklerose (ALS)

Mit einer weltweiten Inzidenz von 0.6-2.4 Personen pro 100000 Einwohner und Jahr ist die ALS die häufigste degenerative Motoneuronen Erkrankung des erwachsenen Menschen. Das mittlere Alter bei Diagnosestellung beträgt 50-70 Jahre, jedoch finden sich auch Krankheitsausbrüche bei jungen Erwachsenen; Männer sind von der Erkrankung häufiger betroffen als Frauen (1,6 zu 1). Bei der ALS wird zwischen der familiären (fALS) Form, die etwa 10% aller ALS-Erkrankungen stellt, und der sporadischen ALS (sALS) Form unterschieden. Bei beiden Formen sind jedoch immer das obere und das untere Motoneuron betroffen. Die Krankheit ist unheilbar, als Haupttodesursache gilt respiratorische Insuffizienz. Es wird angenommen, dass die Ätiologie durch ein multifaktorielles Zusammenspiel mehrerer fehlgesteuerter Prozesse begründet liegt. Hypothesen diesbezüglich adressieren den Glutamat-Haushalt (Glutamat Erregungstoxizität), inflammatorische Reaktionen (McCombe & Henderson 2011), Defekte bei der mRNA-Prozessierung (Lagier-Tourenne et al. 2010) und dem synaptischen Vesikel- und axonalen Mitochondrientransport (Puls et al., 2003; Nishimura et al., 2004).

Bei fast allen ALS-Erkrankten findet man histologisch Ubiquitin positive Proteinaggregate die z.B. TAR DNA-Bindingprotein 43 (TDP-43), Tau und alpha-Synuclein als auch Neurofilament enthalten (Neumann et al., 2006;Wilhelmsen et al., 2004;Bossy-Wetzel,

## Einleitung

Schwarzenbacher, & Lipton, 2004; Cleveland & Rothstein, 2001). Bis ins Jahr 2011 galt eine autosomal dominante Mutation im Gen der Cu/Zn-Superoxid Dismutase-1 (*als1*) als häufigste Ursache für das Auftreten der fALS. Jüngere Untersuchungen haben im Gen *C9orf72* Hexanucleotide-Expansionsen aufgedeckt (Renton et al., 2011; DeJesus-Hernandez et al., 2011), die in populationsabhängigen Untersuchungen von ALS-Patientengruppen eine höhere Frequenz aufweisen als die bekannten SOD1 Mutationen. Die Funktion des Genprodukts ist bisher unbekannt. Jedoch konnte C9ORF72 in mehreren Hirnregionen und dem Rückenmark nachgewiesen werden. Ein pathologischer Befund bei ALS-Patienten sind Neurofilament-Ablagerungen und es konnte gezeigt werden, dass es durch mutiertes SOD1 zur Hyperphosphorylierung der mittelschweren und schweren Kette des Neurofilaments kommt, wodurch auch deren Transport eingeschränkt wird (Ackerley et al. 2003). Nicht nur pathologische Veränderungen am Zytoskelett sondern auch Mitochondrien spielen vermutlich bei ALS eine Rolle. Es wird angenommen, dass mutiertes SOD1 die ATP-Synthese reduziert, weil es die Elektronentransportkette beeinträchtigt (Mattiazzi et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass mutiertes SOD1 selektiv den anterograden Mitochondrientransport verschlechtert (De Vos et al. 2007). Die zuletzt genannten Auswirkungen von mutiertem SOD1 führen zu der Frage, ob primär ein Transportdefekt die Bildung von Proteinaggregaten auslöst oder es die Proteinaggregate selbst sind, die durch die Verblockung des Axons den Transport einschränken.

Häufig auftretende axonale Schwellungen in unteren Motoneuronen sind ein frühes Erkennungsmerkmal bei ALS-Patienten (Delisle & Carpenter 1984). Bei kultivierten Motoneuronen der *pnn*-Maus, einem Mausmodell für humane Motoneuronenerkrankungen, konnte zudem nachgewiesen werden, dass die Schwellungen unter anderem auch dysmorphe Mitochondrien enthalten (Selvaraj et al. 2012). Eine pathologische Veränderung der Mitochondrienmorphologie könnte ebenfalls als Ursache für axonale Transportdefizite in Motoneuronen in Betracht kommen (Kaasik et al. 2007).

Es ist leicht vorstellbar, dass Störungen im axonalen Transport die Unterversorgung von distal gelegenen Zellkompartimenten verursachen oder zur Unterbrechung lebenserhaltender retrograd transportierter Signale des Zielgewebes führen könnten – die Konsequenz wäre in beiden Fällen der Funktionsverlust des Motoneurons.

## Einleitung

### 3.1.2 Spinale Muskelatrophie (SMA)

Die spinalen Muskelatrophien sind eine heterogene Gruppe neuromuskulärer Erkrankungen, die sich durch den Untergang des zweiten (unteren) Motoneurons auszeichnen. In ihrer schwersten Ausprägung ist die SMA vom Typ I eine im Kindesalter letal verlaufende neurodegenerative Erkrankung. Mit einem Auftreten von 1:5000 Geburten stellt diese Erkrankung die häufigste monogenetisch verursachte Todesursache bei diesen Patienten dar. Die Ursache der SMA sind autosomal rezessiv vererbte Mutationen bzw. die Deletion des *survival-of-motoneuron 1* Gens (*SMN1*).

Das *SMN*-Gen liegt im Mensch in Form einer telomeren (*SMN1*) und einer zentromeren Kopie (*SMN2*) vor. *SMN1* und *SMN2* sind auf Nucleotidebene zu 99% identisch und codieren beide für ein 294 Aminosäuren langes Protein (Lefebvre et al. 1995). Mutationen im *SMN1*-Gen sind der Auslöser der SMA, das *SMN2* dagegen modifiziert den Schweregrad der SMA (Hsieh-Li et al. 2000; Feldkötter et al. 2002). Nur *SMN1* bildet die Grundlage für eine ausreichende Menge voll funktionsfähigen Proteins. Das *SMN2*-Gen dagegen weist eine Transition 840C-T an der Position +6 im Exon 7 auf. Diese stille Mutation verändert eine Spleißakzeptorstelle (Monani 1999), die beim Reifen der mRNA zu 90% den Verlust von Exon 7 zur Folge hat und nur 10% funktionsfähiges Protein entstehen lässt. Beim Menschen variiert die Kopienanzahl des *SMN2*-Gens, wodurch die Gendosis und damit die Fähigkeit zur Kompensation eines zugrundeliegenden *SMN1* Gendefekts verschieden ist (Wirth et al. 2006). Um die molekularen Mechanismen studieren zu können, die durch den Verlust von SMN entstehen, sind bereits eine Reihe von Mausmodellen etabliert worden, die jeweils einem SMA Typ zugeordnet werden können. (vgl. Tabelle 1).

Das SMN Protein spielt eine entscheidende Rolle bei der Assemblierung des snRNP (small nuclear ribonucleoprotein)-Komplexes und bei der Reifung von Spleißosomen (Burghes & Beattie 2009). *In vitro* als auch *in vivo* konnte eine Akkumulation von SMN in Axonen und Wachstumskegeln von Neuronen nachgewiesen werden (Rossoll, 2002; Zhang et al., 2003; Fallini et al., 2011). In Kulturen von *Smn*<sup>-/-</sup>; *SMN2*<sup>tg</sup> Motoneuronen konnten Rossoll und Kollegen des Weiteren ein reduziertes Axonwachstum und kleinere Wachstumskegel finden, während Überleben und Dendritenwachstum dieser Kulturen nicht beeinflusst waren. Die Axon spezifischen Auswirkungen eines Verlusts von *Smn* deuten auf eine besondere Funktion von SMN in distalen Zellkompartimenten hin (Rossoll 2002). In einer weiteren Arbeit konnte Rossoll et al. anschließend zeigen, dass das reduzierte Axonwachstum kultivierter Motoneuronen bei SMN-Defizienz mit dem Verlust von  $\beta$ -Aktin-mRNA und -Protein im Axon und Wachstumskegeln einhergeht. Bemerkenswert ist, dass scheinbar die Gesamtmenge

## Einleitung

von  $\beta$ -Aktin in solchen Motoneuronen nicht reduziert ist (Rossoll 2003). Die ektopische Expression von mutiertem *Smn*, das noch immer die Assemblierung des snRNP-Komplexes unterstützt, kann das reduzierte Axonwachstum in kultivierten von *Smn*<sup>-/-</sup>; SMN2<sup>tg</sup> Motoneuronen nicht beheben (Carrel et al. 2006). Dagegen führt die Wiederherstellung wildtypischer  $\beta$ -Aktin-mRNA und -Proteinlevel dazu, das bei *Smn*<sup>-/-</sup>;SMN2<sup>tg</sup> Motoneuronen gefundene reduzierte Axonwachstum zu beheben (Jablonka et al. 2007; Ning et al. 2010). Diese Beobachtungen stützen die Hypothese, wonach SMN Teil eines axonalen Transportkomplexes ist, der entlang von Mikrotubuli RNA zwischen Soma und Wachstumskegeln befördert (Pagliardini, 2000; Fallini et al., 2011b). Dass SMN dabei direkt an mRNA bindet und deren axonalen Transport kontrolliert, konnte bisher nicht gezeigt werden. Aber eine Reihe RNA bindender Proteine wie das „zipcode binding protein“ ZBP1, ZBP2, heteronukleäre RNPs R und Q sowie HuD (*ELAV4*) wurden als SMN-Interaktionspartner in axonal transportierten „RNA-granules“ identifiziert (Mourelatos et al. 2001; Rossoll 2002; Glinka et al. 2010; Hubers et al. 2011; Fallini et al. 2011).

Erst vor kurzem konnte gezeigt werden, dass Stathmin/Op18, ein Mikrotubuli (MT) destabilisierendes Protein, als Modulator für die Ausprägung der SMA in Frage kommt. Normalerweise wird Stathmin postnatal herunter reguliert, zeigt aber in *Smn*<sup>-/-</sup>;SMN2<sup>tg</sup> Mäusen eine erhöhte Aktivität (Wen et al. 2010; Wen et al. 2013). Daher könnte Stathmin ein vielversprechendes therapeutisches Ziel bei der Intervention neurodegenerativer Erkrankungen darstellen.

Die in der Tabelle 1 genannten Studien zeigen, dass die Kopienzahl von SMN2 bei Trägern der homozygoten SMN1-Deletion den SMA Typ entscheidend beeinflusst. Diese Studien legen allerdings auch nahe, dass andere Proteine diese Motoneuronen-Pathologie beeinflussen, z.B. NAIP (Samilchuk et al. 1996), plastin-3 (Stratigopoulos et al. 2010) oder Stathmin (Wen et al. 2010).

## Einleitung

<b>Mausmodell</b> (Erstbeschreibung)	<b>SMA Typ</b>	<b>Anzahl der SMN2 Kopien bei gleichzeitiger SMN1 Defizienz</b>
<i>Smn</i> <sup>-/-</sup> ; <i>SMN2</i> <sup>tg</sup> Hsieh-Li et al., 2000 Monani et al.2000	Typ I	< 3 Mailman et al. 2002
<i>Smn</i> <sup>-/-</sup> ; <i>SMN2</i> <sup>tg</sup> Δ7 (Frugier et al. 2000)	Typ II	3
<i>Smn</i> <sup>+/-</sup> (Jablonka et al. 2000)	Typ III-IV	Mindestens 3 (Mailman et al.,2002) Krankheitsbeginn im Kindesalter: 2-5 Erwachsene: 4 – 6 (Wirth et al. 2006)
---	asymptomatisch	4-5 (Jedrzejowska et al. 2008), Wirth et al. (2006), (Prior et al. 2004)

**Tabelle 1:** Etablierte Mausmodelle für die spinale Muskelatrophie (SMA).

### 3.2 Die *pnn*-Maus als Model für humane Motoneuronerkrankungen

Die *pnn* (progressiv motoneuronopathy)-Mauslinie entstand durch eine spontane Mutation in einer Kolonie von NMRI Mäusen am Panum Institut in Dänemark (Schmalbruch et al., 1991). Heterozygote Mäuse sind klinisch unauffällig und nicht von wildtypischen Mäusen zu unterscheiden. Homozygot *pnn* mutierte Mäuse sind bis zum Ende der 2. postnatalen Woche klinisch unauffällig, jedoch schwächer. Zu Beginn der 3. postnatalen Woche entwickeln sie eine progrediente Muskelschwäche der Hinterläufe, die rasch voranschreitet und innerhalb von 3-4 Wochen nach Krankheitsbeginn zum Tod durch respiratorische Insuffizienz führt (Schmalbruch et al. 1991).

Histologisch sind eine Atrophie und ein Verlust motorischer Axone in peripheren Nerven sowie der Motoneuronenzellkörper im Rückenmark und in den motorischen Kernen des Hirnstamms zu erkennen (Sendtner, Schmalbruch, et al. 1992). Des Weiteren zeigt sich die spezifische Degeneration der Motoneuronen auch im Nucleus ruber (Schmalbruch et al. 1991). Projektionen aus diesem Kerngebiet zu den spinalen Motoneuronen sind bei Nagern

## Einleitung

funktionell mit dem Tractus corticospinalis verknüpft und tragen signifikant zur Innervation von spinalen Motoneuronen bei. Dies entspricht der funktionellen Innervation des 2. Motoneurons durch das 1. Motoneuron aus dem Cortex bei höheren Vertebraten (Jablonka et al. 2004).

Bereits in den 1990er Jahren erkannte man, dass der neurotrophe Faktor CNTF in der Lage ist, verletzte Motoneurone vor dem Untergang zu schützen (Sendtner et al. 1990). Sendtner et al. konnten zeigen, dass die Behandlung von *pnn* Mäusen mit CNTF den Krankheitsverlauf und den Verlust von Motoneuronperikarya verzögert (Sendtner, Schmalbruch, et al. 1992). Die CNTF abhängige Aufrechterhaltung der axonalen Funktionalität scheint besonders zu sein, da weitere neurotrophe Faktoren wie GDNF (Henderson et al. 1994; Sagot et al. 1996), BDNF (Arakawa et al. 1990) und NT-3 (Haase et al. 1998) den Verlust der Motoneuronzellkörper reduzieren, jedoch keinen protektiven Effekt auf das Axon haben. Primäre embryonale Motoneuronen aus *pnn*-Mäusen weisen keine Unterschiede in der Überlebensrate verglichen mit Motoneuronen aus Kontrolltieren auf. Dagegen zeigen Axone *pnn* mutierter Motoneurone unregelmäßige axonale Schwellungen und ein reduziertes Axonwachstum (Bommel et al. 2002). Die Verkreuzung von transgenen Bcl-2 überexprimierenden Mäusen mit *pnn*-Mäusen führte zwar zur Rettung der Motoneuronenzellkörper des *N. facialis* und des *N. phrenicus*, konnte jedoch die axonale Degeneration, fortschreitende Muskelschwäche und das Überleben der Mäuse nicht beeinflussen (Sagot et al. 1995).

Als Ursache für den *pnn*-Phänotyp konnte eine Punktmutation (t1682g) im *Tbce* (*Tubulin-spezifischen Chaperon E, Cofactor E*) Gen identifiziert werden. Diese Mutation führt zu einem Aminosäureaustausch von Tryptophan zu Glycin (W524G) an der letzten Position des C-Terminus des Proteins (Bommel et al. 2002; Martin et al. 2002). Warum eine Mutation im ubiquitär exprimierten TBCE (Bommel et al. 2002; Martin et al. 2002) sich selektiv auf Motoneurone auswirkt, konnte bis heute nicht geklärt werden.

Die *pnn*-Maus weist, als Resultat einer geringeren Stabilität des mutierten TBCE, während der Pathogenese eine zunehmende Abnahme der Dichte axonaler MT in *N. phrenicus* auf, die mit dem retrograden Absterben der Axone im Nerv einher geht. Die Überexpression von wildtypischem TBCE in *pnn*-Mäusen führt zur Aufrechterhaltung der MT in Axonen des *N. phrenicus* und zur Rettung des *pnn*-Phänotyps (Martin et al. 2002; Schaefer et al. 2007).

Die Tatsache, dass *pnn*-Mäuse während ihrer Embryonalentwicklung normale neuromuskuläre Verbindungen aufbauen und phänotypisch gesund geboren werden, weist

## Einleitung

eine Ähnlichkeit mit der humanen SMA auf und lässt vermuten, dass TBCE erst in der postnatalen Periode klinisch relevant wird.

### 3.3 Funktion, Aufbau und Dynamik von Mikrotubuli

Zellen besitzen zur Erhaltung ihrer Form und Stabilität ein Zytoskelett. Dieses besteht aus Proteinfilamenten, die man in drei Gruppen unterteilen kann: 1) Mikrofilamente (z.B. F-Aktin), 2) Intermediärfilamente und 3) Mikrotubuli. In der *pnm*-Maus sind letztere durch die Mutation im Tubulin spezifischen Chaperon E (TBCE) direkt betroffen, daher sollen Funktion und Aufbau und Dynamik der MT näher betrachtet werden.

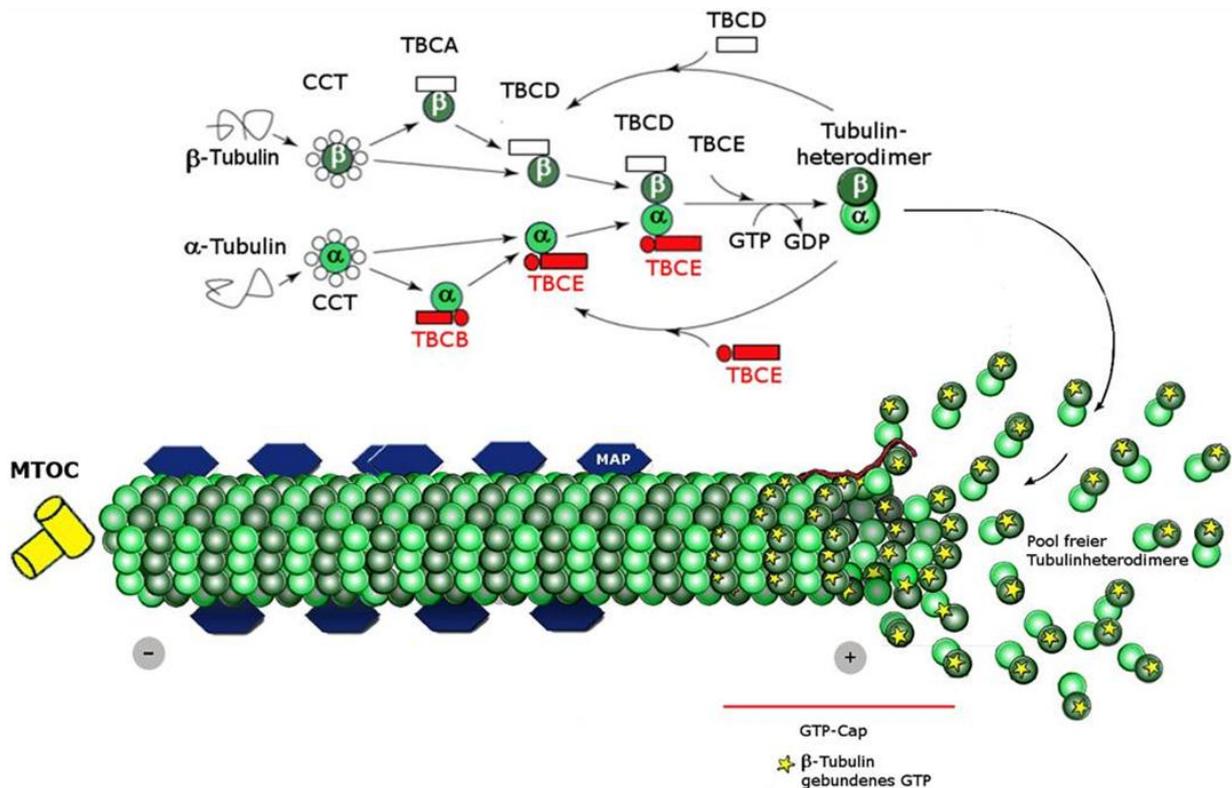
Als formgebendes Zytoskelettprotein initialisieren besonders stabilisierte MT die Polarisierung in Neuronen (Witte et al., 2008; Li et al., 2011) und dienen als Spur für Kinesin und Dynein vermittelten Langstreckentransport von Organellen (Hollenbeck and Saxton, 2005; Marinkovic et al., 2012), während besonders dynamische Mikrotubuli im Wachstumskegel von Axonen die notwendige Flexibilität bei der axonalen Wegfindung ermöglichen (Sutter et al., 2004; Kalil and Dent, 2005).

Tubulin:

Die strukturelle und funktionale Untereinheit der Mikrotubuli ist das Tubulin-Heterodimer, das seinerseits aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin Untereinheiten aufgebaut ist. Die ungefalteten  $\alpha$ - und  $\beta$ -Polypeptide erhalten ihre Konformation durch Bindung an Prefoldin, das diese nachfolgend an das zytosolische Chaperonin CCT übergibt. Durch anschließende GTP- und ATP-Hydrolyse werden die Proteine in eine Protease resistente Form überführt. Diese Tubulin-Intermediate werden durch TBCB (TBCB/ $\alpha$ ) und TBCE (TBCE/ $\beta$ ) gebunden. Alpha- und  $\beta$ -Tubulin wird anschließend auf die Chaperone TBCE beziehungsweise TBCD übertragen. Die Heterodimerisierung erfolgt nach Zusammenlagerung von TBCE/ $\alpha$  und TBCD/ $\beta$ -Tubulin zu einem Superkomplex der mit TBCC interagiert (Tian et al. 1996; G Tian et al. 1997). Durch diese Interaktion kommt es zur  $\beta$ -Tubulin vermittelten Hydrolyse von  $\alpha$ -Tubulin gebundenem GTP und zum anschließenden Zerfall des Superkomplexes, der das Heterodimer freisetzt und für die Polymerisierung in MT bereitstellt (Tian et al. 2010). Bislang wird auch angenommen, dass TBCB, TBCD und TBCE als Reservoir für recycelte Tubulinmonomere dienen, um in Phasen der Assemblierung bereits gefaltete Tubulin-Untereinheiten bereit zu stellen (Lundin et al. 2010).

## Einleitung

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass TBCE und TBCD in der Lage sind, Tubulin-Heterodimere zu dissoziieren, und dass die dissoziative Aktivität von TBCE durch die Interaktion mit TBCB verstärkt wird (Kortazar et al. 2007).



**Abbildung 1: Tubulin-Faltung und -Heterodimerisierung sowie Assemblierung am, durch GTP stabilisierten, plus Ende von Mikrotubuli. (Abbildung nach Szolajka E, Chroboczek J; 2011)**

Mikrotubuli (MT) bestehen aus 13 Protofilamenten die polar aufgebaut sind und durch Kopf-Schwanz Juxtaposition der  $\alpha/\beta$ -Heterodimere eine zylindrische Struktur mit ca. 25 nm Durchmesser bilden. MT sind in sich polar aufgebaut und weisen mit ihrem, ständig zwischen Polymerisation und Depolymerisation wechselnden, Plus-Ende stets zum Wachstumskegel bzw. der Präsynapse, während das weniger dynamische Minus-Ende zum „*microtubule organizing center*“ (MTOC) hin orientiert ist. Dendritische MT sind im Gegensatz zu axonalen MT in der Orientierung variabel (Baas et al. 1988; Baas 1989).

Die Anlagerung freier Tubulinheterodimere an bestehende MT bzw. die Depolymerisation von MT erfolgt intermittierend und wird als dynamische Instabilität bezeichnet (Mitchison & Kirschner 1984). Die „turnover“-Rate, d.h. die Geschwindigkeit, mit der ein Heterodimer zwischen einem in MT inkorporierten und einem freien zytoplasmatischen Zustand wechselt, wird durch eine Reihe von Mechanismen gesteuert, die nachfolgend beschrieben werden sollen.

## Einleitung

### a) Das GTP cap

Aus dem Chaperon/Tubulin-Superkomplex freigesetzte und unmittelbar inkorporierte Tubulinheterodimere besitzen ein an die  $\beta$ -Untereinheit gebundenes GTP (GTP-Tubulin). Es konnte gezeigt werden, dass dieses GTP nicht die Polymerisierung von MT beeinflusst, sondern essentiell für deren Depolymerisation ist (Hyman et al. 1992). Die aus der Hydrolyse des GTP freigesetzte Energie wird von der Struktur der MT aufgenommen, schwächt die lateralen Bindungen zwischen den einzelnen Protofilamenten und begünstigt die Depolymerisierung (Caplow et al. 1994). Zhang Y. et al. demonstrierte jedoch in einem Modell zur dynamischen Instabilität, dass unter anderem die zytoplasmatische Konzentration von GTP-Tubulin für die Polymerisierungsgeschwindigkeit und daher für die Existenz eines stabilisierenden GTP-caps kritisch ist (Zhang 2011).

### b) Posttranslationale Modifikationen (PTM)

Posttranslationale Modifikationen an Tubulinen der MT verändern die „turn-over“ Rate und können dadurch stabilisierend wirken. Tyrosinierung und Acetylierung von  $\alpha$ -Tubulin sind bekannte PTMs und Marker für dynamische bzw. stabile MT. An MT erfolgt die Acetylierung von  $\alpha$ -Tubulin bzw. dessen C-terminale Detyrosinierung allmählich. Daher lässt sich von acetylierten MT auf solche MT mit geringen „turn-over“ Raten schließen während tyrosinierte MT dagegen häufig zwischen Polymerisation und Depolymerisation wechseln (Witte et al. 2008). Die Acetylierung und Detyrosinierung von Tubulin können durch Deacetylasen wie Histon Deacetylase 6 (HDAC6, (Hubbert et al. 2002)) oder Sirtuin Typ 2 (SIRT2, (North et al. 2003)) bzw. Tyrosinligasen (Tubulin Tyrosin Ligase (Raybin & Flavin, 1975;Prota et al., 2013)) wieder rückgängig gemacht werden. Durch Detyrosinierung und darauffolgende irreversible Abspaltung des Glutamat-Rests entsteht  $\Delta 2$ -Tubulin, das als Marker stabilster MT gilt. Die Detyrosinierung selbst trägt anscheinend nicht direkt zur Langlebigkeit von MT bei (Khawaja et al. 1988). Es ist eher anzunehmen, dass  $\Delta 2$ -Tubulin weniger sensibel gegenüber der MT-depolymerisierenden Eigenschaft von Kinesin-Motorproteinen wie MCAK oder KIF2A ist (Peris et al. 2009).

PTMs dienen auch als Codierung und können in unterschiedlichen Kombinationen auftreten. Durch Ihren Einfluss auf die Ladungsverteilung entlang der MT-Oberflächenstruktur, beeinflussen sie auch das Bindeverhalten von Motorproteinen (Bormuth et al. 2009) und Mikrotubuli assoziierten Proteinen (MAP) (Bonnet et al. 2001). Kinesin 1 (KIF5) wird beispielsweise in differenzierenden Neuronen in dem Neurit gefunden, der sich später zum Axon entwickelt (Jacobson et al. 2006). Als Ursache für diese kompartimentalisierte

## Einleitung

Akkumulation von KIF5 gilt ebenfalls die Häufung von detyrosinierten MT (Dunn et al. 2008).

Es gibt einige Hinweise, dass die Deacetylierung von MT an der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt ist, da molekulare Motoren wie Kinesin-1 und Dynein bevorzugt an acetylierte MTs binden und entlang acetylierter MTs mobiler sind (Reed et al., 2006; Dompierre et al., 2007; Hammond et al., 2010).

### c) Mikrotubuli assoziierte Proteine (MAPs)

Die dynamische Instabilität von MTs wird des Weiteren, aufbauend auf den PTMs, von MAPs wie Tau/phospho-Tau, MAP1b und MAP2 beeinflusst, die eine spezifische subzelluläre Verteilungen aufweisen (Janke & Kneussel 2010). Das Tau Protein ist das im Axon am häufigsten vorkommende MAP. Es reguliert die MT-Stabilität, ist Distanzhalter zwischen einzelnen MT (Chen et al. 1992) und dient als Anker für Enzyme (Sontag et al. 1999). Tau reguliert durch Interaktion mit Motorproteinen den Langstreckentransport von Mitochondrien, Vesikeln und Nucleoproteinen (Stamer et al. 2002). Bei der Alzheimer Erkrankung, sind Hyperphosphorylierung von Tau, Tau positive Aggregationen neurofibrillärer Strukturen sowie eine Fehlverteilung von Tau in Soma und Dendriten charakteristisch (Garcia & Cleveland 2001). Ob pathologisch veränderte PTM für ein verändertes Bindeverhalten von Tau an MT verantwortlich ist, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Jedoch ist für spezifische Tau-Mutanten der Frontotemporalen Demenz und Parkinsonismus (FTDP) seit längerem bekannt, dass diese eine reduzierte Affinität gegenüber MT aufweisen (Lu & Kosik 2001).

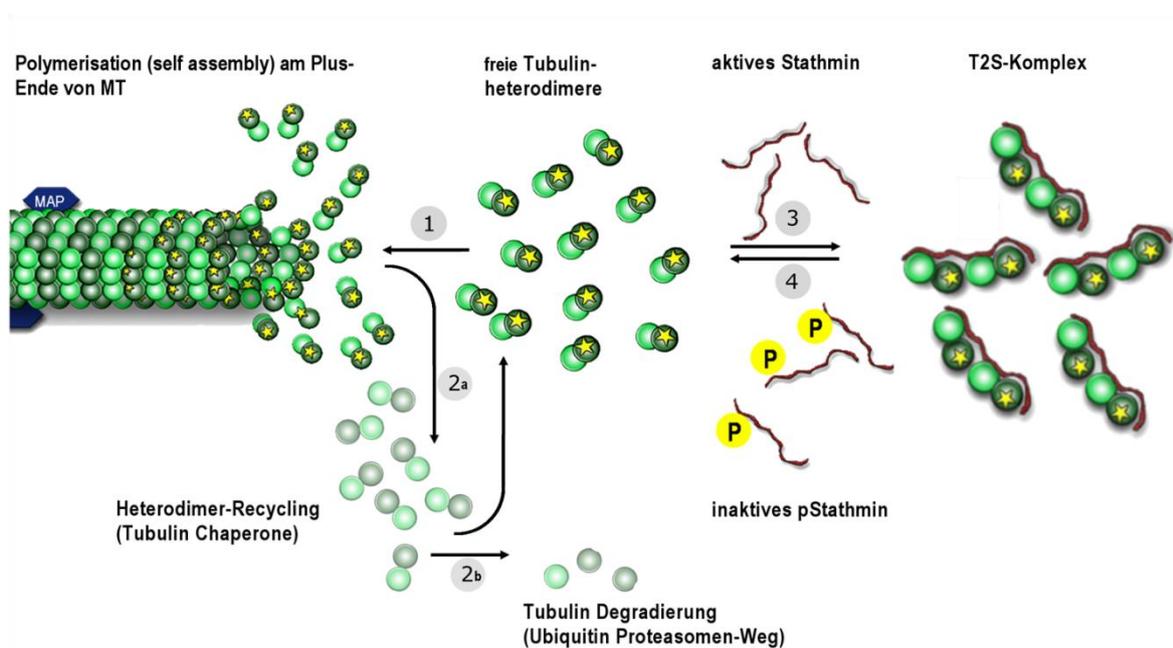
Die Bindung von MAPs an MT kann beispielweise durch Serin/Threonin spezifische Kinasen wie die Glykogen Synthase Kinase 3 $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) oder AKT reguliert werden. Diese Kinasen sind zu Beginn in allen Neuriten vorhanden. Während der Differenzierung bleibt AKT beispielsweise nur im späteren Axon aktiv, während es in den restlichen Neuriten selektiv degradiert wird (Yan et al. 2006). Die Kinase-Aktivität von GSK-3 $\beta$  reguliert z.B. das Bindungsverhalten von MT stabilisierenden Proteinen wie MAP1b (Trivedi et al. 2005), Tau (Sperber et al. 1995) und adenomatous polyposis coli (APC) (Shi et al. 2004). Es ist erwähnenswert, dass einige MAPs, einschließlich APC durch GSK3 $\beta$  abhängige Phosphorylierung inhibiert werden, während andere wie bspw. MAP1b dagegen aktiviert werden (Goold et al. 1999). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Wachstumsfaktor abhängige Phosphatidylinositol-3 Kinasen (PI3K) vermittelte Inhibierung von GSK3 $\beta$  das Axonwachstum unterstützt (Zhou et al. 2004). Dies ist interessant, da nachgewiesen werden

## Einleitung

konnte, dass im Rückenmark von *pnm*-Mäusen die Aktivität von PI3K signifikant reduziert ist (Wagey et al. 2001).

### 3.4 Stathmin als Regulator der dynamischen Instabilität von Mikrotubuli

Zur Stathmin Protein-Familie zählen SCG10 (superzervikale Ganglionprotein 10), SCLIP (SCG10 like Protein) und RB3. Alle Familienmitglieder weisen am C-Terminus eine hochhomologe Tubulin bindende Domäne auf (Charbaut et al. 2001), ihr N-Terminus besteht aus einer variablen membranverankernden Domäne. Die Expression und Aktivität von Stathmin wird in Abhängigkeit unterschiedlicher extrazellulärer Signale gesteuert (Marklund et al. 1993; Marklund et al. 1994; Marklund et al. 1996).



**Abbildung 2: Die dynamischen Instabilität von MT:** Polymerisierung am Plus Ende der MTs (GTP-Cap) wird durch die Menge vorhandener GTP assoziierter (gelber Stern)  $\alpha/\beta$ -Tubulinheterodimere bestimmt (1). In der Wachstumsphase von MTs wechseln Assemblierungs- und Disassemblierungsphasen ab. Letztere Phase tritt ein, wenn kein stabilisierendes GTP-Cap mehr vorhanden ist. Es schwinden die lateralen Bindungskräfte zwischen den Protofilamenten und den Heterodimeren selbst und MTs depolymerisieren. Aus MTs freigesetzte Heterodimere können anschließend erneut von Tubulin Chaperonen gebunden und recycelt werden (2a) oder aber dissoziiert und degradiert werden (2b) (Kortazar et al. 2007). Nicht phosphoryliertes Stathmin kann zwei Tubulinheterodimere binden (T2S-Komplex) und so den Pool freier Tubulinheterodimere reduzieren (3). Die Freisetzung von Tubulin aus dem T2S Komplex wird über Serin-Phosphorylierungen von Stathmin kontrolliert (Ohkawa et al. 2007; Amayed et al. 2002).

Stathmin bindet zwei  $\alpha/\beta$ -Tubulinheterodimere in einem nicht-polymerisierbaren Zustand (T2S-Komplex). Stathmin gebundenes Tubulin bildet somit einen Pool von noch nicht assemblierten Heterodimeren. Die Etablierung dieses Stathmin/Tubulin-Pools geschieht auf

## Einleitung

Kosten von freien verfügbaren Tubulinheterodimeren, die sonst für die Assemblierung in MT zur Verfügung stünden (Amayed et al. 2002). Im Gegensatz zu Katanin und Spastin, Enzymen die MTs fragmentieren (Yu et al. 2008), greift Stathmin in die Dynamik der MT ein, begünstigt die MT-Disassemblierung und kontrolliert dadurch die MT-Elongation.

Die Bildung eines Stathmin/Tubulin-Pools wird durch die Phosphorylierung von Stathmin kontrolliert. Die Serin-Kinasen abhängige Phosphorylierung von Stathmin (z.B. JNK-1, CaMKII) reduziert die Affinität gegenüber  $\alpha$ -Tubulin und stellt einen regulatorischen Mechanismus dar, der zur Freisetzung von  $\alpha/\beta$ -Tubulinheterodimeren führt (Abbildung 2). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von pSTAT3 mit dem C-Terminus von Stathmin zur Freisetzung von  $\alpha/\beta$ -Heterodimeren aus dem Stathmin/Tubulin-Komplex führt und dadurch die Polymerisierung von MT begünstigt wird (D. C. H. Ng, Bao, et al. 2006; Verma et al. 2009).

### 3.5 Axonaler Mitochondrientransport in Motoneuronen

Das zelluläre Transportsystem setzt sich zusammen aus der Fracht (Vesikel, Mitochondrien, Proteinkomplexe, Protein/RNA-Komplexe, etc.), den ATP hydrolysierenden Motorproteinen (Kinesin, Dynein, Myosin), den Zytoskelettfilamenten (Mikrotubuli, F-Aktin) entlang derer die Motorproteine ihre Fracht befördern und aus spezifischen Adapterproteinen (z.B. Dynactin, Dynamitin, p150<sup>Glued</sup>, Syntaphilin, Miro und Milton), welche die Interaktion der Fracht mit bestimmten Motorproteinen ermöglichen.

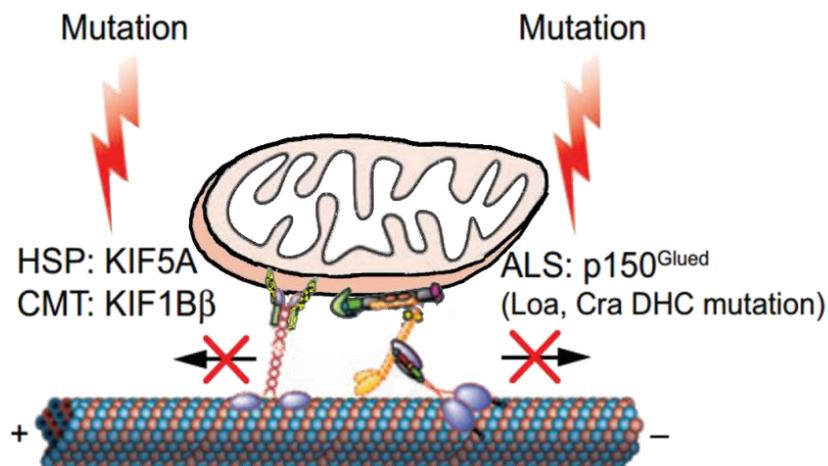
Die Basis für den hochgradig organisierten Transport in Neuronen bilden die, in den Axonen einheitlich mit dem Plus-Ende zur Synapse bzw. zum Wachstumskegel hin orientierten, Mikrotubuli (Baas 1989). Diese einheitliche Orientierung der axonalen MT wird dabei durch MT-bindende Proteine wie KIF1A und AnkyrinG unterstützt (Maniar et al., 2012). Die molekularen Motoren der Kinesin-Familien bewegen sich entlang der Mikrotubuli in Richtung Plus-Ende, sodass sie in Axonen den anterograden Transport vermitteln. Der retrograde, in Richtung des minus-Ende der Mikrotubuli erfolgende Transport, wird über die molekularen Motoren der Dynein-Familie Mitglieder vermittelt (De Vos et al. 2008). Die Motordomänen der Kinesine und Dyneine besitzen eine bestimmte Affinität zu PTM entlang der MT (Bonnet et al. 2001; Dunn et al. 2008). Zum Beispiel, c-Jun N-terminal kinase (JNK-) interacting protein 1 (JIP1) ist ein durch Kinesin-1 (KIF5) transportiertes Protein, das hauptsächlich im längsten Neuriten differenzierender CAD Zellen zu finden ist (Verhey et al. 2001). Der Verlust der  $\alpha$ -Tubulin Acetylierung bzw. die pharmakologisch induzierte

## Einleitung

Acetylierung aller MT führt zu einer KIF5 abhängigen Fehlverteilung von JIP1 in allen Neuriten (Reed et al. 2006).

Während des Langstreckentransports von Mitochondrien im Axon wechseln stationäre und mobile Phasen ab. Die Transportgeschwindigkeit axonaler Mitochondrien erreicht durchschnittlich 0,5  $\mu\text{m/s}$  (Hollenbeck & Saxton 2005a). *In vivo* werden gut zwei Drittel der mobilen Mitochondrien anterograd transportiert (Kerschensteiner & Misgeld 2007). Mitochondrien akkumulieren an Orten hohen Energiebedarfs wie Wachstumskegeln bzw. Synapsen oder Ranvier'schen Schnürringen (Ohno et al. 2011) - an Orten also, an denen das Membranpotential nach Depolarisation unter ATP-Hydrolyse wieder hergestellt werden muss. Es wird angenommen, dass hierbei das mitochondriale Membranpotential von höchster Relevanz ist, da es die ATP-Synthese, die mitochondriale  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherung und die Erzeugung von radikalen Sauerstoffspezies (ROS) kontrolliert und somit Neurone vor oxidativem Stress, Exzitotoxizität und Apoptose schützt. Mehrere Experimente an Mausmodellen mit einer „missense Mutation“ in dynein heavy chain (LOA und Cra1) konnten zeigen, dass retrograde axonale Transportdefizite eine kritische Rolle in der Pathogenese von Motoneuronenerkrankungen spielen (Hafezparast et al. 2003). In kultivierten hippocampalen Neuronen lässt sich nach Kontakt zu Amyloid  $\beta$ , einer Hauptkomponente neuronaler Plaques die mit der Alzheimererkrankung in Verbindung stehen, ein verschlechterter Mitochondrientransport feststellen (Rui, Tiwari, Xie, & Zheng, 2006; Rui, Gu, Yu, Hartzell, & Zheng, 2010). Die axonale Degeneration in Alzheimer- und ALS-Patienten wird außerdem durch axonale Schwellungen charakterisiert, die eine abnormale Menge von Mitochondrien enthalten (Stokin 2005; Delisle & Carpenter 1984). Motoneuronen-Erkrankungen wie die hereditäre spastische Paraplegie 10 (SPG10) und die Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung Typ 2A (CMT2A) sind mit Mutationen in den, für Mitochondrientransport relevanten, Motorproteinen KIF5A bzw. KIF1B- $\beta$  und dem mitochondrialen Adapterprotein MFN2 assoziiert (Reid et al. 2002; Zhao et al. 2001; Karle et al. 2012; Züchner et al. 2004). In Neuronen von ALS-Patienten und von Mäusen die eine mutierte Cu/Zn-Superoxid Dismutase 1 (SOD1) exprimieren, kann ein gestörter axonaler Mitochondrientransport gefunden werden (Sasaki & Iwata 1996; Shi et al. 2010). Die Überexpression von Dynamitin, einer Komponente des zytoplasmatischen Dynein/Dynaktin Motorkomplexes und die dadurch ausgelöste Störung des retrograden Transports in Axonen reicht aus, um in einem Mausmodell eine fortschreitende Motoneuronendegeneration zu induzieren (LaMonte et al. 2002).

## Einleitung



**Abbildung 3: Durch Mutationen betroffene Motorproteine.** Kinesine (←) und Dynein/Dynaktin-Komplex (→) sind Ursache für axonale Transportstörungen in Mensch und Mausmodell und verantwortlich für neurodegenerative Erkrankungen (De Vos et al. 2008).

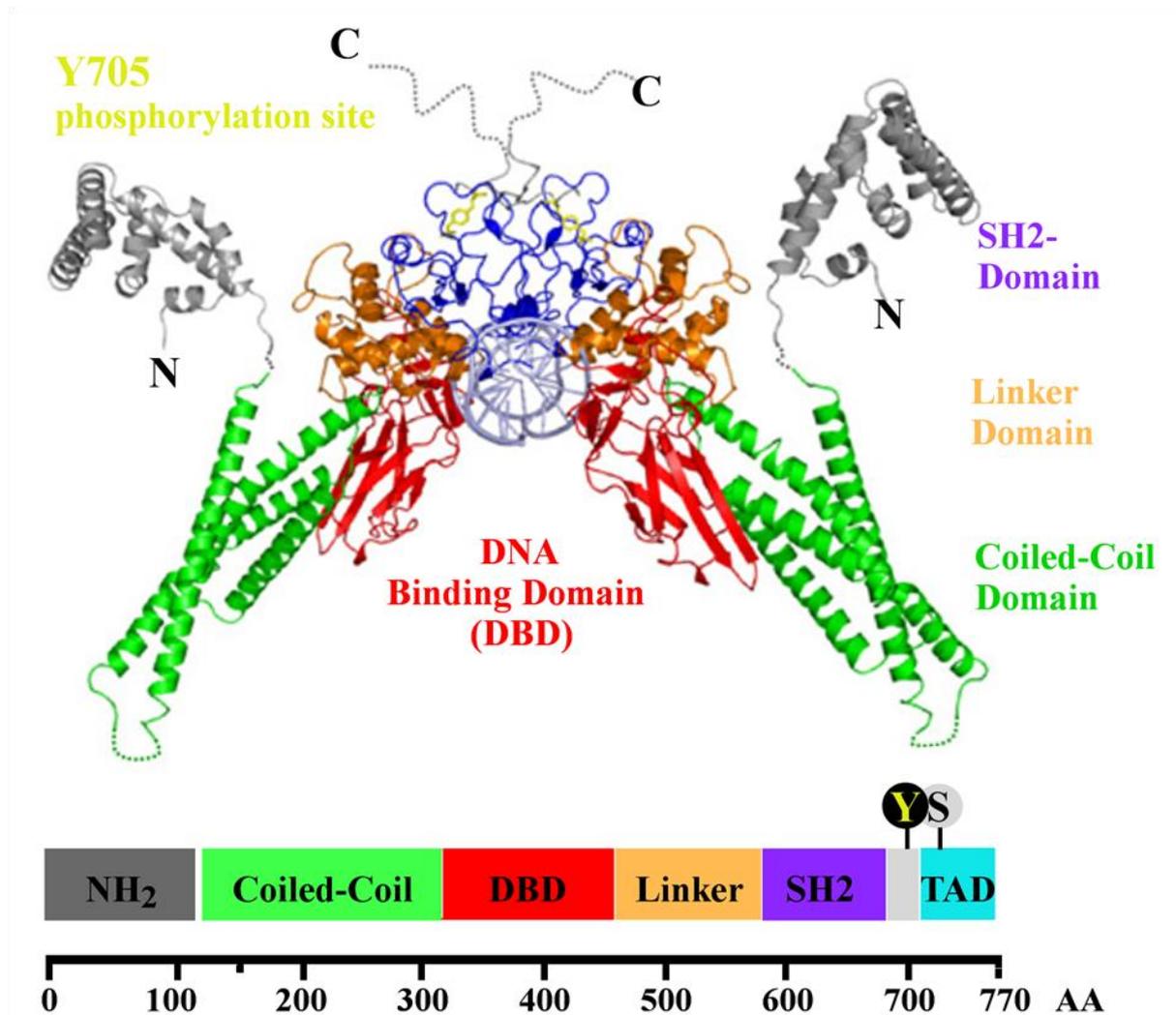
Offenbar lösen Mutationen von Motorproteinen, obwohl sie häufig auch in allen Zelltypen gefunden werden können, selektiv Neuropathologien im Menschen aus. Der Stress auf das kompartimentalisierte Transportsystem scheint in Neuronen nicht kompensierbar zu sein.

### 3.6 JAK/STAT signaling

Vor über 50 Jahren wurden die ersten Interferone (IFNs) beschrieben und begründeten die Familie der Zytokine (ISAACS & LINDENMANN 1957). Die frühe Verfügbarkeit rekombinant hergestellter IFNs ermöglichte bald darauf die Erforschung des Einflusses dieser Signalmoleküle auf die Genexpression in Zielzellen. Diese Untersuchungen führten u.a. zur Identifikation der Familie der „*signal transducer and activator of transcription*“ (STAT-) Proteine. Heute sind in Säugetieren sieben STAT-Proteinisoformen bekannt, STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B und STAT6. Alle Familienmitglieder sind durch die Anordnung ihrer funktionellen Domänen charakterisiert (Mohr et al. 2012).

STATs werden in Abhängigkeit der Zytokin induzierten Tyrosinphosphorylierung und Homo-/Heterodimerisierung von Importin  $\alpha$  und Importin  $\beta$  gebunden. Importine binden Proteine mit nukleären Lokalisationssequenzen, wodurch diese anschließend über den Kernporenkomplex in den Zellkern gelangen. Auf diese Weise können aktivierte STATs, als Konsequenz eines Zytokinsignals, DNA und weitere Transkriptionsfaktoren binden und die Transkription von Zielgenen steuern (vgl. Abb.4) (Reich & Liu 2006).

## Einleitung



**Abbildung 4: STAT3-Domänen.** Der Aminoterminus (NH<sub>2</sub>) ist verantwortlich für STAT3 Dimerisierung nach Aktivierung. Die coiled-coil Domäne von STAT3 enthält eine nukleäre Lokalisationssequenz die von Importinen erkannt wird und die Passage durch den Kern-Porenkomplex ermöglicht. Außerdem dient sie zur Interaktion mit Transkriptionsfaktoren. Die DNA Bindedomäne (DBD) ist aus  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut und erkennt Consensus-Sequenzen in Promotorregionen der Zielgene. Die  $\alpha$ -helikalen Linkerdomäne dient der transkriptionalen Aktivität und zur Protein-Protein-Interaktion. Die SH2 (Src homology)- docking domain enthält C-terminal eine konservierte Tyrosin-Phosphorylierungsstelle (Y705) die zur reziproken STAT-Dimerisierung und zur transkriptionellen Aktivierung dient. C-terminal liegt die Transaktivierungsdomäne (TAD) mit einer Serinphosphorylierungsstelle (S727) (Abbildung nach Mohr et al. 2012)

Neben der erwarteten Transkriptionsregulierenden Wirkung konnte der Isoform STAT3 eine Reihe von weiteren Funktionen nachgewiesen werden. STAT3 scheint nach der Phosphorylierung von Tyrosin 705 (pSTAT3<sup>Y705</sup>) nicht nur verstärkt in den Zellkern transportiert zu werden (Bild 2002; Herrmann 2004; Ben-Yaakov et al. 2012). Es gibt eine Reihe von Untersuchungen, bei denen sich herausstellte, dass pSTAT3<sup>Y705</sup> im Zytoplasma mit dem MT destabilisierenden Protein Stathmin interagiert und so Einfluss auf die Dynamik des

## Einleitung

Mikrotubuliskeletts nimmt (D. C. H. Ng, Bao, et al. 2006; Ng et al. 2011; Verma et al. 2009; Wen et al. 2010).

STAT3 besitzt neben der Phosphorylierungsstelle an Tyrosin 705 eine weitere Phosphorylierungsstelle am Serin 727 der Transaktivierungsdomäne (vgl. Abb.4). In der durch MAPK aktivierten Serin 727-Phosphorylierungsstelle von STAT3 (pSTAT3<sup>727</sup>) wurde lange Zeit nur ein Modulator der Transkriptionsaktivität von nukleärem STAT3 gesehen. Einerseits konnte nachgewiesen werden, dass die Serin Phosphorylierung für maximale Transkriptionsaktivität von STAT3 verantwortlich ist (Wen et al. 1995), andererseits gibt es aber Hinweise, dass eine Phosphorylierung von STAT3 an Serin 727 die Phosphorylierung an Y705 unterdrückt (Woetmann et al. 1999) und dadurch den Kernimport von pSTAT3<sup>Y705</sup> unterbindet. In sympathischen Neuronen unterstützt die NGF/TrkA abhängige STAT3<sup>S727</sup> Phosphorylierung das Axonwachstum (Y. P. Ng et al. 2006) und die BDNF abhängige Aktivierung von TrkB führt zur Phosphorylierung von STAT3 an S727 in kortikalen und hippocampalen Neuronen (Zhou & Too 2011; Y. P. Ng et al. 2006).

Jüngere Untersuchungen an STAT3 defizienten B-Lymphozyten belegen, dass pSTAT3<sup>S727</sup> als Monomer an das mitochondriale Protein GRIM-19 bindet und dadurch mit dem Komplex I und II der Elektronentransportkette der inneren Mitochondrienmembran wechselwirkt. Die Anwesenheit von pSTAT3<sup>S727</sup> in Mitochondrien scheint für die Kontrolle der oxidativen Phosphorylierung unabdingbar zu sein (Wegrzyn et al. 2009).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass STAT3 durch die Regulierung der Transkription, durch die Interaktion mit Stathmin im Zytoplasma oder durch die Steigerung der Zellatmung auf vielfältige Weise in Zellen wirken kann.

### **3.7 Die Rolle von STAT3 im Nervensystem**

Nachdem die Funktion der STATs als intrazelluläre Signalmediatoren für INFs bekannt war, fand man heraus, dass sie auch die Signalweiterleitung neurotropher Faktoren in neuronalen Zellen übernehmen. Diese Entdeckung ging einher mit der Entschlüsselung des heterotrimeren Rezeptorkomplexes, über welchen Mitglieder der CNTF (ciliary neurotrophic factor)-Familie der Zytokine die Entwicklung des Nervensystems bei Säugern steuern (Stahl & Yancopoulos 1993). Dieser besteht aus der CNTF bindenden, mit der Membran durch Glycophosphatidylinositol (GPI) verankerten Untereinheit CNTF-Rezeptor  $\alpha$  (CNTFR $\alpha$ ) und den zwei transmembranen das Signal weiterleitenden Untereinheiten, LIF-Rezeptor  $\beta$  (LIFR $\beta$ ) und Glycoprotein 130 (gp130) (Davis et al., 1993). Den JAK/STAT Signalweg

## Einleitung

aktivieren weitere Mitglieder der CNTF-Familie wie der Leukämie inhibierenden Faktor (LIF), Cardiotrophin-1, Interleukin-6 (IL-6), IL-11 und Oncostatin-M (Heinrich et al. 1998). Versuche zum Überleben von Neuronen in Abhängigkeit von CNTF zeigten, dass STAT3 und STAT1 wesentliche Vermittler des CNTF induzierten Überlebenseffekt sind (Rajan & McKay 1998). STAT3 hebt sich in Funktion und physiologischer Bedeutung gegenüber den anderen STATs ab. Durch gezielte globale Genausschaltung von STAT3 in Mäusen stellte sich heraus, dass eine STAT3 Defizienz zwischen Embryonaltag 6.5 und 7.5 zum Tod des Embryos führt (K Takeda et al. 1997). Die gewebespezifische STAT3 Defizienz in Neuronen hat dagegen keinen Einfluss auf die Entwicklung des Embryos. Jedoch konnte gezeigt werden, dass in adulten STAT3 defizienten Tieren nach der Läsion des Gesichtsnervs signifikant mehr Motoneurone im Kerngebiet des Fazialisnervs untergehen als bei wildtypischen Kontrolltieren (Schweizer et al. 2002). Durch Läsionsexperimente an sensorischen Neuronen der dorsalen Wurzelganglien konnte gezeigt werden, dass STAT3 verantwortlich ist für die Initialisierung der Axonregeneration in ZNS- und PNS-Projektionen (Bareyre et al. 2011), und dass axonales STAT3 an der Läsionsstelle peripherer Nerven phosphoryliert wird und einen Kerntranslokationskomplex mit Dynein und Importin 5 $\alpha$  bildet (Ben-Yaacov et al. 2012). Die experimentellen Bedingungen von Bareyre et al. und Ben-Yaacov et al. unterscheiden sich allerdings erheblich von den Untersuchungen zur zellautonomen Axondegeneration. Wie eingangs erwähnt, unterstützen GDNF (Sagot et al., 1996), BDNF (Sagot et al., 1998) und CNTF (Sendtner et al., 1992) das Überleben von spinalen Motoneuronenzellkörpern in *pnn* mutierten Mäusen. Auf die Axonerhaltung hingegen wirkt nur CNTF protektiv. Das verdeutlicht, dass bei der zellautonomen Degeneration von Motoraxonen intrazelluläre Funktionen gestört sind, die nicht direkt durch transkriptionelle Rettungsprogramme behoben werden können.

Bei Untersuchungen zum Einfluss von STAT3 auf die synaptische Plastizität konnte gezeigt werden, dass STAT3 für die Ausbildung einer NMDA Rezeptor vermittelten Langzeit-Depression nötig ist. Diese Studie belegt eine NMDA/Ca<sup>2+</sup> vermittelte Aktivierung von STAT3 (pSTAT3<sup>Y705</sup>), die nicht mit transkriptionalen Effekten in Verbindung steht (Nicolas et al. 2012).

## 4. Ziel der Arbeit

Humane Motoneuronenerkrankungen wie ALS oder SMA sind noch heute letale Erkrankungen des Nervensystems, die durch Denervierung von Muskelgewebe, Axondegeneration und als Konsequenz daraus durch den Untergang von Motoneuron-Zellkörpern gekennzeichnet sind. Bereits in den 1990er Jahren erkannte man, dass der neurotrophe Faktor CNTF in der Lage ist, verletzte Motoneurone vor dem Untergang zu schützen (Sendtner et al. 1990; SENDTNER et al. 1991). Insbesondere die Untersuchungen zur Rettung von Motoneuronen in der *pnn*-Maus, einem Modell für progrediente Motoneuronenerkrankungen (Schmalbruch et al. 1991), konnten zeigen, dass die Wirkung von CNTF im Gegensatz zu GDNF (Sagot et al. 1996) und der Überexpression von Bcl-2 (Sagot et al. 1995) nicht nur auf die Motoneuronen-Zellkörper beschränkt ist, sondern darüber hinaus auch zur Aufrechterhaltung der Axone beiträgt (Sendtner et al., 1992). Über einen spezifischen transmembranen Rezeptorkomplex (Davis and Yancopoulos 1993) aktiviert CNTF den „Signal Transducer and Activator of Transkription“ (STAT3). Durch die konditionelle Ablation von Stat3 in Motoneuronen kam man zu dem Erkenntnis, dass nach einer Läsion nicht nur CNTF sondern auch STAT3 für die Regeneration und das Überleben von Motoneuronen essentiell zu sein scheint (Sendtner, Schmalbruch, et al. 1992; Sendtner et al. 1994; Sendtner et al. 1997a; Schweizer et al. 2002). Daher kann vermutet werden, dass CNTF eine besondere Reaktion innerhalb des Axons auslöst.

Die vorliegende Arbeit soll das Verständnis des molekularen Mechanismus erweitern, wie sich die lindernde Wirkung von CNTF auf Motoneuronopathien entfaltet. Hierzu sollte zunächst folgendes geklärt werden:

1. Führt die Applikation von CNTF in kultivierten Motoneuronen zu einem retrograden Transport von axonalem pSTAT3 oder wirkt pSTAT3 lokal im Axon ohne im Nukleus Zielgene zu induzieren? Und kann CNTF trotz der Gegenwart eines Transkriptioninhibitors das Axonwachstum in *pnn* mutierten Motoneuronen unterstützen?
2. Welche Phosphorylierungsstelle von STAT3 ist für die CNTF abhängige Wirkung in Kulturen *pnn* mutierter Motoneurone verantwortlich? Und wirkt die CNTF-STAT3 Signalkaskade in primären *pnn* mutierten Motoneurone ohne STAT3-Zielgene zu induzieren?

Die Motoneuronopathie auslösende Punktmutation im *pnn*-Mausmodell liegt im *Tbce*-Gen. Sie führt zu einem Aminosäureaustausch von Tryptophan zu Glyzin und resultiert in einem weniger stabilen Protein (TBCE<sup>W524G</sup>) (Bommel et al. 2002; Martin et al. 2002). TBCE ist ein ubiquitär exprimiertes Tubulin spezifisches Chaperon und an der Polymerisierung von MT

## Ziele der Arbeit

beteiligt. Reduzierte Mengen an TBCE führen *in vitro* zum Verlust von axonalem Tubulin (Schäfer et al. 2007). In *pnn*-Mäusen konnte ab der zweiten postnatalen Woche, der retrograde Verlust axonaler MT in peripheren Nerven beobachtet werden, der von einer rückwärts gerichteten Axondegeneration begleitet wird. Es kann daher angenommen werden, dass auch der bidirektionale MT abhängige Transport von Mitochondrien im Axon von *pnn* mutierten Motoneuronen betroffen ist. Das Interesse an einer möglichen Wirkung von CNTF auf Mitochondrien von Motoneuronen wurde noch größer, als bekannt wurde, dass phosphoryliertes STAT3 durch die spezifische Interaktion mit GRIM-19 Einfluss auf die mitochondriale Atmungskette nimmt (Wegrzyn et al. 2009).

Diese Arbeit sollte helfen zwei Fragen zu beantworten.

1. Unterscheidet sich der axonale MT-basierte Transport von kultivierten *pnn* mutierten Motoneuronen und wildtypischen Kontrollen und lassen sich evtl. Transportdefizite durch CNTF beheben?
2. Hat CNTF Einfluss auf das Membranpotential axonal transportierter Mitochondrien in *pnn* mutierten und wildtypischen Motoneuronen, und lässt sich auch in Motoneuronen ein Zusammenhang zwischen dem CNTF-Signaling und mitochondrial lokalisiertem STAT3 finden?

## 5 Material und Methoden

### 5.1 Material/Mauslinien

#### 5.1.1 Versuchstiere

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

##### 5.1.1.1 *pnn*-Mauslinie

Der Phänotyp der *pnn*-Mausmutante trat zum ersten Mal in einer Kolonie von NMRI-Mäusen am Panum Institut in Dänemark auf (Schmalbruch et al. 1991). Die zugrunde liegende Spontanmutation der *pnn*-Maus ist eine Transversion von T1524G im TBCE-Gen auf Chromosom 13. Diese führt zur Substitution der letzten Aminosäure führt Trp524Gly im TBCE-Protein (Bommel et al. 2002; Martin et al. 2002).

##### 5.1.1.2 NFL-Cre Mauslinie

Die NFL-Cre transgene (NFL-Cre<sup>tg</sup>) Mauslinie wurde von Ulrich Schweitzer am Institut für Klinische Neurobiologie generiert und weist eine motoneuronspezifische Expression der Cre-Rekombinase unter dem Neurofilament L (NFL) Promotor auf (Schweizer et al. 2002).

##### 5.1.1.3 STAT3<sup>flox/flox</sup> und STAT3<sup>KO/wt</sup> Mauslinien

Die STAT3<sup>flox/flox</sup> als auch STAT3<sup>wt/ko</sup> Mauslinie wurde im Labor von S. Akira generiert, um eine gewebespezifische Ablation von Stat3 zu ermöglichen, da die ubiquitäre Deletion von Stat3 embryonal lethal ist (K. Takeda et al. 1997). Mit einem zielgerichteten Vektor wurde 5' und 3' von Exon 21 flankierende LoxP Stellen eingebracht (Takeda et al. 1998). Exon 21 codiert u.a. für die Aktivierungsdomäne mit der Phosphorylierungsstelle Tyrosin 705 - die für die Signaltransduktion der Janus-Kinasen (JAK) verantwortlich ist. In der STAT3<sup>flox/flox</sup> Maus liegt Exon 21 homozygot LoxP flankiert vor. LoxP Stellen sind Schnittstellen für die Cre-Rekombinase und ermöglichen das Ausschneiden der LoxP flankierten Sequenzen aus dem Genom (Chapman et al. 2000).

Die STAT3<sup>wt/ko</sup> Mauslinie ist eine heterozygote STAT3 defizient gehaltene Mauslinie. Das STAT3-KO Allel wurde erzeugt indem die Exons 21- 23 durch eine Neomycinkassette ersetzt wurden. Dieses KO -Allel kodiert für ein STAT3 ohne Transaktivierungsdomäne (K. Takeda et al. 1997).

## Material & Methoden

### 5.1.2 Zelllinien

#### 5.1.2.1 PC12 Zelllinie

Die PC12 Zelllinie wurde aus Zellen eines Tumors des Nebennierenmarks der Ratte generiert (Greene & Tischler 1976). Die Zellen wachsen adhärent und reagieren auf Gabe von NGF (nerve growth factor) mit Zellpolarisierung und Neuriten ähnlichen Fortsätzen. In dieser Arbeit wurden mit NGF behandelte PC12 Zellen zum Test für Live-Imaging Farbstoffe herangezogen.

#### 5.1.2.2 HEK293T Zellen

Die HEK (human embryonic kidney) Zelllinie entstammt einer gesunden humanen embryonalen Niere eines Aborts. Die normalen Zellen wurden im Labor mit gescherter DNA des Adenovirus 5 transfiziert und immortalisiert (Graham et al. 1977). Da es sich bei den HEK293 Zellen um keine natürlichen Zellen handelt, sind sie weniger relevant für die Untersuchung physiologischer Abläufe in Zellen. HEK293T Zellen enthalten das SV40 „large T antigen“ für die Replikation transfizierter episomaler DNA. Sie lassen sich sehr einfach transfizieren und wurden in dieser Arbeit zur Erzeugung von Virionen verwendet.

#### 5.1.2.3 NSC-34 Zelllinie

NSC-34 Zellen entstammen der Maus. Sie sind das Produkt der Fusion aus einer mit spinalen Motoneuronen der angereicherten Fraktion mit der einer Fraktion von Zellen eines Neuroblastom. NSC-34 Zellen sind daher eine heterogene Gruppe von immortalisierten embryonalen Rückenmarkszellen der Maus. In dieser Arbeit wurden NSC-34 Zellen zur Virustiterbestimmung herangezogen.

### 5.1.3 Bakterienstämme

Zur Generierung von Plasmid-DNA wurden folgende chemokompetente Bakterienstämme transformiert:

E.coli            XL-1 blue (Chemo competent)

E.coli            DH5 $\alpha$  (langsam wachsend,  $\Gamma, m^+$ , high copy (pMB1 Origin of Replication))

E.coli            Top10 (high copy)

## Material & Methoden

### 5.1.4 Antikörper

**Tabelle 2: Primärantikörper Abkürzungen**

Name	Wirt	Epitop	Referenz	Anwendung	Verdünnung
STAT3	M mk	synth.m. Peptide	cell signaling 9139 (124H6)	IF	1:5000
pSTAT3 <sub>S727</sub>	Rb pk	synth.h. phosph. Peptide	Gene script A00251	IF	1:200
pSTAT3 <sub>Y705</sub>	Rb pk	synth.h phosph. Peptide	Gene Script A00250	IF	1:200
pSTAT3 <sub>S727</sub>	Rb mk	synth. m. phosph. Peptide	cell signaling 9134	IF / WB	1:1000, 1:5000
pSTAT3 <sub>Y705</sub>	Rb mk	synth. m. phosph. Peptide	cell signaling 9145 (D3A7)	WB	1:5000
pSTAT3 <sub>Y705</sub>	M mk	m phosph. Petide	cell signaling 4113 (M9C6)	WB	1:5000
Stathmin	Rb pk	Synth. Peptid C- Terminus hum. Stathmin	Abcam ab52630 EP1573Y	IF	1:1000
Tyr- Tubulin	Rt mk	<i>S. cerevisiae</i> full length	Abcam Ab 6160 (YL1/2)	IF	1:2000
Ac- Tubulin	M mk	sea urchin, full length	Sigma T6793 (6-11B1)	IF	1:2000
$\alpha$ -Tubulin	M mk	sea urchin, full length	Sigma T5168 (B512)	IF / WB	1:1000, 1:10000
$\gamma$ -Tubulin	Rb pk	synth. Pept. human	Abcam Ab11317	IF	1:1000
GAPDH	M mk	purified, rb muscle	Calbiochem CB1001 (6C5)	WB	1:10000
ERAB1	Rb pk	synth. Pept. Human ERAB	Abcam Ab 52243	WB	1:5000
GFP	chick pk	recomb. full length GFP	Abcam Ab 13970	IF / WB	1:800, 1:10000
MAP2	M mk	Bovine brain Microtubule protein	Chemicon MAB3418 (AP20)	IF	1:1000
p75-NTR	M mk	Extrazelluläre Domäne hum. p75NTR	MLR2 Rogers et al., 2006	Immuno- panning	5 ng/ml
TBCB	Rb pk	TBCB fusion protein ag8473	Proteintech 15782-1AP	WB	1:5000
Histon 3	Rb pk	Synth. Peptid N- Terminus hum. Histon 3	Millipore		1:10000

M= Maus; rt = Ratte; rb = Kanninchen; chick = Huhn; pk = polyklonal, mk = monoklonal;

IF = Immunfluoreszenz; WB = Westernblot;

## Material & Methoden

**Tabelle 3: Sekundärantikörper**

Antikörper	Wirt	Anwendung	Verdünnung in TBST
Alexa 488 anti-Hüchen	Ziege	IF	1:500
Cy2 anti-Maus	Ziege	IF	1:250 – 1:350
Cy2 anti Kanninchen	Ziege	IF	1:250 – 1:350
Cy3 anti-Maus	Ziege	IF	1:250 – 1:350
Cy3 anti-Ratte	Ziege	IF	1:250 – 1:350
Cy3 anti-Kanninchen	Ziege	IF	1:250 – 1:350
Cy5 anti-Maus	Ziege	IF	1:250 – 1:350
Cy5 anti -Ratte	Ziege	IF	1:250 – 1:350
HRP anti-Maus	Ziege	WB	1: 10000
HRP anti-Kanninchen	Ziege	WB	1: 10000

### 5.1.5 Nucleinsäuren

#### 5.1.5.1 Vektoren

**Tabelle 4: Plasmide zur Transfektion von Motoneuronen und HEK293T Zellen (Virusproduktion)**

Plasmid		Herkunft
STAT3-EYFP-N1	Überexpressionsplasmid	A. Kretschmar et al.
STAT3 <sup>Y705F</sup> -EYFP-N1	Überexpressionsplasmid	diese Arbeit
STAT3 <sup>S727A</sup> -EYFP-N1	Überexpressionsplasmid	diese Arbeit
STAT3 <sup>EE434/435AA</sup> -EYFP-N1	Überexpressionsplasmid	diese Arbeit
STAT3-EGFP-N1	Überexpressionsplasmid	A. Kretschmar; F. Horn
pGJ3-STAT3-EYFP	Lentiviraler Vektor	diese Arbeit
pGJ3-EGFP	Lentiviraler Vektor	Bender FLP; 2007
FUGW	Lentiviraler Vektor	C. Lois (science, 2002)
FUValentin (FUVal)	Lentiviraler Vektor	Valentin Klein (Martinsried)
STAT3-EYFP-FUVal	Lentiviraler Vektor	diese Arbeit
STAT3 <sup>Y705F</sup> -EYFP-FUVal	Lentiviraler Vektor	diese Arbeit
STAT3 <sup>S727A</sup> -EYFP-FUVal	Lentiviraler Vektor	diese Arbeit
STAT3 <sup>EE434/435AA</sup> -EYFP-FUVal	Lentiviraler Vektor	diese Arbeit

## Material & Methoden

pcz-VSV-G	Vektor zur Lentivirenerzeugung	Jarmy et al 2001
pCMV-ΔR8.9	Vektor zur Lentivirenerzeugung	kommerziell
shRNA-TBCB	Lentiviraler Vektor	diese Arbeit

### 5.1.5.2 Mutagenese Oligomere

STAT3Y705F_fow	5'-CTT GGT CTT CAG GAA CGG GGC AGC ACT AC-3'
STAT3Y705F_rev:	5'-GTA GTG CTG CCC CGT TCC TGA AGA CC A AG-3'
STAT3S727A_fow:	5'-ATC TAA AGT GCG GGG GGC CAT CGG CAG GTC AAT-3'
STAT3S727A_rev:	5'-ATT CAG CTG CCG ATG GCC CCC CGC ACT TTA GAT-3'
STAT3EE434/435AA_fow:	5'- CCT CCT TGA TCG TGA CCG CGG CGC TGC ACC TGA TCA CC-3'
STAT3EE434/435AA_rev:	5'-GGT GAT CAG GTG CAG CGC CGC GGT CAC GAT CAA GGA GG-3'

### 5.1.5.3 knock-down Oligomere

shRNA Stathmin:	5'- tcg aga aaa aag ggg aga aac tga aag tgt tct ctt gaa aca ctt tca gtt tct ccc ca-3'
shRNA TBCB:	5'- gat cca atg gga aac get act ttg aat caa gag ttc aaa gta gcg ttt ccc att ttt ttg-3'

### 5.1.5.4 Sequenzieroligos für STAT3

Für die Sequenzierung von STAT3 in den einzelnen Vektoren wurde die murine STAT3 cDNA (Genebank ID: U06922) in voller Länge ins „Online“ Program Primer3 (simgene.com) eingefügt und nach internen Sequenzabschnitten durchsucht, die sich als Primerbindungsstelle eignen.

STAT3_66fow	5'-GCA ATA TAG CCG ATT CCT GC-3'
STAT3_508fow	5'-CGG AGA AGC ATT GTG AGT GA-3'
STAT3_891fow	5'-TGG TGT CCA GTT TAC CAC GA-3'
STAT3_1340fow	5'-ACT TCT TCA CTA AGC CGC CA-3'
1STAT3_rev	5'-ACC GTG GAG ACA CAA GGA TGT-3'

### 5.1.5.5 Genotypisierungsoligos

STAT3-KO a	5'-AGC AGC TGA CAA CGC TGG CTG AGA AGC T-3'
STAT3-KO b	5'-TTG CTG CTC TCG CTG AAG CGC AGT AGG-3'
STAT3-KO c	5'-ATC GCC TTC TAT CGC CTT CTT GAC CAG-3'

## Material & Methoden

STAT3 floX <sub>fow</sub>	5'-CCT GAA GAC CAA GTT CAT CTG TGT GAC-3'
STAT3 floX <sub>rev</sub>	5'-CAC ACA AGC CAT CAA ACT CTG GTC TCC-3'
Tbce fow	5'-TGA CCA ACC AAA TCA CTG CTG TAG TG-3'
Tbce rev	5'-TAG CAT GCA CCA TCA GAT CG-3'
Tbce 1570Sensor	5'-GCC TAC TAG TGC GAT GGT AAC AG (FL)-3'
Tbce 1570Anker	5'- (LC Red640)-CCA ACC GTA AGA GTT TAA CGA CTG GAA TGT p-3'

### 5.1.6 Chemikalien und Lösungsmittel

Chemikalien und Lösungsmittel wurden, wenn im Text nicht anders vermerkt, von den Firmen Applichem, Fermentas, Calbiochem, GE Healthcare, Invitrogen, Merck, Roth, Stratagene oder Sigma-Aldrich in Analysequalität oder Zellkultur Qualität bezogen. Des Weiteren wurden Enzyme von folgenden Firmen verwendet: Biotherm, Fermentas, Invitrogen, Roche.

### 5.1.7 Puffer und Lösungen für Proteinbiochemie

Lämmli Probenpuffer(2x):	125 mM Tris-HCl 6 % Glycerin 2 % SDS 0,025 % Bromphenol-Blau 5 % $\beta$ -Mercaptoethanol dH <sub>2</sub> O pH 6.8
Sammelgel 4% (6 ml)	0,75 ml Tris-HCl 1 M (pH 6,8) 1,02 ml PAA (30%) 0,06 ml APS (10%) 0,06 ml SDS (10%) 0,006 ml TEMED 4,08 ml H <sub>2</sub> O

Trenngel (12 ml):

## Material & Methoden

Konzentration	7 %	9 %	10 %	12 %
Tris 1,5 M (pH 8.8) [ml]	3,0	3,0	3,0	3,0
PAA (30%) [ml]	2,8	3,6	4,0	4,8
APS (10%) [ml]	0,12	0,12	0,12	0,12
SDS (10%) [ml]	0,12	0,12	0,12	0,12
H <sub>2</sub> O [ml]	5,96	5,16	4,76	3,96
TEMED	9,6 µl	7,2 µl	4,8 µl	0,48 µl

PHEM-Puffer:

60 mM PIPES  
25 mM HEPES  
10 mM EGTA  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
pH 7.0 mit KOH eingestellt

Mikrotubuli Stabilisierungspuffer:

PHEM-Puffer  
0.3 % TritonX 100  
10 µM Taxol

### 5.1.8 Puffer zur Isolation mitochondrialer Proteine:

50mM Tris-HCl (pH 7.4)

150 mM NaCl  
2 mM EDTA  
1 % NP 40  
1 mM NaF  
10 mM Na-Pyrophosphat  
okadaic acid  
Protease Inhibitor  
abgekühlt auf 4°C

Protease Inhibitor:

Complete Mini  
Roche Diagnostics, Mannheim

SDS-Laufpuffer (5x):

30 g Tris

## Material & Methoden

	144g Glycin 5 g SDS 1 l dH <sub>2</sub> O, pH 8.3
TBST (10x):	100 mM Tris 1,5 M NaCl 0,2 % Tween 20 in dH <sub>2</sub> O; pH 7.4
Filterpapier	Gel Blotting Papier Schleicher&Schüll 190 g/m <sup>2</sup>
Nitrozellulose Transfer Membran:	Protran Schleicher & Schull
Western Blott Transferpuffer:	TBST 30 % MeOH
Blocklösung:	5 % Milchpulver in 1X TBST abgekocht
Detektionslösung:	ECL <sup>TM</sup> / Super ECL <sup>TM</sup> Western blotting GE Healthcare UK Limited

### 5.1.9 Organellenspezifische Farbstoffe für die Lebendzellbeobachtung

Mitochondrien spezifische Farbstoffe:

**Tabelle 5: Mitochondrienfarbstoffe**

	Ex/Em	PFA-fixierbar	Potential Indikator
<b>MitoTracker Green FM</b>	488/530	Nein	----
<b>MitoFluor Red 594</b>	594/630	Nein	ekliptisch
<b>Rhodamin 123</b>	496/530	Nein	ekliptisch
<b>JC-1</b>	496/527 monomer 496/590 Aggregat	Nein	ratiometrisch
<b>MitoTracker Red CMXRos</b>	579/599	Ja	ekliptisch

Vesikel spezifische Farbstoffe:

**Tabelle 6: Vesikelfarbstoffe**

	Ex/Em	PFA-fixierbar
<b>LysoTracker Red DND-99</b>	577/590	Nein
<b>LysoSensor Yellow/Blue- DND-160 (PDMPO)</b>	329/440 (schwach sauer) 384/540 (sauer)	Nein

## Material & Methoden

### 5.1.10 Puffer und Lösungen für Immunzytochemie

#### Fixierung:

A: Paraformaldehydlösung (4%)

1,6g PFA

20 ml H<sub>2</sub>O

3 Tropfen NaOH

Wasserbad 60°C, bis PFA gelöst

16,4 ml Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (0,2 M)

3,6 ml NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (0,2 M)

pH 7.4

B: Methanol/Aceton:

1:1 v/v Verhältnis

-20°C

keine weitere Permeabilisierung  
mit TritonX 100

Blocklösung/Permeabilisierung (ICC):

TBST pH 7.4

0.1- 0.5 % TritonX 100

15 % Ziegenserum

Lösung für Erstantikörper:

TBST

5 % Ziegenserum

Erstantikörper

Kernfarbstoff:

4',6-Diamino-2-

phenylindoldihydrochlorid (DAPI)

0.26 µg/ml TBST, 5-10min

Inkubation

Einbettungsmedien:

A:

100 mM Tris(hydroxymethyl)-  
aminoethan-HCL

10 % w/v Mowiol 40-88

25 % v/v Glycerin

pH 8.0

## Material & Methoden

	B:	Aqua Poly/Mount ready to use (Polysciences)
Lysispuffer zur DNA-Aufreinigung:		50 mM Tris HCl (pH 7.4) 100 mM NaCl 10 mM EDTA (pH 8.0) 1 % SDS
Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol		im Verhältnis 25:24:1
TE-Puffer		10 mM Tris-HCl 1 mM EDTA pH 8.0
Borat-Puffer:		0,15 M Borsäure (Zellkultur geeignet) pH 8.35
Depolarisationslösung:		30 mM KCl 0.8 % NaCl 2 mM CaCl <sub>2</sub>
n-Butanol gesättigter TE-Puffer:		n-Butanol TE-Puffer 1:1 Gemisch, gut mixen Zwei-Phasenlösung
EtBr gesättigter TE-Puffer:		10 mg/ml EtBr TE-Puffer
TBS-5 Puffer (Virus Resuspension)		50 mM Tris-HCl) pH 7.8 NaCl 130 mM 10 mM KCl

## Material & Methoden

5 mM MgCl<sub>2</sub>  
auf 100 ml mit sterilem Wasser  
auffüllen

Tris-(Base)-Puffer:

10 mM Tris  
pH 9.5 mit NaOH einstellen

### 5.1.11 Kulturmedien

#### 5.1.11.1 Kulturmedien für Zelllinien und primäre Zellen

PC12-Zelllinie:

DMEM  
Glutamax (500 µM)  
10 % HS  
5 % FCS (nicht differenzierend)  
1 % Penicillin/Streptomycin

HeLa Zelllinie:

DMEM  
10 % FCS  
1 % Penicillin/Streptomycin

NSC-34 Zelllinie:

- A) Expansionsmedium  
DMEM  
10 % FCS  
1 % Penicillin/Streptomycin
- B) Differenzierungsmedium  
DMEM/Ham's F12 (1:1)  
Glutamax  
2 % FCS

HEK293T Zelllinie:

- A) Expansionsmedium  
DMEM  
Glutamax (500 µM)  
25 mM HEPES  
10 % FCS  
1 % Geneticin (G418)

(Selektion für „large T antigen“)

## Material & Methoden

B) Transfektionsmedium  
OptiMEM  
ohne Antibiotika; ohne Serum

C) Verpackungsmedium für Viren

Neurobasal  
Glutamax  
25 mM HEPES  
10 % FCS

primäre Motoneurone :  
(Vollmedium)

Neurobasal  
Glutamax (500 µM)  
2 % HS  
2 % B27 Supplement

**Tabelle 7: Zellkulturmedien und Zusätze**

<b>Poly-D,L-Ornithin</b>	<b>Sigma</b>
<b>Laminin</b>	<b>Invitrogen</b>
<b>Neurobasal</b>	<b>Invitrogen</b>
<b>DMEM</b>	<b>Invitrogen</b>
<b>OptiMEM</b>	<b>Invitrogen</b>
<b>Glutamax</b>	<b>Invitrogen</b>
<b>B27 Supplement</b>	<b>Invitrogen</b>
<b>Pferdeserum (HS)</b>	<b>Linaris (Charge: 6635F)</b>
<b>Fetales Kälber Serum (FCS)</b>	<b>Linaris</b>
<b>Penicillin/Streptomycin</b>	<b>Invitrogen</b>
<b>PBS</b>	<b>PAA</b>
<b>HBSS</b>	<b>Invitrogen</b>
<b>BDNF</b>	<b>Institut f. Klin.Neurobiologie</b>
<b>CNTF</b>	<b>Institut f. Klin.Neurobiologie</b>
<b>GDNF</b>	<b>Promega</b>
<b>DMSO</b>	<b>Sigma</b>
<b>FCCP</b>	<b>Invitrogen/Molecular Probes</b>

## Material & Methoden

<b>Taxol</b>	<b>Sigma</b>
<b>Nocodazol</b>	<b>Sigma</b>
<b>Cycloheximid</b>	<b>Sigma</b>
<b>Aktinomyzin D</b>	<b>Sigma</b>
<b>Galiellalactone</b>	<b>Invitrogen</b>

### 5.1.11.2 Medien für Bakterienkulturen:

LB-Medium (lysogeny broth):		5 g/l Hefeextrakt 10 g/l Trypton/Bacto-Pepton 10 g/l NaCl (ohne NaCl für FuGW) transformierte Bakterien) pH 7.0
TB –Medium (terrific broth):	<b>A)</b>	12 g/l Trypton/Bacto-Pepton 24 g/l Hefeextrakt 4 ml/l Glycerin auf 900 ml mit H <sub>2</sub> O auffüllen
Salzlösung:	<b>B)</b>	2.31 g/100 ml KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 12.5 g/100 ml K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> Vor Gebrauch A durch Zugabe von B aktivieren
LB/TB-Agar:		15 g/l Select Agar  zu oben genannten Medien hinzufügen anschließend autoklavieren und Platten gießen

LB- und TB-Medium bzw. LB- Agar wurden vor Inokulation autoklaviert und mit dem benötigten Selektionsantibiotikum versetzt.

## Material & Methoden

SOC-Medium:	Invitrogen
Ampicillin (1000X):	50 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O
Kanamycin (1000X):	30 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O
Alkalische Lyse:	
Lösung I	50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl pH 8,0 10 mM EDTA 10 µg/ml RNase
Lösung II	0,2 M Natriumhydroxid 1 % SDS (Natriumdodecylsulfat)
Lösung III	60 ml 5 M Kaliumacetat 11,5 ml Eisessig 28,5 ml H <sub>2</sub> O →3 M Kalium, 5 M Acetat
<b>5.1.12 Kits</b>	
BIG Dye Terminator MIX 1.1	Applied Biosystems
Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
EndoFree Plasmid Maxi Kit	QIAGEN, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN, Hilden
Site directed mutagenesis Kit	Stratagene
ATP determination Kit	Invitrogen
BCA protein Assay	Pierce
<b>5.1.13 Technische Geräte</b>	
Confocal Laser Scanning Microscopes:	Leica SP2 (upright) Leica SP5 (inverted)

## Material & Methoden

Wide Field Microscope:	Nikon Eclipse 2000TE
Lichtquelle für Nikon Eclipse 2000TE	Xenon-Bogenlampe
DG-4	Sutter Inc.
Excitationsfilter	AHF-Analysetechnik, Tübingen
Emmissionsfilter	AHF-Analysetechnik, Tübingen
Dualband-Filter GFP/DsRed	AHF-Analysetechnik, Tübingen
Dichroische Spiegel	AHF-Analysetechnik, Tübingen

Ultrazentrifuge (UZ) OPTIMA L-70	Beckman&Coulter
SW 28 swing out	Beckman&Coulter
SW 60 swing out	Beckman&Coulter
NVT 65 near vertical tube	Beckman&Coulter

Röhrchen für die Ultrazentrifugation	Beckman&Coulter
Polyallomer Centrifuge Tube 25x89mm	für Rotor SW 28
Polyallomer Centrifuge Tube 11x60mm	für Rotor SW 60
OptiSeal Polyallomer	für Rotor NVT 65

### 5.1.14 Software

LAS AF, FRAP Wizard	Leica
NIS-Elements	Nikon
ImageJ/MBF-ImageJ	National Institute of Health/ Plugin-Sammlung der McMaster University, Canada; Biophotonics Facility

#### Extra Plugins

(<http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/index.html>)

- nd2toimage6D
- multiple kymographs
- straighten
- sholl analysis

Microsoft Excel  
Adobe Photoshop 7

### 5.2 Methoden

#### 5.2.1 DNA Isolation aus Geweben

Für die Isolation von DNA aus Schwanzbiopsien oder embryonalen Kopfbiopsien der Maus wurde der DNA-Lysispuffer (Material) verwendet. Schwanzbiopsien wurden in 1,5 ml-Reaktionsgefäße (Eppendorf) gefüllt mit 250 µl DNA-Lysispuffer, überführt. Zum Aufschluss des Gewebes wurden die Biopsien in Gegenwart von Proteinase K bei 60°C und 1400 rpm ÜN im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde das Volumen mit ddH<sub>2</sub>O auf 500 µl erhöht und zur Trennung von Proteinen und Lipiden von der DNA, 500 µl Chloroform/Phenol/Isoamylalkohol hinzu pipettiert. Die Proben wurden 4-5 Mal invertiert und anschließend bei 4°C und 20000 x g für 10 Min zentrifugiert. Bei stark protein- bzw. lipidhaltigen Biopsien (embryonale Köpfe) wurde diese DNA-Extraktion durch organische Lösungsmittel ein zweites Mal wiederholt. Anschließend wurde die wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in diesem die DNA mit Hilfe von Isopropanol gefällt und bei 4°C und 20000 x g 10 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde ein Mal mit 70 prozentigem EtOH gewaschen, nochmals zentrifugiert (s.o.), der ÜS vorsichtig abgekippt und das Reaktionsgefäß mit Pellet bei offenem Deckel gestürzt auf die Werkbank gestellt, um Reste des Ethanols abdampfen zu lassen. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl TE-Puffer resuspendiert.

Als Alternative für die oben beschriebene DNA-Gewinnung genügt es unter Umständen auch in ddH<sub>2</sub>O aufgenommene embryonale Schwanzbiopsien 10 min bei 99°C aufzukochen, wodurch DNA aus den platzenden Zellen freigesetzt wird. Für eine nachfolgende Genotypisierung via PCR wurden 2 µl der so gewonnenen DNA-Suspension für verwendet.

#### 5.2.2 Transformation chemokompetenter Bakterien mit Plasmiden

Chemokompetente Zellen wurden mit 1-2 µg (1 µl) Plasmid-DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien für 90 sec bei 42°C thermisch behandelt, um die DNA-Aufnahme zu steigern. Danach wurden die Bakterien sofort wieder auf Eis gestellt, nach 3 min 250 µl SOC-Medium hinzu pipettiert und für 45-60 min bei 37°C und 1400 rpm im Thermomixer inkubiert.

Nachfolgend wurden Bakteriensuspensionen auf LB-Agar mit Selektionsantibiotikum in unterschiedlichen Mengen ausgestrichen, um nach ÜN Inkubation bei 37°C in Abhängigkeit der Transformationseffizienz einzelne Klon-Kolonien zur erhalten.

## Material & Methoden

### 5.2.3 Aufreinigung und Prozessierung von Plasmiden

Maxi –Präparation (QIAGEN)

Für die Isolation von Plasmid-DNA im präparativen Maßstab wurden 200-350 ml einer Übernachtskultur (LB + Antibiotikum) bei 4°C mit 6000 x g für 15 min sedimentiert und mittels des Endofree Plasmid Maxi Kit aufgereinigt. Die Durchführung erfolgte dabei nach den Angaben des Herstellers. Die erhaltenen DNA-Pellets wurden schließlich in 300 - 500 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Sowohl Reinheit als auch Konzentration der DNA-Lösung wurden am Nanodrop (Peqlab) bestimmt.

Mini-Präparation (analytischer Maßstab)

Zur Identifikation von Plasmid tragenden Klonen, wurden 1ml LB mit Selektionsantibiotikum für Übernachtskulturen in 1.5 ml Reaktionsgefäße vorgelegt und mit jeweils einem Klon inokuliert. Nach dem Schließen der Reaktionsgefäße wurde der Deckel perforiert, um einen verbesserten Gasaustausch zu ermöglichen und die Wachstumsrate der Bakterien zu steigern. Alle Kulturen wurden wenn nicht anders erwähnt, für 14-18 h bei 37°C und 1400 rpm im Thermomixer inkubiert.

Anschließend wurden die Kulturen durch Zentrifugation bei 12000 x g für 10 min sedimentiert und der ÜS verworfen. Der Aufschluss der Bakterien erfolgte durch Resuspension des Pellets in 100µl Lösung I sowie durch Zugabe von 200µl Lösung II. Nach mehrmaligem Invertieren wurde die Suspension mit Lösung III neutralisiert, 5 min auf Eis inkubiert und Präzipitate bei 4°C mit 12000 x g für 5 min sedimentiert. Der ÜS wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, die DNA anschließend mit 700µl Isopropanol gefällt und bei 4°C mit 20000 x g für 5 min pelletiert. Nach dem Waschen des DNA-Pellets mit 70 % ETOH wurde der o.g. Zentrifugationsschritt wiederholt, das EtOH abgekippt und das luftgetrocknete Pellet in 30 - 50 µl TE resuspendiert. Sowohl Reinheit als auch Konzentration der DNA-Lösung wurden am Nanodrop (Peqlab) bestimmt.

Cäsiumchlorid-Aufreinigung von Plasmid-DNA

Für die CsCl-Aufreinigung von FUGW und FUValeantin Vektoren, wurden NaCl-freie LB-Flüssigkulturen mit frische Klonen inokuliert, bei 32°C ÜN im Schikanekolben inkubiert und bei einer OD von ca. 0.6 mit 5000 x g für 20 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 15ml RNase haltiger Lösung I resuspendiert, mit 15µl Lysozym [10mg/ml] versetzt, invertiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 15 ml Lösung II hinzugegossen (nicht pipettiert) und unter vorsichtigem Invertieren für weitere 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 15 ml Lösung III wurde die Suspension sofort geschüttelt. Nach 10 minütiger

## Material & Methoden

Inkubation auf Eis wurden die Präzipitate über einen, vorher mit sterilem Wasser angefeuchteten, Faltenfilter in ein steriles 50 ml Röhrchen (Greiner) filtriert. Durch Zugabe eines gleichen Volumens Isopropanol zum Filtrat wird die DNA gefällt und bei 4°C mit 8000 x g für 1 h pelletiert. Der ÜS wurde abgesaugt, das Pellet mit 15ml 70%igem EtOH gewaschen, um Säurereste aus Lösung III zu entfernen und anschließend nochmals zentrifugiert.

Nach vollständiger Aspiration des Ethanols wurde das feuchte Pellet in 15 ml TE-Puffer (pH 8.0) resuspendiert. Der pH-Wert der DNA-TE Suspension sollte pH 7 – pH 8 betragen. Nach Zugabe von 7.5 ml TE-äquilibrierten Phenol und 7.5 ml Chloroform wurde die DNA-Suspension gemixt und bei RT mit 1500 x g für 20 min im „Swing-out“ Rotor zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues 50 ml Röhrchen (Greiner) überführt, mit 1.5 ml 3 M NaAc (pH 5.2) und 15 ml Isopropanol versetzt und gut gemixt bevor die präzipitierte DNA erneut bei 4°C mit 8000 x g für 1h pelletiert wurde. Nach Waschen mit 70 % EtOH und anschließender Trocknung kann das DNA-Pellet bei -20°C bis zum nächsten Tag gelagert werden.

Die DNA-Pellets wurden in 8 ml TE-Puffer resuspendiert, in ein 50 ml Röhrchen mit 8.80 g CsCl überführt und die Suspension bis zur vollständigen Lösung des Salzes invertiert. Durch die Zugabe von 800µl einer gesättigten EtBr-Lösung (10 mg/ml EtBr in n-Butanol gesättigtem TE) wurde die Lösung bei 37°C für 15 min inkubiert bevor die DNA-EtBr Präzipitate bei RT mit 9500 x g für 10 min abzentrifugiert wurden. Der ÜS wurde in ein OptiSeal-Röhrchen überführt und bei RT mit 65000 rpm (Rotor NVT65) für 5.5 h ultrazentrifugiert. Dabei ist es wichtig sowohl den Rotor als auch die Ultrazentrifuge auf RT zu bringen, da CsCl bei Kontakt mit kalten Oberflächen Kristalle bildet die den Rotor und die Zentrifuge beschädigen.

Sofort nach der Ultrazentrifugation wurde die, unter UV-Licht fluoreszierende, Bande von supercoiled DNA über eine Kanüle in eine 2 ml Spritze abgesaugt und in ein 15 ml Röhrchen (Greiner) überführt. Abschließend wurde das EtBr über organische Extraktion mit n-Butanol gesättigtem TE-Puffer entfernt. Reste von n-Butanol wurden mit Diethylether ausgewaschen.

Für die abschließende Präzipitation wurde die in neuem TE-Puffer aufgenommene DNA mit 1/10 Volumen 3 M NaAc (pH 5.2) und zweifachen Volumen eiskaltem EtOH versetzt, gemischt und bei 4°C ÜN inkubiert. Nachfolgend wurde die DNA bei 4°C mit 10000 x g für 1 h abzentrifugiert, das Pellet mit 70 prozentigem EtOH gewaschen und nochmals für 10 min zentrifugiert. Nach dem Absaugen von EtOH-Resten wurde das Pellet in 10 mM Tris-HCl

## Material & Methoden

(pH 8.0) resuspendiert. Sowohl Reinheit als auch Konzentration der DNA-Lösung wurden am Nanodrop (Peqlab) bestimmt.

### Restriktionsverdau

Im Fall der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse in der *pmm*-Diagnostik wurde der gesamte PCR-Ansatz, ohne vorherige DNA-Mengenbestimmung enzymatisch verdaut. Plasmide (2-4µg) wurden zu Klonierungszwecken unter Einhaltung der vorgeschlagenen Restriktionsbedingungen von Fermentas verdaut. Dabei überschritt der Anteil des Restriktionsenzym nie 1/10 des gesamten Reaktionsvolumens.

### Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um nach einem Restriktionsverdau eine Religation von Plasmiden zu unterbinden, wurden geschnittene Plasmide vor der Gelaufreinigung 30 min bei 37°C in Gegenwart von alkalischer Phosphatase (1 U/pmol) inkubiert. Die alkalische Phosphatase (CIAP = calf intestinal alkaline phosphatase) dephosphoryliert das 5'-Ende wodurch eine Verknüpfung zweier kompatibler DNA-Strangüberhänge verhindert wird.

### Agarose-Gelelektrophorese

Enzymatisch gespaltene DNA oder PCR-Produkte wurde im Agarosegel elektrophoretisch getrennt und unter Zuhilfenahme standardisierter DNA-Molekulargewichtsmarkern analysiert. Die Konzentration von Agarose in 1X TAE-Puffer betrug 1 – 3%. Vor dem Gießen des Agarosegels wurde die Agaroselösung mit Ethidiumbromid versetzt, um die DNA nach Auftrennung im UV-Licht des Transilluminators sichtbar zu machen. Die Proben wurden mit Ladepuffer gemischt, in die Taschen des polymerisierten Flachbettgels aufgetragen und bei 120V aufgetrennt. Die Konzentration des Agarosegels wurde nach der Größe zu trennender DNA-Fragmente gewählt. Je kleiner die Fragmente und je geringer der Größenunterschied desto höher die Konzentration.

### Gelaufreinigung

Nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA, wurde die gewünschte DNA-Bande anhand des Molekulargewichtsmarkern unter UV-Licht identifiziert, mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und nachfolgend mit Hilfe des Gel-Extraktion Kits von Qiagen aufgereinigt. So gewonnene DNA konnte ohne Zwischenschritte weiterverwendet werden.

## Material & Methoden

### Ligation

Kompatible DNA-Enden wurden mit Hilfe der T4-DNA-Ligase ligiert. Dieses Enzym katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen der 3'-OH-Gruppe und der 5'-PO<sub>4</sub>-Gruppe benachbarter DNA-Moleküle. Die Ligation eines linearisierten Vektors mit einem Fragment (Insert) erfolgte im molaren Verhältnis von 1:3, wobei 30 - 50ng des Vektors eingesetzt wurden. Die Ligationsreaktion wurde bei RT (20°C) über Nacht durchgeführt.

Zur Verifikation einer Erfolgreichen Ligation wurden Bakterien mit dem Ligationsansatz transformiert. Der Transformationsansatz wurde anschließend auf LB-Agarplatten mit Selektionsantibiotikum ausgestrichen und ÜN bei 37°C inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden Flüssigkulturen für einen Kontrollverdau im analytischen Maßstab angesetzt, um Klone zu identifizieren die den richtigen Vektor mit Insert enthielten.

### 5.2.4 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die PCR Methode wurde 1985 etabliert (Saiki et al.; 1985) und erlaubt die exponentielle Amplifikation von DNA-Sequenzen, die durch flankierende Oligonukleotide (Primer) definiert werden. Die Primer dienen als Startpunkt für die DNA-Polymerase und ermöglichen dadurch die spezifische Neusynthese eines DNA-Tochterstrangs.

Die PCR wird in drei Schritte gegliedert: 1) Denaturierung, 2) Annealing, 3) Elongation. Wenn nicht anders beschrieben wurde die primäre DNA-Denaturierung für genomische DNA bei 95°C durchgeführt, gefolgt von einer Abkühlung auf die Annealingtemperatur. Diese hängt von der spezifischen Schmelztemperatur der eingesetzten Primer ab. Die Temperatur während der Elongationsphase betrug 72°C wobei die Elongationszeit in von der zu amplifizierenden Fragmentgröße abhängt.

**Tabelle 8: Standardzusammensetzung eines PCR Ansatzes; \* PCR abhängig**

Komponente	Volumen	Endkonzentration
DNA	1.0µl (150-500ng)	
Puffer [25mM MgCl <sub>2</sub> ]	3.0µl	2.5 mM
Betain [5M]*	6.0µl	1.0 M
Primer <sub>for</sub> [50 µM]	0.2µl	330 nM
Primer <sub>rev</sub> [50 µM]	0.2µl	330 nM
dNTPs [10 mM]	1.0µl	330 µM
Taq-Polymerase [5 U/µl]	0.3µl	0.05 U/µl

## Material & Methoden

<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	18.3µl
<b>Reaktionsvolumen</b>	30µl

### 5.2.5 Ortsspezifische Mutagenese

Die mutagenese Reaktionen zur Herstellung der dominant-negativen STAT3-EYFP Isoformen wurden mit dem „site directed mutagenesis Kit“ (Stratagene) durchgeführt. Der Reaktionsansatz und die PCR-Bedingungen sind für den Einzelnukleotidaustausch im STAT3-EYFP-N1 Vektor aufgeführt. Nach der Mutagenesereaktion wurden methylierte bzw. hemimethylierte DNA durch einstündige Inkubation mit dem Restriktionsenzym Dpn I verdaut, um nicht mutierte Ausgangsplasmide zu verdauen.

**Tabelle 9: Beispiel eines Reaktionsansatzes für die ortsspezifische Mutagenese**

<b>Komponente</b>	<b>Volumen</b>	<b>Schritt</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
<b>DNA</b>	1.5µl (20ng)	<b>1. Denaturierung</b>	95°C	30 sec
<b>Puffer (10x)</b>	5.0µl	<b>2. Denaturierung</b>	95°C	30 sec
<b>Primer<sub>fow</sub> [100ng/µl]</b>	1.25µl	<b>3. Annealing</b>	55°C	1 min
<b>Primer<sub>rev</sub> [100ng/µl]</b>	1.25µl	<b>4. Elongation</b>	68°C	8 min
<b>dNTP-Mix</b>	1.0µl	<b>5. GOTO 2</b>	---	16 Zyklen
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	40.0µl	<b>6. hold at</b>	4°C	unendlich
<b>Pfu-Turbo™ Polymerase [2.5U/µl]</b>	1.0µl			
<b>Reaktionsvolumen</b>	50.0µl			

### 5.2.6 Kultur von embryonalen Motoneuronen der Maus

Die Präparation von primären Mausmotoneuronen wurde an Embryonaltag 12.5 (E12.5) oder E13.5, wie unter Wiese et al. 2010 beschrieben, durchgeführt. In Kürze: Trächtige Muttertiere wurden durch cervicale Dyslokation getötet, das Bauchfell äußerlich mit Terralin desinfiziert und der Bauchraum geöffnet. Die beiden Hörner der Gebärmutter wurden am Stück entnommen. Anschließend wurden die Embryonen aus der Fruchtblase isoliert und in HBSS+β-Mercaptoethanol [10 nM] überführt und das lumbale Rückenmark als Ganzes aus dem Embryo gelöst. Nach dem Entfernen der Glia limitans wurde das Rückenmark in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 180 µl HBSS+β-Mercaptoethanol überführt und, bis zum Aufschluss des Gewebes mit 0.1 % Trypsin, auf Eis gelagert. Nach dem Abstoppen des Trypsinverdaus

## Material & Methoden

mit Trypsininhibitor (0.1%) wurde das Gewebe luftblasenfrei trituriert und die homogene Zellsuspension auf eine Antikörper (anti-p75<sup>NTR</sup> Antikörper, MLR2) beschichtete „panning“-Platte übertragen. Nach 30-40 min wurden die „panning“-Platten 3 Mal mit 37°C warmen Neurobasal-Medium + Glutamax +  $\beta$ -Mercaptoethanol [10 nM] gewaschen, um ungebundene Zellen zu entfernen. Nach der Separierung der Motoneurone wurde die spezifische Antikörper-Motoneuronen Bindung durch die Zugabe von Depolarisationslösung gelöst. Nachfolgend wurde das 3 fache Volumen Vollmedium hinzu pipettiert, die Kulturschale mehrmals mit dem darin enthaltenen Mix aus Vollmedium und Depolarisationslösung gespült. Anschließend wurden die eluierten Motoneuronen in einem Probenröhrchen abzentrifugiert („swing-out“ Rotor, 5 min, 400 x g, RT). Der ÜS wurde verworfen und die Motoneuronen in temperiertem Vollmedium resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellzahl in einer Neubauerzählkammer bestimmt. Nach dem Einstellen der gewünschten Zellzahl/ $\mu$ l, wurden die Motoneurone ausplattiert. Das Volumen wurde 30 min nach Absetzen der Motoneurone mit Vollmedium und der gewünschten Kombination von Neurotrophen Faktoren erhöht.

### 5.2.7 Genotypisierung

#### 5.2.7.1 *pnn*-Mauslinie

Bei der *pnn*-Mauslinie standen zwei verschiedene Methoden zur Genotypisierung Verfügung. Für die Mauszucht wurde routinemäßig eine RFLP-Analyse mit der entsprechenden, amplifizierten Genregion durchgeführt. Zur schnellen Genotypisierung parallel zu einer Motoneuronenpräparation wurde ein Verfahren zur SNP-Analyse (Single Nucleotide Polymorphism) an einem LightCycler<sup>®</sup> (Roche) genutzt.

#### RFLP-Analyse

Die Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus (RFLP-) Analyse beruht auf der Existenz eines Nukleotidaustauschs, durch den Schnittstellen für Restriktionsenzyme wegfallen oder neu geschaffen werden. Nach einer PCR mit sequenzspezifischen Primern wird das PCR-Produkt mit einem Restriktionsenzym verdaut und anschließend auf einem Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anhand des Bandenmuster bzw. der Fragmentlängen können die Proben genotypisiert werden. Für die Genotypisierung der *pnn*-Mauslinie mittels RFLP-Analyse wurde zunächst ein ~450 bp DNA Fragment mittels PCR amplifiziert.

#### Tabelle 10: PCR-Ansatz zur *pnn*-Genotypisierung mittels RFLP-Analyse

## Material & Methoden

Komponente	Volumen
DNA	1.0µl
Puffer [25mM MgCl <sub>2</sub> ]	2.0µl
TBCE <sub>for</sub> [50µM]	0.2µl
TBCE <sub>rev</sub> [50µM]	0.2µl
dNTPs [10mM]	1.0µl
Taq-Polymerase [5U/µl]	0.3µl
ddH <sub>2</sub> O	15.3µl
Reaktionsvolumen	20.0µl

Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	94°C / 00 min
Denaturierung	94°C / 0 sec
Annealing	53°C / 5 sec
Extension	72°C / 0 sec
CO 2	--- / Zyklen
Final	4°C / endlich

Anschließend wird der gesamte PCR-Ansatz für 1 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym Mnl I inkubiert (vgl. Tabelle 10), für welches das *pnm*-mutierte Allel eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle trägt. Die Restriktionsfragmente werden in einem 3 % Agarosegel elektrophoretisch in 1X TAE aufgetrennt. Es ergeben sich folgenden Bandenmuster für,

Wildtyp: 200 bp / 300 bp

Heterozygot: 100 bp / 200 bp / 300 bp

*pnm*-Mutante: 100 bp / 200 bp

**Tabelle 11: Ansatz Restriktionsverdau bei RFLP-Analyse**

Komponente	Volumen
PCR-Produkt	20.0µl
Puffer Grün	2.5µl
Mnl I	0.2µl
ddH <sub>2</sub> O	2.3µl
Reaktionsvolumen	25.0µl

Light-Cycler Diagnostik:

Die Light-Cycler Diagnostik wurde als alternative *pnm*-Genotypisierungsmethode etabliert. Sie basiert auf einem Fluoreszenz Resonanz Energietransfer (FRET) zwischen zwei in dieser PCR eingesetzten Hybridisierungs-Sonden. Die Sensorsonde ist mit Fluoreszein am 3'-Ende

## Material & Methoden

(Donor-Fluorophor) markiert, die Ankersonde mit LightCyclerRed640 am 5'-Ende (Akzeptor-Fluorophor). Die Sonden binden nach Denaturierung an den komplementären Strang des sich bildenden PCR-Produkts zwischen den Primern. Wird das Donor-Fluorophor mit Licht seiner spezifischen Exzitationswellenlänge angeregt, werden seine delokalisierten  $\pi$ -Elektronen auf ein höheres Orbital gehoben. Normalerweise würde ein Teil der absorbierten Energie, von so angeregten Elektronen in Form von Licht emittieren, da sich aber ein geeignetes Akzeptor-Fluorophor (Ankersonde) in unmittelbarer Umgebung des Donor-Fluorophors befindet, wird die Energie auf den Akzeptor übertragen. Die übertragene Energiemenge stimmt mit der Energiemenge der spezifischen Exzitationswellenlänge des Akzeptor-Fluorophors überein und induziert dadurch dessen Fluoreszenzemission. Mit zunehmender Zyklenzahl wird mehr Amplifikat gebildet, mehr Sonden können binden und die Fluoreszenzintensität steigt proportional zur Menge des entstandenen PCR-Produktes. Dies ermöglicht die Quantifizierung des PCR-Produktes in Echtzeit („quantitative real time PCR“).

Der LightCycler® ist ein Thermocycler mit integriertem Fluorimeter. Die PCR läuft in lichtdurchlässigen Glaskapillaren ab, die ein großes Oberflächen-Volumen-Verhältnis besitzen. Dadurch ermöglicht die LightCycler®-Reaktion im Vergleich zur konventionellen PCR kürzere Heiz- und Abkühlzeiten und verkürzt damit die Reaktionsdauer.

Im Anschluss an die PCR wurde eine Schmelzkurve erstellt. Ausgehend von 40°C wurde die Temperatur schrittweise erhöht. Erreicht man den Sonden spezifischen Schmelzpunkt kommt es zum Verlust des Fluoreszenzsignals. Dieser Schmelzpunkt ist charakteristisch für jede Reaktion und tritt durch Fehlpaarungen bei niedrigeren Temperaturen auf. Daher liegt in der *pnm*-Diagnostik der Sondenschmelzpunkt für das mutierte Allel ca. 5°C unter dem Schmelzpunkt des wildtypischen Allels.

**Tabelle 12: Lightcycler basierte Diagnostik des *pnm*-mutierten Allels**

Komponente	Volumen
DNA	2.00 $\mu$ l
Anchor Sonde	0.30 $\mu$ l
Sensor Sonde	0.30 $\mu$ l
Primer <sub>fow</sub>	0.13 $\mu$ l
Primer <sub>rev</sub>	0.13 $\mu$ l
DNA-Master (HybProbe)	2.00 $\mu$ l

## Material & Methoden

<b>MgCl<sub>2</sub></b>	1.60µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	13.54µl
<b>Reaktionsvolumen</b>	20.00µl

		Temperatur	Dauer	Slope	Aufnahmemodus
<b>Denaturierung</b>		95°C	30 sek	20°C/sek	
<b>Amplifikation</b>	1	95°C	10 sek	20°C/sek	einfach
	2	62°C	10 sek	20°C/sek	
	3	72°C	10 sek	20°C/sek	
<b>Schmelzkurve</b>	1	95°C	10 sek	20°C/sek	continuous
	2	40	30	20	
	3	85	0	0.1	
<b>Abkühlung</b>	1	40	0	20	

### 5.2.7.2 STAT3 Mauslinien

Die Genotypisierung der STAT3-Mauslinien wurde mittels PCR durchgeführt.

STAT3<sup>wt/KO</sup>:

**Tabelle 13: Thermocycler-Programme zur STAT3<sup>KO</sup>-Allel und STAT3<sup>lox</sup>-Allel Detektion**

Schritt	Temperatur	Zeit
<b>1. Denaturierung</b>	95°C	1 min
<b>2. Denaturierung</b>	95°C	10 sec
<b>3. Annealing</b>	56°C	15 sec
<b>4. Elongation</b>	72°C	60 sec
<b>5. GOTO 2</b>	---	35 Zyklen
<b>6. Lagern bei</b>	4°C	unendlich

#### Nachweis Wildtyp-Allel:

Primer: „STAT3-KO a“ + „STAT3-KO b“

Amplikon: ~ 1 kb

#### Nachweis Knockout-Allel:

Primer: „STAT3-KO a“ + „STAT3-KO c“

Amplikon: ~ 1 kb

**STAT3<sup>flox/flox</sup>:**

Schritt	Temperatur	Zeit
1. Denaturierung	95°C	1 min
2. Denaturierung	95°C	10 sec
3. Annealing	56°C	15 sec
4. Elongation	72°C	60 sec
5. GOTO 2	---	35 Zyklen
6. Lagern bei	4°C	unendlich

**Nachweis der loxP Stelle**

**Primer:** “STAT3 flox<sub>fov</sub>” + “ STAT3 flox<sub>rev</sub>”

**Amplikons:** STAT3<sup>wt/wt</sup> 250 bp  
 STAT3<sup>wt/flox</sup> 250 + 400 bp  
 STAT3<sup>flox/flox</sup> 400 bp

**5.2.8 DNA-Sequenzierung**

Sequenzierungen von DNA wurden nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977) durchgeführt. Hierbei wird die DNA ausgehend von nur einem Primer durch eine DNA-Polymerase repliziert. Durch Verwendung von 2',3'-Dideoxynukleotidtriphosphaten (ddNTP) im Gemisch mit 2'dNTP kommt es an statistisch verteilten Positionen in der Sequenz zum Kettenabbruch, da die zur Verlängerung notwendige 3'-OH-Gruppe fehlt. Die Sequenzierungsreaktion wurde nach dem Thermozyklusverfahren und mit Hilfe des Big Dye Terminator 1.1 Kit (Applied Biosystems) durchgeführt. Bei diesem Kit ist jede der 4 ddNTPs über einen spezifischen Fluoreszenzmarker identifizierbar. Die Sequenzierungsprimer haben alle eine Länge von 20 Nucleotiden. Sequenzierungsreaktionen wurden für alle Vektoren durchgeführt, die für Transfektionen und zur Herstellung von Lentiviren verwendet wurden.

**Tabelle 14: Reaktionsansatz für Cycle-Sequencing und Thermozyklus-Programm**

Komponente	Volumen
Template	0.5µl
Puffer (5x)	4.0µl
BigDye Terminator (10X)	2.0µl
Primer (15µmol)	0.3µl
H <sub>2</sub> O	13.2µl
Reaktionsvolumen	20.0µl

Für STAT3-EYFP Inserts	Temp	Zeit
Denaturierung	96°C	1 min
Denaturierung	96°C	15 sec
Annealing/Elongation	60°C	4 min
Elongation	72°C	8 min

## Material & Methoden

Nach der Kettenabbruchsreaktion wurden die amplifizierte DNA-Fragment mit 3 M NaAc gefällt, 2 Mal mit EtOH gewaschen und in HiDi-Formamid resuspendiert. Die Sequenzanalyse wurde am ABI 3130 (Applied Biosystems) durchgeführt.

### 5.2.9 Immunzytochemie

Auf coverslips kultivierte Motoneurone wurden zwei Mal mit 37°C warmen PBS gewaschen und anschließend mit 4 % PFA für mindesten 20 min bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Proben zwei Mal TBST gewaschen und, wenn nicht anders beschrieben, mit 0,3 % Triton X 100 in TBST für 20 min bei RT permeabilisiert. Für die Maskierung unspezifischer Epitope wurden Motoneurone in 15 % Ziegen Serum mit 0,3 % Triton X 100 in TBST für 30 min bei RT inkubiert. Erstantikörper wurden in TBST mit 5 % Ziegen Serum verdünnt und bei 4°C ÜN inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben zwei Mal mit TBST gewaschen. Zweitantikörper, spezifisch gegen die C-Region des Erstantikörpers, wurden in TBST verdünnt und für 1 h bei RT inkubiert. Nicht gebundener Zweitantikörper wurde schließlich durch drei Mal Waschen mit TBST entfernt. Wenn eine Kernfärbung erwünscht war, wurde während des zweiten Waschschriffs DAPI in TBST (0,25 µg/ml) verdünnt aufgetragen und überschüssiges DAPI im dritten Waschschriff entfernt.

### 5.2.10 Westernblot Analyse

Zur Immundetektion von Proteinen auf Nitrocellulosemembranen wurden zunächst unspezifische Protein-Bindungsstellen auf der Membran durch die Inkubation mit 5 % Milchpulver in TBST oder 5 % BSA (phosphospezifische AKs) in TBST für 1 h bei Raumtemperatur abgeblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem in der Block-Lösung verdünnten Primäantikörper ÜN unter Schwenken bei 4 °C. Überschüssige Antikörperlösung wurde danach in drei Waschschriffen zu je 15 min mit TBST ausgewaschen, woraufhin die Inkubation mit Peroxidase-gekoppeltem Sekundäantikörper in TBST für 1 h unter Schwenken bei Raumtemperatur folgte. Erneut wurde dreimal für je 15 min in TBST gewaschen. Die auf der Membran immobilisierten Immunkomplexe aus Antigen, Primär- und Sekundäantikörper wurden durch eine Chemilumineszenzreaktion nachgewiesen. Dazu wurde die Membran mit der Reaktionslösung gemäß den Angaben des Herstellers für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach vollständigem Entfernen der Flüssigkeit von Klarsichtfolie bedeckt in eine Röntgenkassette gegeben. Das durch die Oxidation des Substrats Luminol emittierte Licht wurde dann unter Verwendung von Röntgenfilmen mit unterschiedlichen Expositionszeiten detektiert. Die

## Material & Methoden

Nitrocellulosemembranen wurden danach zur Aufbewahrung getrocknet oder für einen erneuten Antigen-Nachweis prozessiert. Dazu erfolgte die Inkubation in Stripping-Puffer für 30 min bei 60 °C. Die Membranen wurden dann für je 30 min zweimal in H<sub>2</sub>O und schließlich für 30 min in TBST gewaschen. Die erneute Immundetektion konnte dann, wie oben beschrieben, wiederholt werden.

### **5.2.11 Organellenfärbung für Live-Imaging**

#### Rhodamin 123 (Invitrogen)

Inkubation von Motoneuronen für 15 min bei 37°C mit 0,2 µg/ml Rhodamin 123. Anschließend 2 Mal Waschen der Zellen mit 37°C warmem L15-Leibowitz Medium.

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

#### JC-1 (Invitrogen)

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

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

#### MitoTracker Green FM (Invitrogen)

Inkubation von Motoneuronen für 15 min bei 37°C mit 25 nM MitoTracker Green. Anschließend mehrmaliges Waschen der Zellen mit 37°C warmem Leibowitz's L15-Medium. MitoTracker Green FM ist ein Mitochondrien-selektiven Farbstoff, der in aktiven Mitochondrien Membranpotential unabhängig konzentriert wird und sich auch für die Analyse des Mikrotubuli-abhängigen Transports von Mitochondrien eignet.

#### MitoFluor Red594 (Invitrogen)

Inkubation von Motoneuronen für 15 min bei 37°C mit 100 nM MitoFluor Red594. Anschließend 2 Mal Waschen der Zellen mit 37°C warmem Leibowitz's L15-Medium.

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

## Material & Methoden

### Lysotracker Red DND-99 (Invitrogen)

Inkubation von Motoneuronen mit 50 nM Lysotracker Red für 60 min in Kulturmedium bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub>. Anschließend 3 Mal waschen der Zellen mit 37°C warmen Leibowitz's L15-Medium gewaschen und mit der Lebendzellbeobachtung begonnen. Dieser Farbstoff ist eine schwache Base gekoppelt an ein Fluorophor der die Eigenschaft besitzt, Zellmembranen passiv zu überwinden und spezifisch in Zellkompartimenten mit niedrigem pH-Wert zu akkumulieren. Dieser Farbstoff eignet sich sehr gut für die Analyse des axonalen Transports.

Für alle Farbstoffe wurden jeweils vor dem Experiment frische Vorverdünnungen in Vollmedium hergestellt.

### **5.2.12 Pharmakologische Inhibition der Transkription**

#### Actinomycin D Behandlung:

Motoneurone wurden in Gegenwart von BDNF [5 ng/ml] oder BDNF und CNTF [10 ng/ml] kultiviert. Nach 3 beziehungsweise 4 DIV wurde das Kulturmedium durch frisches Vollmedium mit neurotrophen Faktoren und Actinomycin D ersetzt. Motoneurone wurden in Gegenwart unterschiedlicher Actinomycin D Konzentrationen von 0.1 nM bis 80 nM für weitere 48 h beziehungsweise 24 h kultiviert und nach 5 DIV mit 4 % PFA fixiert. Die Axonlängen-messung wurde anhand von Immunfluoreszenzfärbung gegen MAP2 und tyr-Tubulin durchgeführt.

#### Galiellalactone Behandlung:

Motoneurone wurden in Gegenwart von BDNF oder BDNF und CNTF kultiviert. Nach 3 DIV wurde das Kulturmedium durch frisches Vollmedium mit neurotrophen Faktoren und Galiellalactone [0.1 - 20 µM Endkonzentration] ersetzt. Motoneurone wurden in Gegenwart unterschiedlicher Galiellalacton-Konzentrationen von 0.1 µM – 20 µM für weitere 48 h kultiviert und nach 5 DIV mit 4 % PFA fixiert. Die Axonlängenmessung wurde anhand von Immunfluoreszenzfärbung gegen MAP2 und tyr-Tubulin durchgeführt.

### **5.2.13 Herstellung von Lentiviren**

Alle Arbeiten zur Herstellung von Lentiviren wurden unter den geltenden SII-Labor Sicherheitsstandards durchgeführt. Als Verpackungszelllinie wurden HEK293T Zellen verwendet (Graham FL, 1977). Dieser Zellklon exprimiert das „SV40 large T“ Antigen das

## Material & Methoden

diese Zelllinie dazu befähigt Plasmide zu amplifizieren, die den SV40 Replikationsursprung (origin of replication) tragen.

Ein Transfektionsansatz ist für ein lentivirales Überexpressionsplasmid in Tabelle 15 gezeigt. Der verwendete Verpackungsvektor pCMV $\Delta$ R8.9 (2. Generation) wurde von Naldini (Naldini et al. 1996) entwickelt. Der Pseudo typing Vektor pVSV-G exprimiert das vesikuläre Stomatitis Virus Glykoprotein unter der Kontrolle des CMV Promotors und dient der verbesserten Interaktion des viralen Partikels mit der Wirtszelle. Der ursprüngliche Expressionsvektor FUGW (Lois et al. 2002) der die EGFP Expression unter der Kontrolle des humanen Ubiquitin-C Promotor treibt, wurde durch Valentin Klein (MPI für Neurobiologie, Martinsried) um eine multiple Klonierstelle erweitert und als FUValentin (FUVal) bezeichnet.

**Tabelle 15: Transfektionsansatz zur Virusproduktion**

	<b>Komponente</b>	<b>Volumen/Menge</b>
<b>Medium</b>	OptiMEM	9 ml
<b>Verpackungsvektor</b>	pCMV $\Delta$ R8.9	45 $\mu$ g
<b>Pseudotyping Vektor</b>	pVSV-G	30 $\mu$ g
<b>Expressionsvektor</b>	FUVal+Insert	18 $\mu$ g

Eine Virus-Charge wurde mit HEK293T Zellen aus 2 zu 90 % konfluenten 175cm<sup>2</sup> Kulturflaschen (Sarstedt) erzeugt. Vor der Transfektion wurde der Plasmidmix und Lipofectamin 2000 in jeweils 1,5 ml serumfreiem OptiMEM inkubiert. Während der Inkubation wurden die HEK293T Zellen 1 Mal mit 37°C warmen PBS gewaschen, um Serumreste zu entfernen. Anschließend wurde das PBS abgesaugt und die Zellen in 2 ml 37°C warmen Trypsin/EDTA (1%) inkubiert. Jetzt wurde der Plasmidmix vorsichtig zur Lipofectamin 2000 Lösung gekippt und diese Suspension für weitere 20 min inkubiert. Mittlerweile haben sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst, das Trypsin wurde durch Zugabe von 10 ml serumhaltigem Kulturmedium inhibiert und die Zellen luftblasenfrei trituriert. Anschließend wurden die Zellen bei 400 x g für 5 min abzentrifugiert, in frischem 37°C warmen OptiMEM 10 % FCS resuspendiert und in Zellzahl bestimmt. Nach dem Einstellen der Zellzahl wurden die HEK-Zellen vorsichtig zum Transfektionmix gekippt, für weiter 5 min inkubiert und anschließend auf einer 10 cm Schale ausplattiert. Nach weiteren 4-6h Inkubation wurde das Transfektionsmedium gegen DMEM + 10 % FCS gewechselt. Zwischen 60 h bis 90 h post Transfektion wurden die virushaltigen Überstände abgenommen,

## Material & Methoden

sterilfiltriert, bei 4°C für 4 h ultrazentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vorsichtig abgekippt und das Viruspellet in TBS-5 Puffer resuspendiert.

### 5.2.14 Fluoreszenz Recovery after Photobleaching (FRAP)

FRAP-Experimente wurden am CSLM SP5 von Leica durchgeführt. Die implementierte Software (LAS-AF) erlaubt das Bleichen von Fluorophoren in benutzerspezifischen Regionen von Interesse (region of interest ROI). Lentiviral transduzierte primäre Motoneuronen wurden wie beschrieben auf PORN/Laminin beschichteten Deckgläschen für 5 - 6 DIV kultiviert und für die Lebendzellbeobachtung in eine Perfusionskammer eingespannt. Während der FRAP-Experimente wurden die Zellen permanent mit 37°C warmen und mit Carbogen begastem Vollmedium umspült, das die gewünschten neurotrophen Faktoren sowie Nocodazol oder Cycloheximid enthielten. Alle Aufnahmen wurden mit 12 Bit Bildtiefe und 2-fach Vergrößerung über ein 20x Glycerin/Wasser Objektiv (NA 0.7) aufgenommen. Die Auflösung wurde auf 512x512 Pixel eingestellt während die Scan-Geschwindigkeit in allen Phasen des FRAP-Experiments 400 Hz betrug. Die Anregungswellenlänge für EGFP und STAT3-EYFP exprimierende Motoneurone waren 488 nm beziehungsweise 514 nm. Die Ausgangsleistung für den 2.5mW Krypton/Argon Laser wurde auf 80 % eingestellt. Um ungewolltes Bleichen während der Prä-Bleichphase und Post-Bleichphase zu vermeiden, wurden die Laserintensitäten der 488 nm und 514 nm Linie auf 6 % bzw. 15 % der Ausgangsleistung eingestellt. Um die maximale Bleichleistung zu erreichen, wurde der Laserstrahl mit 100 % Laserintensität mit Hilfe des „zoom in modes“ (FRAP wizard, LAS AF) auf die ROI fokussiert. Das vollständige Bleichen der EGFP und EYFP Fluorophore wurde innerhalb 6.62 s erreicht.

FRAP-Konditionen:

#### 1. CNTF induzierte STAT3-Phosphorylierung

Die CNTF [10 ng/ml] Applikation wurde über einen Mediumswechsel erreicht, in dem das anfänglich durch die Perfusionskammer strömende nur BDNF [5 ng/ml] enthaltende Vollmedium durch Vollmedium ersetzt wurde, das BDNF und CNTF enthielt. Nach einer 30 min Perfusion wurden ein bis zwei FRAP-Experimente pro Deckgläschen durchgeführt.

#### 2. Nocodazol abhängige Unterbrechung des MT basierten Transports

Motoneurone wurden 15 min vor einem FRAP-Experiment mit Nocodazol [10 µM] haltigen Vollmedium und neurotrophen Faktoren perfundiert und anschließend unter Perfusion gebleicht. CNTF wurde wie o.g. appliziert.

#### 3. Cycloheximid bedingte Inhibition der Translation

## Material & Methoden

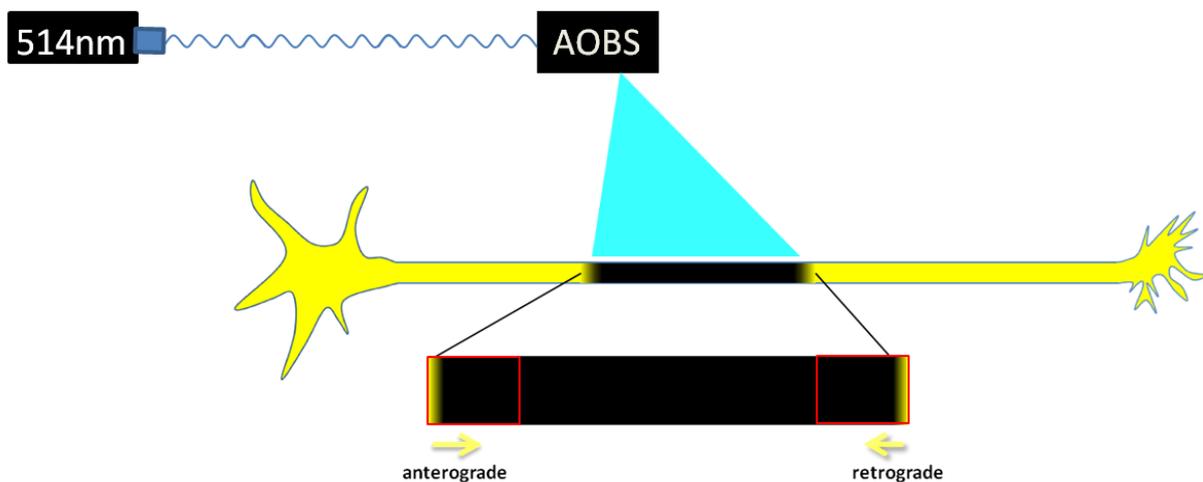
Primäre Motoneuron wurden 1 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in Cycloheximid [100 µg/ml] haltigem Vollmedium inkubiert. Anschließend wurden die FRAP-Experimente bei Perfusion mit BDNF bzw. BDNF und CNTF haltigem Vollmedium durchgeführt.

### FRAP Datenanalyse

Die qualitative Analyse der Fluoreszenzintensitäten wurde in proximalen als auch distalen ROIs (region of interest; rote Kästen in Abb.) von 20 µm Länge innerhalb des gebleichten Axonsegments durchgeführt. Die FRAP-Daten wurden mit der LAS-AF Software in Excel exportiert und dort wie folgt für die Untersuchung der Kinetik vorbereitet:

$$F_{(\text{norm},t)} = (F_t - F_{t, \text{hg}}) - (F_0 - F_{\text{hg}}) / (F_0 - F_{\text{hg}}); \text{ auch bekannt als } \Delta F / F_0.$$

Hierbei ist  $F_{(\text{norm},t)}$  die Fluoreszenzintensität zum einem bestimmten Zeitpunkt (t) der Postbleichphase.  $F_t$  ist die Fluoreszenzintensität zu einem Zeitpunkt t,  $F_{t, \text{hg}}$  beschreibt die Hintergrundfluoreszenzintensität zum Zeitpunkt t und  $F_0$  ist die durchschnittliche Fluoreszenzintensität der FRAP ROI aus 10 Bildern in der Präbleichphase.



**Abbildung 5** Experimenteller Aufbau und Analyseregion der FRAP Untersuchung an STAT3-EYFP oder EGFP überexprimierenden Motoneuronen.

Oben stehende beispielhafte Darstellung eines FRAP Experiments an einem kultivierten Motoneuron das EYFP überexprimiert. Durch die Wahl der geeigneten Laserlinie (514 nm) und mit Hilfe eines Acusto-Optical-Beam Splitter (AOBS) werden die Axonsegmente der gewünschten Region spezifisch gebleicht. Die Analyse der Mobilität des untersuchten Proteins erfolgt proximal und distal innerhalb des gebleichten Segments (rote Markierung im Bild). Die Mobilität vieler Proteine wird durch ein Zusammenspiel von Bindung und Freisetzung in bzw. aus Proteinkomplexen beeinflusst. Daraus ergeben sich unterschiedliche Populationen eines Proteins mit verschiedenen Diffusionseigenschaften. Solche Konditionen, wie sie auch für STAT3-EYFP anzunehmen sind (STAT3-Monomere und Homodimere,

## Material & Methoden

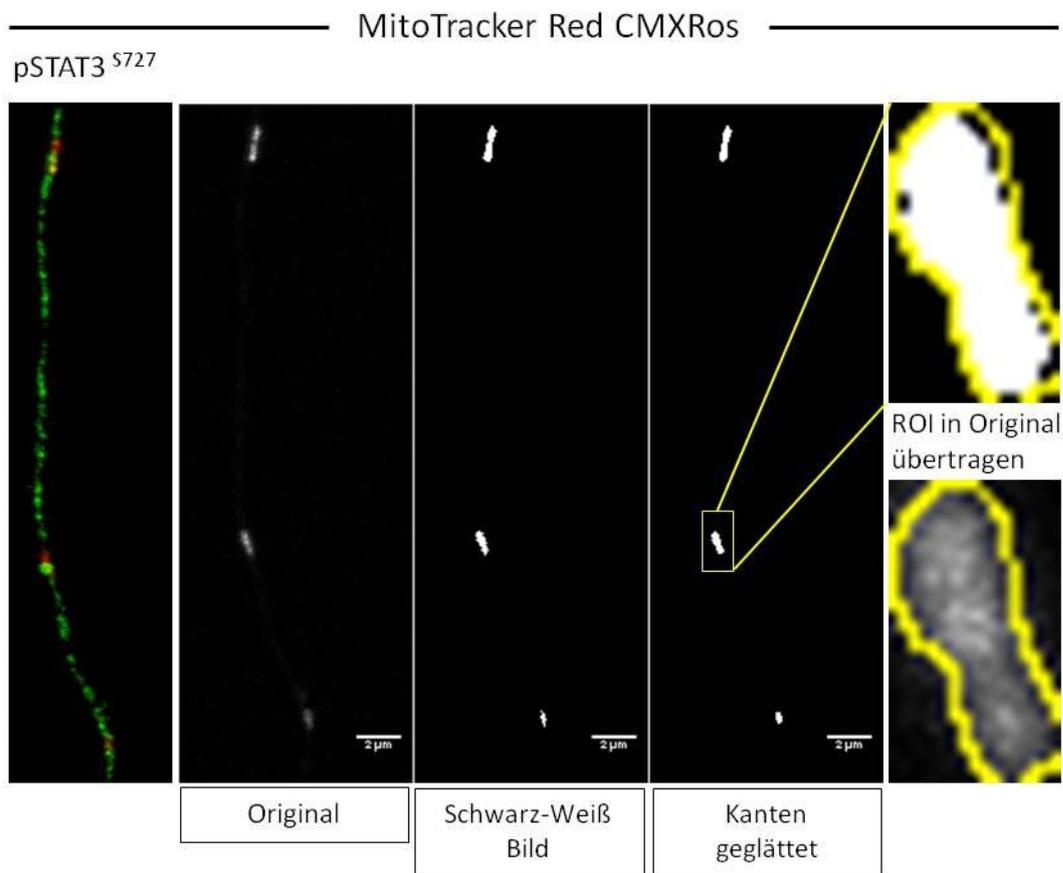
STAT3/STAT1-Heterodimere, pSTAT3/Stathmin-Verbindungen usw.), erschweren die Analyse von Diffusionskonstanten. Da ein gemeinsamer „fit“ der STAT3 FRAP-Kurven nicht immer möglich war, wurden die einzelnen Reaktionskonstanten „k“ bzw. die Halbwertszeiten ( $t_{1/2} = \ln 2/k$ ) zum Vergleich experimenteller Konditionen herangezogen („ordinary least square fit“ = „best curve fit“; GraphPad Prism).

### **5.2.15 Kolokalisierung von Proteinen in Immunfluoreszenzfärbungen**

Für die Untersuchung der Kolokalisierung von Proteinen mittels Immunfluoreszenz wurden Bildstapel im sequenziellen Zweitkanalmodus am Konfokalen Laser Scanning Mikroskop SP5 von Leica erzeugt. Der Abstand der Einzelbilder in der Z-Achse betrug dabei ca. 240 nm. Bei der Kombination der Fluoreszenzmarkierungen wurde darauf geachtet, dass diese einen möglichst großen Abstand bei jeweiligen Excitations- und Emissionswellenlänge aufweisen damit es zu keinem „bleed through“ (Übertragung des kurzwelligen Emissions-Signal in den Detektionsbereich des längerwelligen Fluophors) kommt. Die Bilder wurden mit einer Linsenöffnung des Objektivs von 1 AU [arbitrary unit], einer Scanngeschwindigkeit von 200 Hz und einer Auflösung von 512 x 512 Pixel durch ein 63 x Immersionsölobjektiv mit einer Numerischen Apertur von 1.4 aufgenommen. Für die Quantifizierung erfolgte die Bestimmung des Grads der Kolokalisierung mit Hilfe des Image J Plugins „Colocalization Finder“.

### 5.2.16 Quantifizierung der Fluoreszenz-Intensität

Zur Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von MitoTracker Red CMXRos wurden axonal lokalisierte Mitochondrien mit 8 Bit Bildtiefe aufgenommen. Mitochondrien wurden über einen Schwellenwert der Fluoreszenz definiert. Anschließend wurden die Kanten im so entstandenen Schwarz-Weiß-Bild mithilfe der Funktion „despeckle“ von ImageJ geglättet. Das nun vorliegende Bild diente als Maske bzw. Vorlage für die festzulegende ROI. Die ROIs wurden abgespeichert und (ImageJ → Plugins → ROI → Multi Measure) und anschließend ins originale Bild übertragen (siehe Abbildung). Die durchschnittliche Fluoreszenzintensität wurde Hintergrund bereinigt und durch die Fläche der ROI geteilt ( $F_{\text{mean}}/\text{Pixel}$ ).



## Material & Methoden

### 5.2.17 Untersuchung des axonalen Transports

#### Erstellung von Kymographen

Die mit dem Nikon Eclipse 2000 TE aufgenommenen Bildsequenzen wurden mit dem ImageJ Plugin „ND to Image 6D“ in das „tagged image file format“ (TIFF) umgewandelt und als Einzelbilder gespeichert. Anschließend wurden die so umgewandelten TIFF-Bildsequenzen mit ImageJ → Import sequence in 8 Bit Bildtiefe umgewandelt. Mit Hilfe einer Z-Projection (ImageJ → Image → stacks → z-project) wurde ein Abbild der von angefärbten Mitochondrien oder Lysosomen zurückgelegten Wegstrecke erzeugt. Die Z-Projektion wurde nun verwendet, um das zu untersuchende axonale Segment fest zu legen. Mit dem „Segmented Line“ Werkzeug wurden die Wegstrecken von Mitochondrien bzw. Lysosomen in den Axonen der Motoneurone nachgespurt. Diese Linie wird durch „copy and paste“ in den ursprünglichen Bildstapel übertragen. Für die manuelle Auswertung des Transports in axonalen Abschnitten wurden Kymographen mit dem Plugin „multiple Kymographs“ erstellt. Kymographen ermöglichen die Quantifizierung der Transportparameter wie Länge der Transportstrecke, Transportgeschwindigkeit sowie das Verhältnis von stationären zu transportierten Organellen. Zur Bestimmung der Geschwindigkeit wurden die Kymographen mittels des Macros „read velocity from tsp“ ausgewertet. Genaue Information zu diesem Macro sind zu finden unter

[http://www.embl.de/eamnet/downloads/kymograph/kymograph\\_description.pdf](http://www.embl.de/eamnet/downloads/kymograph/kymograph_description.pdf).

### 5.2.18 ATP-Assay

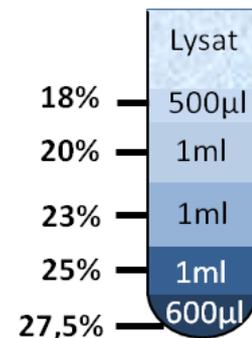
Für diesen Versuch wurden primäre wildtypische und *pnm* mutierte Motoneurone (E12.5) isoliert und die Zellen eines Embryos auf zwei Kulturen aufgeteilt. Beide Kulturen wurden für 5 DIV in Gegenwart von BDNF kultiviert und zur Untersuchung der Wirkung von CNTF auf die ATP-Menge eine Kultur für 30-40 min mit CNTF [10 ng/ml] behandelt. Anschließend wurden CNTF behandelte und Kontrollkulturen 3 Mal mit 37°C warmen PBS gewaschen und anschließend lysiert. Die Analyse der ATP Menge in kultivierten Motoneuronen erfolgte durch eine ATP verbrauchende Biolumineszenz-Reaktion. Standardkurven der Biolumineszenz wurden gemäß Herstellerangaben zwischen 1 nM und 1 µM erstellt und zur Bestimmung der ATP-Mengen in den Proben herangezogen. Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in den Lysaten wurde eine BCA Standardverdünnungsreihe nach Herstellerangaben angelegt, die zur Berechnung der Proteinmenge in den Proben herangezogen wurde. Proben wurden dreifach angesetzt und der erhaltene Mittelwert mit der BCA-Standardkurve verglichen.

## Material & Methoden

### 5.2.19 Isolierung einer Mitochondrienfraktion aus kultivierten Motoneuronen

Für die Isolierung von mitochondrialen Fraktionen wurden lumbale Rückenmarke aus 60 bis 80 wildtypischen Embryonen (E12-14) präpariert und die erhaltenen Motoneurone anschließend in 10 cm Kulturschalen (Nunc; Nunclon  $\Delta$ -surface) für 5 Tage kultiviert. Um die CNTF-abhängige Phosphorylierung von STAT3 an Serin 727 in Mitochondrien nach zu weisen, wurde den Kulturen für 14-16 h (ÜN) das Serum entzogen. Der Serumentzug bringt den Phosphorylierungsstatus vieler Proteine auf ein basales Level und macht auch geringe Änderungen im Phosphorylierungsstatus nach einer anschließenden Kinasenaktivierung nachweisbar. Nach der akuten Behandlung mit CNTF [10 ng/ml] für 1 h wurden behandelte und Kontrollkulturen 2 Mal mit 37°C warmen PBS gewaschen und anschließend in 1-2 ml Lysispuffer (s. Material) 20 min bei 4°C inkubiert. Das Zelllysat wurde mit einem Spatel abgeschabt, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bis zur Ultrazentrifugation im Succrose-Gradienten auf Eis gelagert. Durch die Ultrazentrifugation bei 4°C mit 37500 x g für 16 h wurden einzelne Fraktionen isoliert, in 125  $\mu$ l Schritten abgenommen und sofort auf Eis gestellt. Nach der Zugabe von 2 x Lämmli-Puffer wurden die Proben für 10 min bei 99°C denaturiert und anschließend in einem SDS-Gradienten-Gel (7 % - 9 %) aufgetragen.

Nebenstehende Abbildung dient der Veranschaulichung der Schichtung des Sucrosegradienten im Zentrifugenröhrchen für den Rotor SW60. Es ist zu beachten, dass sich der Gradient mit der Zeit verändert. Daher sollten die experimentellen Abläufe zeitlich so aufeinander abgestimmt sein, dass die Auftragung der Proben auf den Gradient jeweils sofort zur gleichen Zeit nach dessen Herstellung erfolgt!



## 6. Ergebnisse

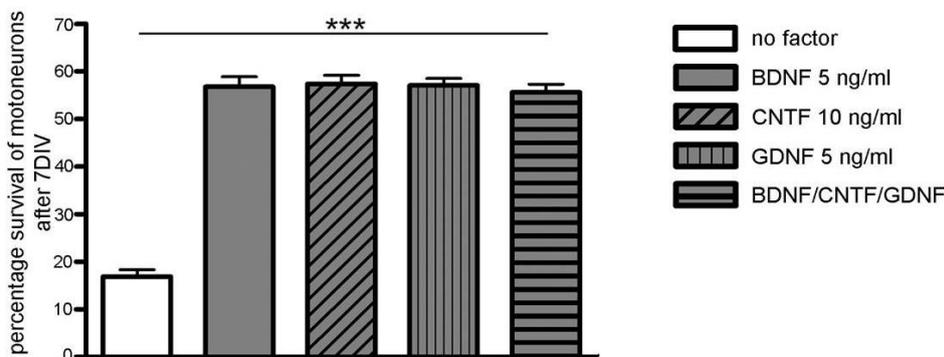
### 6.1 Welche Rolle spielt axonales STAT3 nach CNTF Applikation?

#### 6.1.1 CNTF, BDNF und GDNF sind vergleichbar in ihrer Fähigkeit das Überleben primärer Motoneurone zu unterstützen

Eine Reihe von Experimenten an *pnn*-Mäusen haben bereits gezeigt, dass die neurotrophen Faktoren CNTF (Sendtner et al., 1992), BDNF (Y Sagot et al. 1998) und GDNF (Henderson et al. 1994) den Verlust von Motoneuronenzellkörpern aufhalten und den Beginn einer Motoneurondegeneration *in vivo* hinaus zögern. Aufbauend auf diesen Befunden sollte im Zellkulturmodell die Wirkung dieser neurotrophen Faktoren auf das Überleben isolierter embryonaler Motoneuronen verglichen werden.

In Gegenwart von BDNF, CNTF oder GDNF war das Überleben von Motoneuronen gegenüber Kulturen die ohne neurotrophen Faktor gehalten wurden signifikant verbessert. Dabei führte eine Kombination von BDNF, CNTF und GDNF zu keinem gesteigerten Überleben im Vergleich zu Motoneuronenkulturen in denen ausschließlich einer der Faktor vorhanden war (Abb. 6).

Interessanterweise kann jedoch nur CNTF nicht aber BDNF oder GDNF das reduzierte Axonwachstum und axonale Schwellungen in *pnn* mutierten Motoneuronen beheben (vergl. Abb. 14 und Selvaraj et al. 2012, Fig. 1). Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, wie im Besonderen CNTF seine protektive Wirkung auf Axone entfaltet.



**Abbildung 6: Überleben primärer wildtypischer Motoneurone (BG NMRI) in Gegenwart unterschiedlicher neurotropher Faktoren.** n = 3 unabhängige Experimente, Daten repräsentieren den Mittelwert mit S.E.M.; Statistische Analyse:\*\*\*P<0.001, one way ANOVA mit Bonferroni post test.

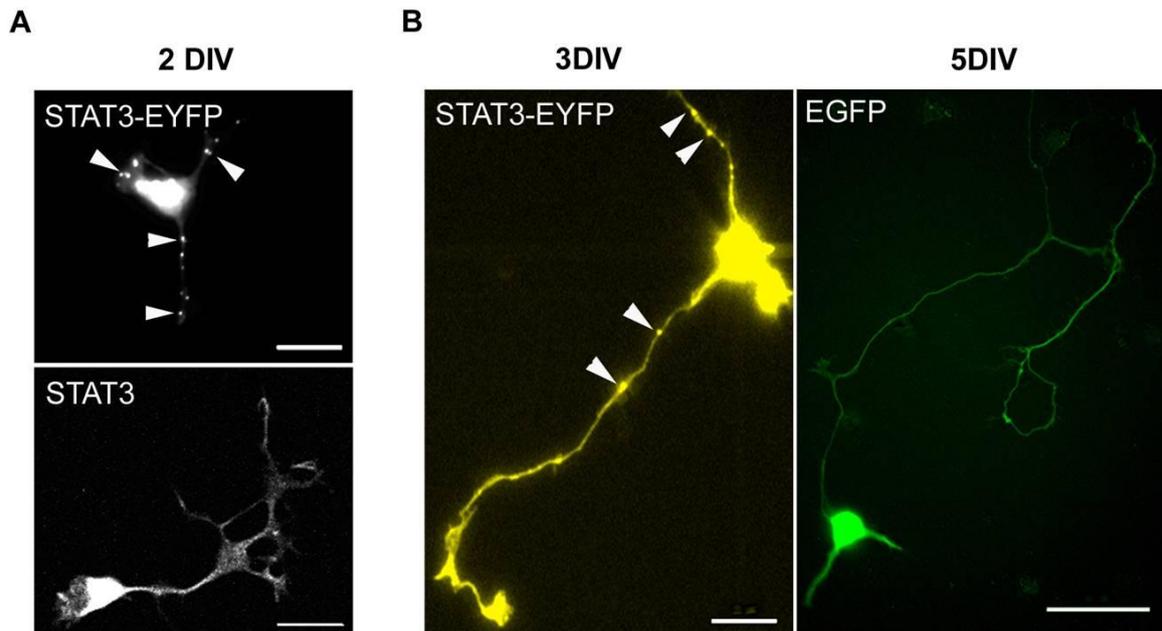
## Ergebnisse

CNTF wirkt *in vivo* und *in vitro* über STAT3 auf das Überleben von Motoneuronen (Schweizer et al. 2002). Der vorliegenden Arbeit vorausgegangene Untersuchungen an kultivierten Stat3 ablatierten *pnn* mutierten Motoneuronen ( $\text{Stat3}^{\text{KO/flox}} / \text{NFL-Cre}^{\text{tg}} / \text{pnn}^{-/-}$ ) zeigen weiter, dass CNTF über STAT3 auf das Axonwachstum wirkt und die Bildung von axonalen Schwellungen verhindert (Bender F.L.P Dissertation). Unklar war jedoch, ob die Gabe von CNTF *in vitro* konform der „*signaling endosome-Theorie*“ zum retrograden Transport von axonalem STAT3 und anschließender STAT3 abhängiger Transkriptionsinduktion führt.

Wie die CNTF/STAT3 Signalkaskade zur Aufrechterhaltung von Axonen beiträgt, sollte durch die folgenden Experimente aufgedeckt werden.

### **6.1.2 Die Mobilität von axonalem STAT3 in primären embryonalen Motoneuronen-Transfektion von Motoneuronen mit STAT3-EYFP und EGFP**

Um die Mobilität von STAT3 in embryonalen Motoneuronen (13.5) nach CNTF-Gabe direkt visualisieren zu können, wurde ein Expressionskonstrukt für ein Fusionsprotein aus STAT3 und EYFP (STAT3-EYFP) hergestellt, das in primären Motoneuronen exprimiert werden konnte. Für den Gentransfer wurden die Plasmide STAT3-EYFP-N1 (und EGFP-N1) genutzt. Auf beiden Plasmiden wird die Expression des gewünschten Gens unter der Kontrolle des CMV Promotors getrieben. Der Transfer von STAT3-EYFP oder EGFP codierender cDNA in primäre Motoneuronen mittels der von Watson und Latchman (1996) beschriebenen Kalziumphosphat-Transfektion erwies sich jedoch als ineffizient. Die Transfektion nach 1 DIV führte zwar zur Expression von STAT3-EYFP und EGFP in wenigen Motoneuronen, allerdings zeigten unter diesen Bedingungen STAT3-EYFP transfizierte Zellen, nicht aber EGFP überexprimierende Motoneuronen fluoreszierende nicht näher charakterisierte Proteinakkumulationen. Diese Beobachtung ging mit einem verfrühten Zelltod der STAT3-EYFP positiven Motoneuronen 36 h nach Transfektion einher und schien ein Artefakt der Überexpression von STAT3-EYFP darzustellen, da eine derartige Verteilung von endogenem STAT3 Protein in Kontrollen nicht gefunden werden konnte (Abb. 7 A und Abb. 10). Selbst eine spätere Transfektion nach 2 DIV verhinderte die Bildung der o.g. STAT3-EYFP Akkumulationen nicht. Aufgrund dieser Ergebnisse sollten STAT3-EYFP und EGFP mit lentiviralem Gentransfer in kultivierte Motoneurone eingebracht werden (Bender et al. 2007).

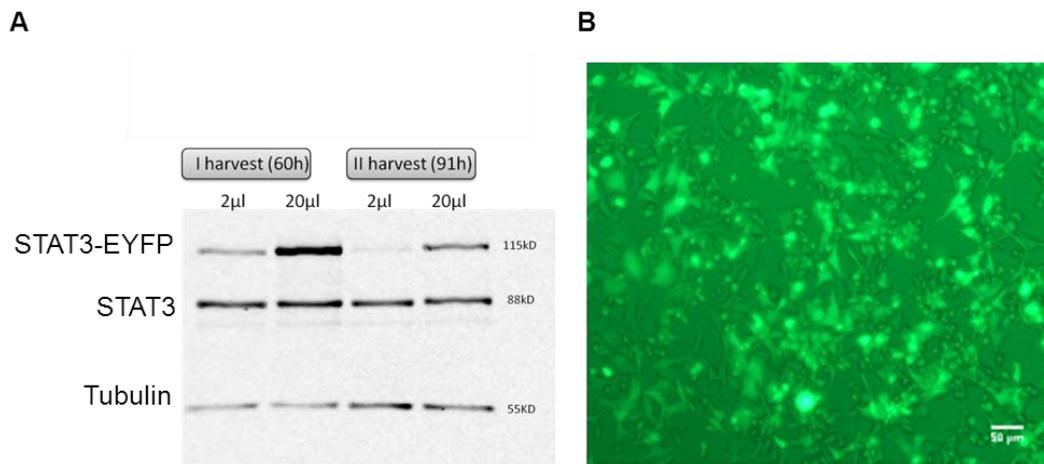


**Abbildung 7: Kalzium-Phosphat vermittelte Transfektion in Motoneurone (BDNF) führt zur Bildung von STAT3-EYFP Proteinaggregaten. A)** Lebendzellaufnahme eines STAT3 EYFP überexprimierenden Motoneurons 16 h nach Transfektion am 1. Kulturtag (oberes Bild) und einer fixierten Kontrolle mit Antikörperfärbung gegen STAT3 (unteres Bild; AK 124H6), Maßstabsbalken: 25µm. **B)** Lebendzellaufnahme eines STAT3-EYFP überexprimierenden Motoneurons nach 3 DIV – 16 h post Transfektion am 2. Kulturtag. Maßstabsbalken: 25 µm und eines EGFP überexprimierenden Motoneurons nach 5 DIV – 72 h post Transfektion. Maßstabsbalken: 50 µm. Pfeilköpfe deuten nicht näher bestimmte Proteinakkumulationen aus STAT3-EYFP an.

### 6.1.3 Generierung von Vektoren zur lentiviralen Überexpression von STAT3-EYFP

Um STAT3-EYFP stabil aber in moderater Konzentration in primären Motoneuronen zu exprimieren, wurde STAT3-EYFP in den lentiviralen Vektor FUGW (Lois et al. 2002) umklont. Dieser Vektor erlaubt die Expression von STAT3-EYFP unter Kontrolle des humanen Ubiquitin C Promotors. Als Donor für STAT3-EYFP diente das o.g. N1-Plasmid, aus dem ein NotI-NheI STAT3-EYFP cDNA-Fragment isoliert und in den NotI und NheI geöffneten Vektor FUVa1 (modifizierter FUGW, ohne Fluoreszenzprotein) kloniert wurde. Anschließend wurden HEK293T Zellen mit diesem Vektor für die Virusproduktion transfiziert. Zur Kontrolle des Virustiters wurden NSC34 Zellen mit 2 und 20 µl Virussuspension infiziert, ausplattiert und die Überexpression des Fusionsproteins mittels Western Blot Analyse (Abb. 8 A) und Fluoreszenzmikroskopie verifiziert (Abb. 8 B).

## Ergebnisse



**Abbildung 8: Kontrolle der Expression von STAT3-EYFP in NSC34 Zellen.** A) Westernblot Analyse von zwei unterschiedlichen Virusernten (60 h und 91 h nach Transfektion von HEK293T Zellen) und zwei verschiedenen Virusmengen (2 und 20 µl). Proteinlysate aus 100.000 NSC34 Zellen. 55 kD Bande zeigt Tubulin, 88 kD Bande endogenes STAT3, 115 kD Bande STAT3-EYFP Fusionsprotein. B) Fluoreszenzanalyse von EYFP in lebenden NSC34 Zellen. Überlagerungsbild aus Phasenkontrast und Fluoreszenzbild; Maßstabsbalken 50 µm.

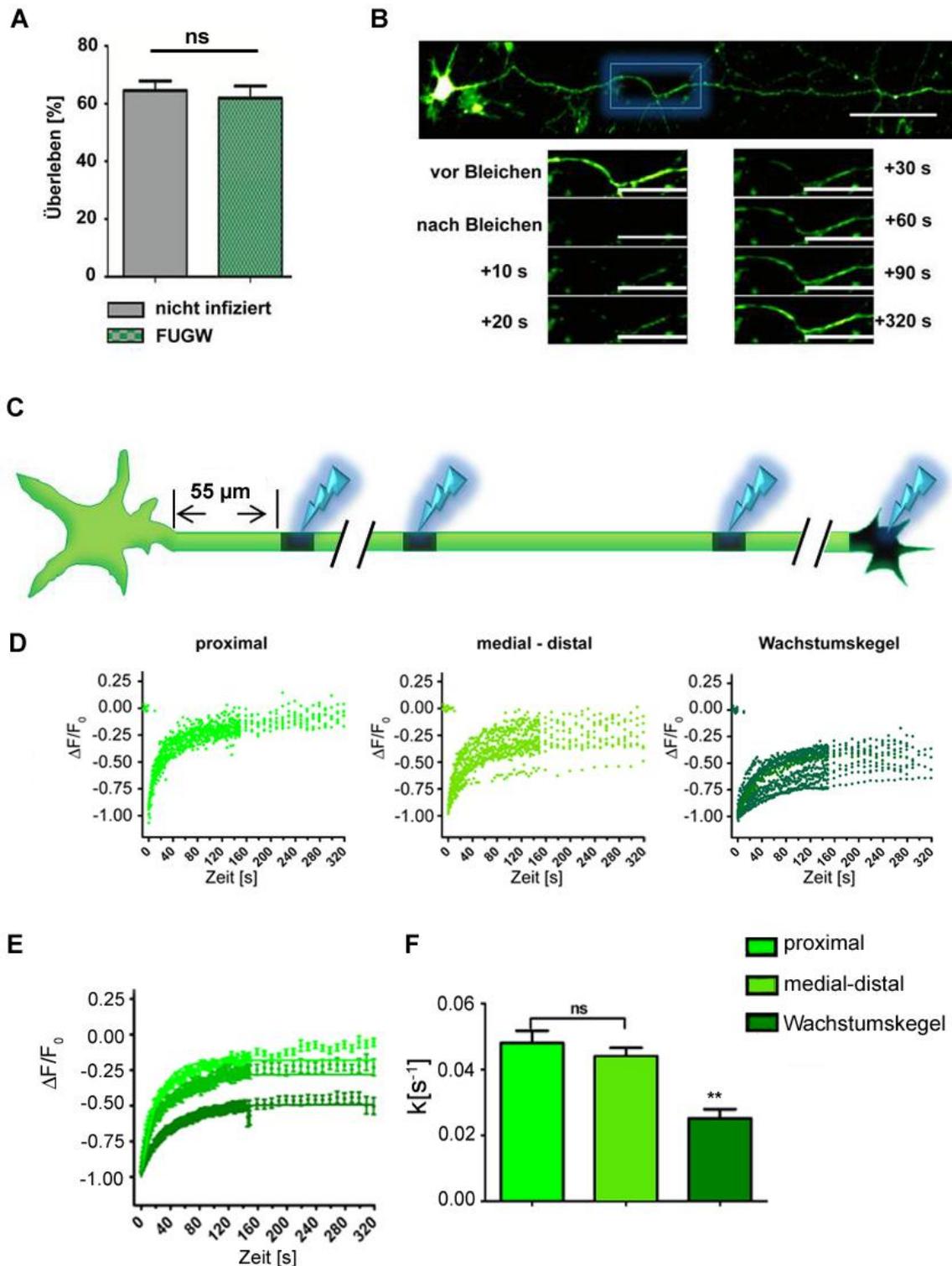
### 6.1.4 Analyse der axonalen Diffusion von EGFP in kultivierten Motoneuronen

Für die Signaltransduktion in Motoneuronen können für aktiviertes STAT3 sowohl aktiver Transport, mit Hilfe von molekularen Motoren, als auch passiver Transport durch Diffusion angenommen werden. Obwohl für Signalmoleküle wie STAT3 ungerichtete Diffusion als Transportform über mehrere 100 µm wahrscheinlich ausgeschlossen werden kann (Howe 2005), ist jedoch unklar, in welchem Umfang die Diffusion zum Transport in Axonen kultivierter Motoneuronen beträgt.

Um Aufschluss über die Diffusionseigenschaften des Axoplasmas zu erhalten, wurden primäre Motoneurone mit einem EGFP (FUGW) codierenden Lentivirus transduziert. Nach 5 DIV wurden EGFP positive Axonsegmente mittels FRAP-Technik (Fluorescence Recovery after Photobleaching) untersucht.

Um auszuschließen, dass die lentivirale Überexpression von EGFP für einige Motoneuronen letal ist und dies zur Selektion einer nicht repräsentativen Subpopulation von Motoneuronen führt, wurde das Überleben infizierter Motoneurone, die in Gegenwart von BDNF [5 ng/ml] kultiviert wurden, nach 5 DIV quantifiziert. Wie erwartet, konnte kein signifikant erhöhter Zelltod in EGFP überexprimierenden Motoneuronkulturen gegenüber nicht infizierten Kontrollkulturen festgestellt werden (Abb.9 A).

# Ergebnisse



**Abbildung 9: Axonale Diffusion von EGFP in primären Motoneuronen. A)** Überleben von nicht infizierten und FUGW infizierten Motoneuronen nach 5DIV in Gegenwart von BDNF [5ng/ml], gezeigt als prozentualer Anteil ursprünglich ausplattierter Zellen. **B)** Repräsentative Aufnahmen eines FRAP Experiments von EGFP in Motoneuronen (6DIV). Das blaue Rechteck zeigt die gebleichte Region des Axons. Die Bildreihe zeigt die Fluoreszenzintensität vor und nach dem Bleichen sowie die Fluoreszenzwiederkehr zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Bleichen. Maßstabsbalken 20  $\mu$ m. **C)** Skizze eines Motoneurons, Blitze symbolisieren 488 nm Laser über dem gebleichten Axonsegment (schwarze Box) oder dem Wachstumskegel. **D)** Darstellung der FRAP-Einzelexperimente mit zunehmendem Abstand zum Zellkörper. Datenpunkte repräsentieren die normalisierten und Hintergrund korrigierten Fluoreszenzwerte einzelner Experimente **E)** „Best curve fit“ für FRAP-Daten der unter **D)** gezeigten Experimente; Annahme: Fluoreszenzwiederkehr verhält sich wie einfach

## Ergebnisse

exponentielle Funktion.  $n = 4$  unabhängige Experimente (proximal = 8 Zellen; medial-distal = 12 Zellen; Wachstumskegel = 14 Zellen) Daten repräsentieren den Mittelwert mit S.E.M.; Statistische Analyse: ns = nicht signifikant ( $P > 0.05$ );  $**P < 0.01$  Kruskal-Wallis mit Dunns multiple comparison test.

Proximale FRAP-Experimente wurden mit mindestens 55  $\mu\text{m}$  Abstand zum Zellkörper durchgeführt (Abb. 9 B, C). Die treibende Kraft der Diffusion ist ein Konzentrationsunterschied zwischen mindestens zwei in Verbindung stehenden Kompartimenten (Zellkörper und Axon). Im Zellkörper beispielsweise, dem Ort der stärksten Expression, kann eine höhere Proteinkonzentration angenommen werden als in spezialisierten Zellkompartimenten wie Axonen oder Dendriten. Daher könnte es möglich sein, dass für Proteine ohne funktionelle Bedeutung (EGFP) grundsätzlich ein anterograd gerichteter Diffusionsstrom vorliegt. Dies hätte zur Folge, dass der Vergleich zwischen proximalen und distalen Geschwindigkeitskonstanten der Fluoreszenzwiederkehr maßgeblich durch die Stärke der exogenen Expression beeinflusst wird, das Ergebnis eines FRAP-Experiments verfälscht und dadurch die Vergleichbarkeit zwischen EGFP und STAT3-EYFP unmöglich würde.

Für den Vergleich der Geschwindigkeitskonstanten in den unterschiedlichen Axonsegmenten, wurden mit Hilfe der „best curve fit“ Methode (Graphpad Prism4) eine gemeinsame Kurve generiert, die am besten alle Daten der Einzelexperimente widerspiegelt. Diese Kurven fassen die dynamischen Eigenschaften von EGFP in einem bestimmten Axonsegment zusammen. Anschließend ist es möglich, kinetische Parameter wie die Geschwindigkeitskonstante „ $k$ “ aus unterschiedlichen Axonsegmenten miteinander zu vergleichen. Die Analyse der normalisierten FRAP-Kurven ergab allerdings keinen signifikanten Unterschied zwischen proximalen und medialen-distalen Geschwindigkeitskonstanten ( $k$ ) von freiem EGFP (Abb. 9 D-F; Tabelle 16). Jedoch zeigte sich eine etwa 50 prozentige Reduzierung der Geschwindigkeitskonstante in Wachstumskegeln, wahrscheinlich durch den unilateralen Austausch von gebleichten gegen ungebleichte Fluoreszenzproteine (Abb. 9 D-F; Tabelle 16). Diese Befunde unterstützen die Annahme, dass entlang des Axons kultivierter Motoneurone keine signifikanten Diffusionsunterschiede bestehen.

## Ergebnisse

	<b>K [s<sup>-1</sup>]</b>	<b>t<sub>1/2</sub> [s]</b>	<b>D [μm<sup>2</sup>/s]</b>
<b>proximal</b>	<b>0,048±0,004</b>	<b>14,97±1,0</b>	<b>0,25</b>
<b>medial-distal</b>	<b>0,045±0,002</b>	<b>16,03±0,71</b>	<b>0,23</b>
<b>Wachstumskegel</b>	<b>0,031±0,006</b>	<b>32,30±5,75</b>	<b>0,11</b>

**Tabelle 16: Die Diffusionseigenschaften des Zytoplasmas entlang des Axons sind konstant.**

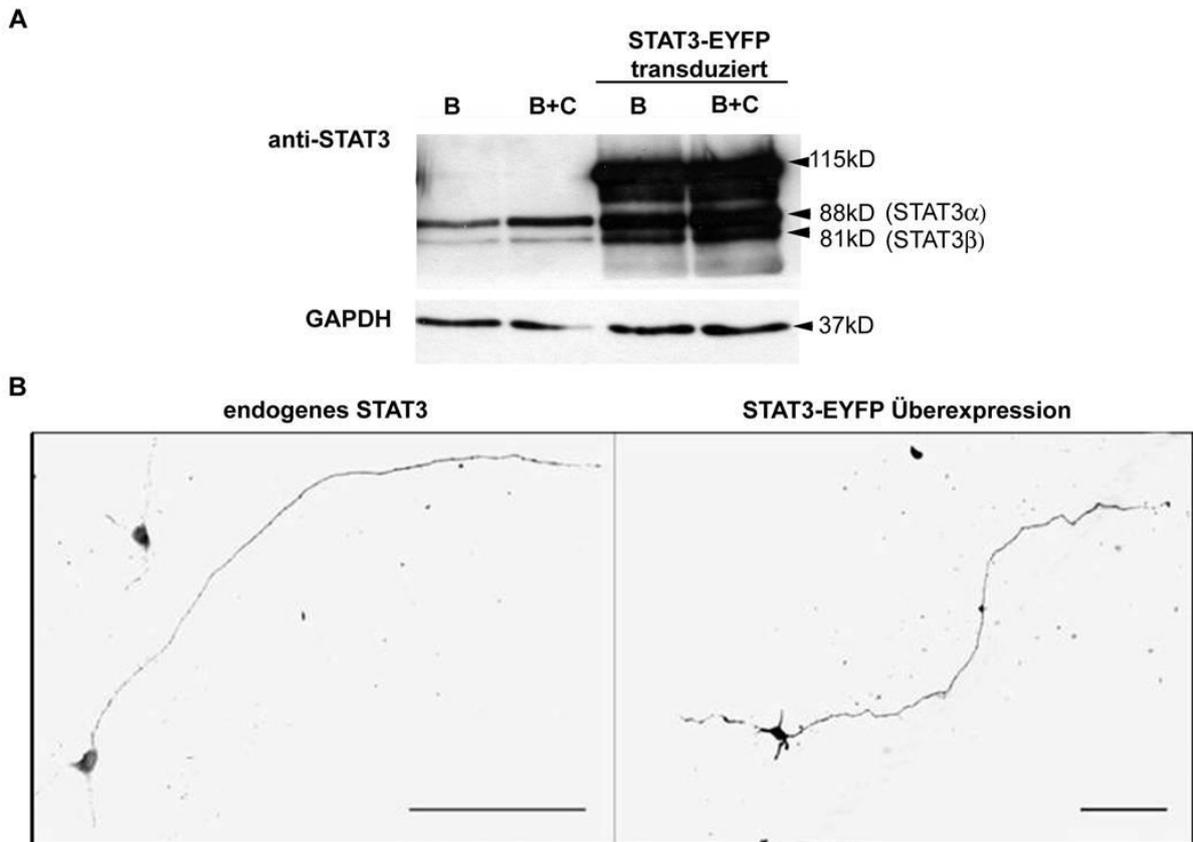
Zusammenfassung der ermittelten dynamischen Parameter:  $k^{-1}$  = Geschwindigkeitskonstante,  $t_{1/2}$  = Halbwertszeit,  $D$  = Diffusionskonstante, näherungsweise berechnet nach  $D = \frac{1}{4} * \frac{\text{Axondurchmesser}[\mu\text{m}] * \text{Länge ROI}[\mu\text{m}]}{t_{1/2}}$  (Axelrod et al. 1976)

### 6.1.5 Analyse der axonalen Mobilität von STAT3-EYFP nach CNTF-Gabe

Mehrere Untersuchungen an sensorischen Neuronen der dorsalen Wurzelganglien (DRGs) deckten bereits ein interessantes Phänomen auf, nämlich, dass verletzte, ins ZNS projizierende Neuriten nach vorangegangener Axotomie des peripheren Schwester-Neuriten erneut auswachsen können (Cafferty et al. 2001; Cafferty et al. 2004). Diese Ergebnisse stützen die Hypothese wonach die periphere Läsion ein retrograd wirkendes Signal auslöst, welches die intrinsische Fähigkeit des Neurons steigert mit erneutem Axonwachstum auf eine Nervenverletzung zu reagieren. Des Weiteren zeigt die Beobachtung, dass STAT3 in Folge von Nervenläsionen schnell an Y705 phosphoryliert wird und pSTAT3<sup>Y705</sup> durch retrograden Transport in den Zellkern sensorischer Neuronen als auch Motoneuronen gelangt, um dort die Expression von Genen wie Gap43, Bcl-2 und Reg-2 zu induzieren, (Kirsch et al. 2003; Qiu et al. 2005; Schweizer et al. 2002). Es stellte sich daher die Frage, ob CNTF induziertes STAT3 signaling, ähnlich der o.g. Befunde, ebenfalls zu einem retrograden Transport in kultivierten Motoneuronen führt.

Nachdem durch die vorliegende Arbeit gezeigt werden konnte, dass der Abstand der gebleichten Region zum Zellkörper keinen signifikanten Einfluss auf die axonale Diffusion von EGFP hat, wurden zunächst primäre Motoneuronen lentiviral mit STAT3-EYFP transduziert, um die Überexpression in Motoneuronen zu verifizieren (Abb. 10 A, B rechtes Bild). Mit Hilfe eines phosphospezifischen Antikörpers konnte nachgewiesen werden, dass STAT3-EYFP durch CNTF-Gabe an Tyrosin 705 phosphoryliert wird. Es ist bekannt, dass in Neuronen STAT3 auch in Abwesenheit von CNTF im aktivierten Zustand existiert. Auch die Zelldichte und die neuronale Aktivität bei Interaktion mit benachbarten Zellen spielt für die STAT3 Aktivierung eine Rolle (Michael A. Wishingrad, JBC 1997).

## Ergebnisse



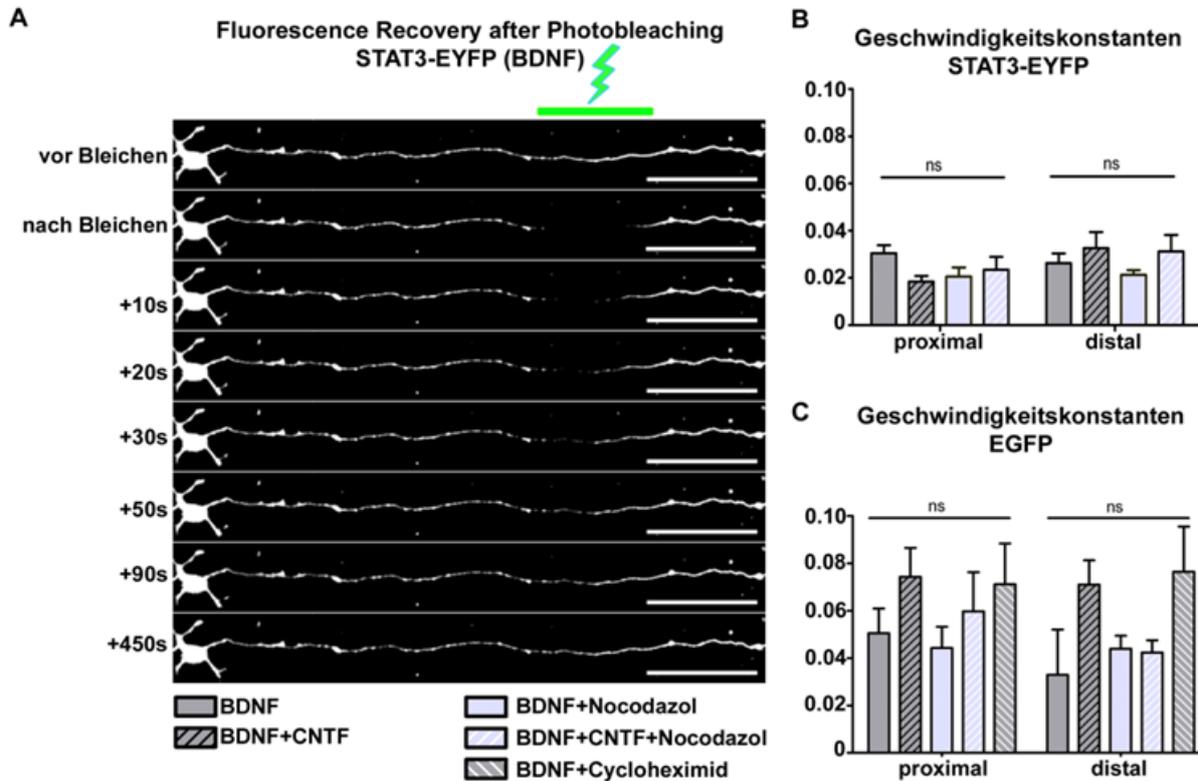
**Abbildung 10: Lentivirale Überexpression von STAT3-EYFP in Motoneuronen.** **A)** Immunoblot gegen STAT3 (124H6) zeigt endogenes (88 kD, 81 kD, Spur 1-4) und überexprimiertes STAT3-EYFP (115 kD, Spur 3, 4). **B)** Zelluläre Verteilung von endogenem STAT3 und überexprimiertem STAT3-EYFP in primären wildtypischen Motoneuronen (6 DIV). Linkes Bild: Immunfluoreszenzaufnahme von STAT3 (AK 124H6). Rechtes Bild: Motoneuron lentiviral transduziert mit STAT3-EYFP. Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m

Axone STAT3-EYFP oder EGFP exprimierender Motoneurone wurden in medialen Regionen auf einer Länge von mindestens 100  $\mu$ m gebleicht (Abb. 11 A), um anschließend die anterograde beziehungsweise retrograde Bewegung von STAT3-EYFP in das gebleichte Axonsegment analysieren zu können. Als Kontrolle dienten Motoneurone, die lentiviral EGFP überexprimierten. Die Fluoreszenzwiederkehr von STAT3-EYFP und EGFP wurde in 20  $\mu$ m langen Segmenten untersucht, die sich am proximalen bzw. distalen Rand innerhalb der gebleichten Region befanden.

Wenn CNTF einen retrograden Transport von STAT3-EYFP induziert, sollte nach CNTF-Applikation die Fluoreszenzwiederkehr in gebleichten distalen Axonsegment schneller und in proximalen Segmenten langsamer sein. Der Vergleich der proximalen und distalen Geschwindigkeitskonstanten ( $k^{-1}$ ) von STAT3-EYFP in BDNF Kontrollen und CNTF behandelten Motoneuronen zeigte jedoch keinen signifikanten Unterschied (Abb. 11 B). Dieser Befund lässt den Schluss zu, dass STAT3-EYFP nach CNTF Aktivierung zu großen Teilen lokal in Axonen verbleibt und nicht retrograd transportiert wird, um die Transkription

## Ergebnisse

von Zielgenen zu induzieren. Interessanter Weise führte jedoch die Applikation von CNTF bei EGFP überexprimierenden Motoneuronen zu einer gesteigerten Mobilität des Fluoreszenzproteins, sowohl in proximalen als auch distalen Regionen (Abb. 11 C).

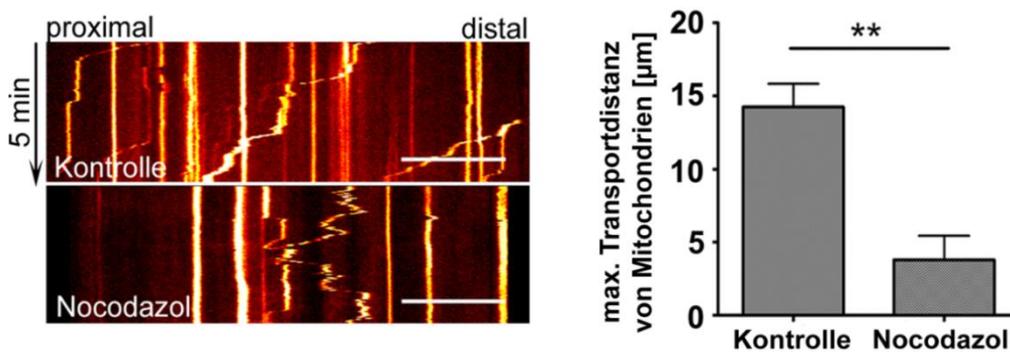


**Abbildung 11: Der Großteil von STAT3-EYFP verbleibt nach CNTF-Gabe lokal in Axonen und wird nicht retrograd transportiert. A)** Repräsentative Darstellung eines FRAP-Experiments von STAT3-EYFP in wildtypischen Motoneuronen (6 DIV), Originalbilder der Zeitrafferaufnahme wurden mittels ImageJ Plugin „Enhance Image“ bearbeitet und für die bessere Darstellung mit dem ImageJ Plugin „Staighthen“ modifiziert. Die gebleichte Region ist durch den grünen Balken angezeigt. Die Bildreihe zeigt von oben nach unten die Fluoreszenzintensität vor und nach dem Bleichen sowie die Fluoreszenzwiederkehr zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Bleichen. **B-C)** Statistische Analyse von Geschwindigkeitskonstanten (Y-Achse, in  $s^{-1}$ ) der STAT3-EYFP oder EGFP Fluoreszenzwiederkehr. Daten repräsentieren den Mittelwert mit S.E.M.;  $n = 3$  unabhängige Experimente. Statistische Analyse: ns = nicht signifikant ( $P > 0.05$ ), Kruskal Wallis mit Dunns multiple comparison test.

Um Aufschluss darüber zu erhalten, ob die gemessene Fluoreszenzwiederkehr vom aktiven MT basierten Transport abhängt, wurden Motoneurone vor dem Bleichen für 15 min mit der MT depolymerisierenden Substanz Nocodazol [ $10 \mu M$ ] inkubiert. Durch die Gabe von Nocodazol wurden die proximalen und distalen Geschwindigkeitskonstanten von axonalem EGFP nicht signifikant beeinflusst. Um sicher zu stellen, dass die 15 minütige Inkubation in Gegenwart von Nocodazol ausreicht, um einen MT abhängigen Langstreckentransport zu verhindern, wurden Motoneuronen mit MitoTracker Red CMXRos inkubiert. Nach anschließender Nocodazolbehandlung konnte die MT-abhängige Mobilität der so markierten

## Ergebnisse

Mitochondrien durch Lebendzellmikroskopie analysiert werden (Abb.12). Darüber hinaus wurde die maximale Transportdistanz von Mitochondrien von ca. 3  $\mu\text{m}/\text{min}$  auf weniger als 1  $\mu\text{m}/\text{min}$  verkürzt. Der Vergleich der Geschwindigkeits- (Abb. 11 B, C) und Diffusionskonstanten (Tabelle 17 und 18) deutet an, dass eine Nocodazol-Behandlung zur Reduzierung der proximalen und distalen Mobilität von STAT3-EYFP beziehungsweise EGFP führt, diese aber nicht zum Stillstand kommt. Das lässt vermuten, dass der Großteil der beobachteten Molekülbewegung auf Diffusion beruht.



**Abbildung 12: Die Applikation von Nocodazol unterbindet den axonalen Langstreckentransport.** Die Nocodazolbehandlung für 15 min ist ausreichend, um den MT basierten Langstreckentransport von Mitochondrien weitgehend zu unterbinden. Die Kymographen zeigen die Mobilität von axonalen Mitochondrien über eine Dauer von 5 min. Das Balkendiagramm zeigt die während der 5 minütigen Aufnahme durchschnittlich zurückgelegte Transportdistanz. Daraus kann der Schluss gezogen werden, dass auch der Transport von STAT3-EYFP während der FRAP-Experimente unter Nocodazoleinwirkung unterbunden war.  $n = 3$  unabhängige Experimente, 9 Zellen insgesamt. Daten repräsentieren den Mittelwert mit S.E.M.; Statistische Analyse:  $**P < 0.01$ , Student's t-test.

Interessant ist, dass die Anwesenheit von CNTF [10 ng/ml] bei gleichzeitiger Gabe von Nocodazol der Reduzierung der Geschwindigkeits- (Abb. 11 B) und Diffusionskonstanten von STAT3-EYFP (Tabelle 17) entgegenzuwirken scheint.

Um den Einfluss von neusynthetisierten Fluoreszenzproteinen auszuschließen, wurden transduzierte Motoneurone 1 h vor FRAP-Experimenten mit 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Cycloheximid inkubiert. Diese Substanz bindet die 60S-Untereinheit der Ribosomen, inhibiert die Peptidyltransferaseaktivität und hemmt dadurch die Translation. Cycloheximid hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Fluoreszenzwiederkehr in EGFP exprimierenden Motoneuronen, wahrscheinlich weil die Dauer des Experiments zu kurz ist um translationale Effekte aufzudecken. Auf Grund dieses Befundes wurde eine Cycloheximid-Behandlung bei STAT3-EYFP exprimierenden Neuronen nicht mitgeführt.

## Ergebnisse

Kondition	proximal		distal	
	$t_{1/2}$ [s]	D [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	$t_{1/2}$ [s]	D [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]
<b>BDNF</b>	22.8 ± 2.8	0.16	26.26 ± 1.5	0.14
<b>BDNF+CNTF</b>	50.5 ± 4.3	0.09	39.07 ± 5.1	0.17
<b>BDNF+Nocodazol</b>	33.00 ± 4.6	0.11	33.00 ± 2.7	0.11
<b>BDNF+CNTF+Nocodazol</b>	29.58 ± 5.3	0.12	22.21 ± 6.4	0.16

**Tabelle 17: Gegenüberstellung der proximalen und distalen Diffusionskonstanten von STAT3-EYFP in kultivierten Motoneuronen (6 DIV).** Die Berechnung erfolgte durch die Einbeziehung eines durchschnittlichen Axondurchmessers kultivierter Motoneurone von 700 nm (elektronenmikroskopische Aufnahmen Ester Asan) und einem Mittelwert der Länge der ROI von 21  $\mu\text{m}$ . dynamische Parameter:  $t_{1/2}$  = Halbwertszeit, D = Diffusionskonstante, näherungsweise berechnet nach  $D = \frac{1}{4} * \frac{\text{Axondurchmesser}[\mu\text{m}] * \text{Länge ROI}[\mu\text{m}]}{t_{1/2}}$  (vgl. Axelrod et al. 1976)

Konditionen	proximal		distal	
	$t_{1/2}$ [s]	D [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]	$t_{1/2}$ [s]	D [ $\mu\text{m}^2/\text{s}$ ]
<b>BDNF</b>	13.72 ± 2.34	0.27	21.11 ± 5.08	0.18
<b>BDNF+CNTF</b>	9.33 ± 1.32	0.39	9.76 ± 1.23	0.38
<b>BDNF+Nocodazol</b>	15.67 ± 4.00	0.24	15.78 ± 1.76	0.23
<b>BDNF+CNTF+Nocodazol</b>	11.62 ± 2.53	0.32	16.37 ± 1.77	0.23
<b>BDNF+Cycloheximid</b>	9.75 ± 3.13	0.38	9.07 ± 2.65	0.41

**Tabelle 18: Gegenüberstellung der proximalen und distalen Diffusionskonstanten von EGFP in kultivierten Motoneuronen (6 DIV).** Die Berechnung erfolgte durch die Einbeziehung eines durchschnittlichen Axondurchmessers kultivierten Motoneurone von 700 nm (elektronenmikroskopische Aufnahmen Ester Asan) und einem Mittelwert der Länge der ROI von 21  $\mu\text{m}$ . Dynamische Parameter:  $t_{1/2}$  = Halbwertszeit, D = Diffusionskonstante, näherungsweise berechnet nach  $D = \frac{1}{4} * \frac{\text{Axondurchmesser}[\mu\text{m}] * \text{Länge ROI}[\mu\text{m}]}{t_{1/2}}$  (vgl. Axelrod et al. 1976)

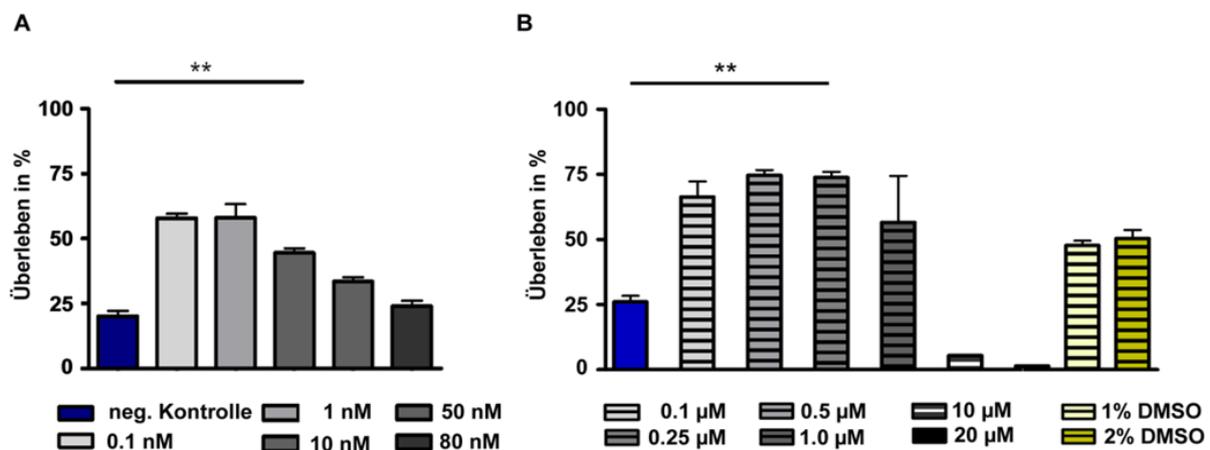
Diese Ergebnisse stützen die Hypothese, dass der größte Teil von STAT3-EYFP nach CNTF-Gabe im Axon verbleibt, lokal wirkt und nicht retrograd in Richtung Zellkern transportiert wird.

Es ist nicht auszuschließen, dass durch CNTF-Applikation perinukleäres STAT3-EYFP in den Zellkern gelangt und die Expression von Zielgenen induziert. Deshalb sollte in den folgenden Versuchen die STAT3 abhängige Induktion von Genen unterbunden werden, die zur Aufrechterhaltung von Axonen in *pnn* mutierten Motoneuronen beitragen könnte.

## Ergebnisse

### 6.1.6 Die Wirkung der CNTF-STAT3 Signalkaskade auf das Axonwachstum in *pnn* mutierten Motoneuronen ist transkriptionsunabhängig

Wenn der CNTF vermittelte Effekt auf das Axonwachstums in *pnn* mutierten Motoneuronen von STAT3-Zielgenexpression abhängt, sollte die Wirkung von CNTF bei gleichzeitiger Gabe von Transkriptionshemmern aufgehoben werden. Bei den pharmakologischen Ansätzen musste zunächst ein geeigneter Zeitpunkt für die Applikation der Transkriptionshemmer gefunden werden, ab welchem die Motoneurone nicht durch unspezifische Nebenwirkungen der Pharmaka absterben. Die Applikation der Transkriptionsblocker Actinomycin D und Galiellalactone ab 0 DIV führte bereits nach 24- 48 h zum Absterben von BDNF kultivierten wildtypischen Motoneuronen (E13.5). Daher wurde nachfolgend das Überleben von Motoneuronen untersucht, die zwischen 3 und 5 DIV mit Actinomycin D oder Galiellalactone in Konzentrationen von 0.1 – 80 nM bzw. von 0.1 – 20 µM behandelt wurden.

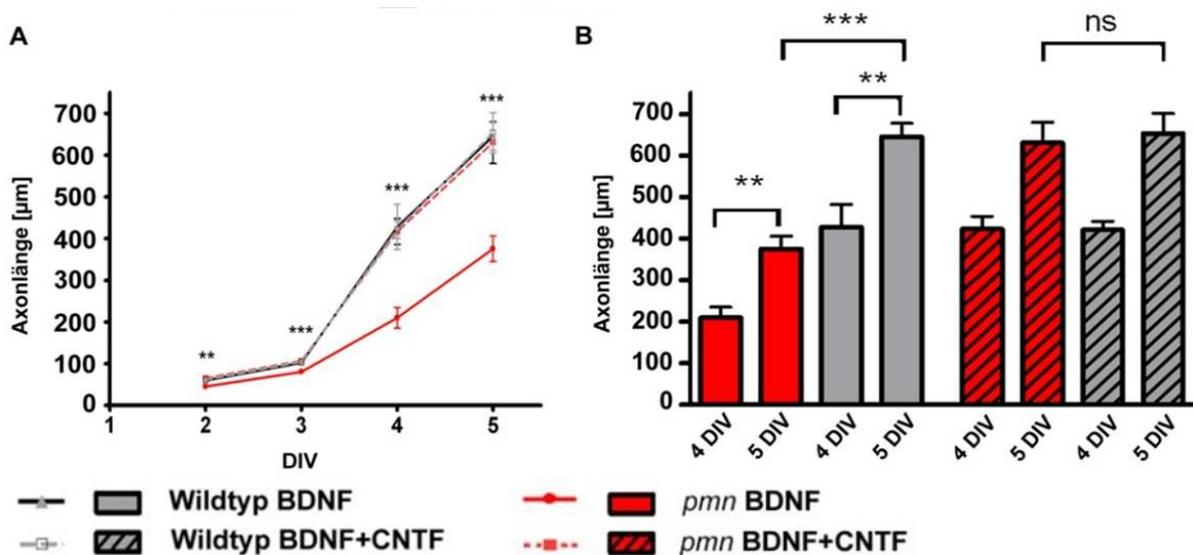


**Abbildung 13: Überleben von Motoneuronen nach 5 DIV in Gegenwart unterschiedlicher Actinomycin D und Galiellalactone-Konzentrationen.** Überleben ist dargestellt als Anteil überlebender Motoneuronen nach 48 h Inkubation mit Actinomycin D (A) oder Galiellalactone (B) relativ zur Anzahl ausplattierter Motoneurone. Actinomycin D und Galiellalactone = 3 bzw. n = 2 unabhängige Experimente, Statistische Analyse: \*\*P<0.01. Kruskal-Wallis mit Dunns multiple comparison test.

Als Negativkontrolle wurden Motoneurone ohne neurotrophen Faktor kultiviert. Es konnte nachgewiesen werden, dass Actinomycin D und Galiellalactone bis zu einer Konzentration von 10 nM bzw. 0.5 µM keinen Einfluss auf das Überleben BDNF kultivierter Motoneurone haben (Abb.13 A, B). Da ab einer Konzentration von 10 µM Galiellalactone zytotoxisch wirkte, wurde eine Lösungsmittel-Kontrolle mitgeführt (1% und 2%, DMSO). Kulturen, die ausschließlich mit DMSO behandelt wurden, wiesen tendenziell höhere Überlebensraten auf, sodass das geringere Überleben auf die Konzentration von Galiellalactone zurück zu führen ist (Abb. 13 B).

## Ergebnisse

Des Weiteren sollten die Transkriptionshemmer während einer Kulturphase appliziert werden, in der Motoneurone unter Kontrollbedingungen verstärktes Axonwachstum zeigen. Jüngere Studien an kultivierten murinen Motoneuronen haben gezeigt, dass das Längenwachstum von Axonen nach 3 DIV zunimmt (Jablonka et al. 2007) und deswegen angenommen werden kann, dass das axonale Wachstumsdefizit von *pnm* mutierten im Vergleich zu wildtypischen Motoneuronen nach dieser Kulturdauer besonders deutlich wird. Daher wurden wildtypische und *pnm* mutierte Motoneurone in Gegenwart von BDNF [5 ng/ml] oder einer Kombination aus BDNF und CNTF [10 ng/ml] kultiviert und jeweils nach 2, 3, 4, und 5 DIV fixiert, mit Antikörpern gegen MAP2 und tyrosiniertes Tubulin gefärbt und fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet. Die Axone *pnm* mutierter Motoneurone zeigten in Gegenwart von BDNF ein signifikant reduziertes Axonwachstum im Vergleich zu wildtypischen Motoneuronen. Wenn *pnm* mutierte Motoneurone jedoch in Gegenwart von CNTF kultiviert wurden, waren diese hinsichtlich der Axonlänge von Kulturen wildtypischer Motoneurone nicht verschieden (Abb. 14 A). Die Zunahme der Axonlänge zwischen 4 -5 DIV war für *pnm* mutierte als auch wildtypische Motoneurone signifikant, wobei *pnm* mutierte Motoneurone in Gegenwart von BDNF nach 5 DIV ca. 250  $\mu\text{m}$  kürzere Axone zeigten als die Kontrolle. In Gegenwart von BDNF und CNTF waren *pnm* mutierte Motoneurone von wildtypischen Kontrollen nicht verschieden (Abb. 14 B).

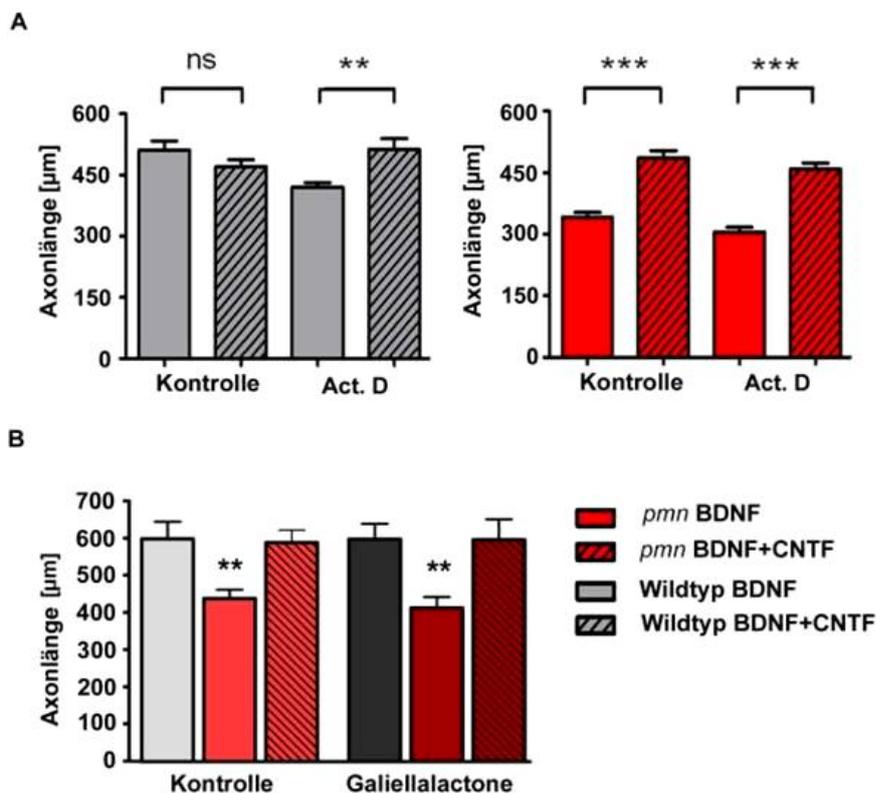


**Abbildung 14: CNTF behebt den axonalen Wachstumsdefekt bei kultivierten *pnm* mutierten Motoneuronen.** **A)** Axonwachstum von isolierten *pnm* mutierten und wildtypischen Motoneuronen zwischen 2 und 5 DIV ohne und mit CNTF [10 ng/ml]. **B)** n = 3 unabhängige Experimente, Signifikante Verlängerung der Axone zwischen 4 und 5 DIV. Daten repräsentieren den Mittelwert, S.E.M.; statistische Analyse: \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01, ns = nicht signifikant (P>0.05); Kruskal-Wallis mit Dunns multiple comparison test.

## Ergebnisse

Anhand dieser Befunde wurden *pmn* mutierte und wildtypische Motoneurone in Gegenwart von BDNF bzw. einer Kombination aus BDNF und CNTF kultiviert, nach 4 DIV mit Actinomycin D behandelt und die Axonelongation nach 5 DIV gemessen. Wildtypische Motoneurone zeigten ein reduziertes Axonwachstum bei Behandlung mit Actinomycin D. In *pmn* mutierten Motoneuronen konnte der Transkriptionshemmer Actinomycin D die CNTF vermittelte Rettung des Axonwachstums nicht unterdrücken (Abb.15 A).

Analog zur Behandlung mit Actinomycin D wurde Galiellalactone als STAT3 spezifischer Transkriptionshemmer eingesetzt. Ältere Untersuchungen an HepG2 Zellen zeigten, dass Galiellalactone die IL-6 vermittelte Signalkaskade mit einem IC50-Wert von 0.25 - 0.5  $\mu\text{M}$  inhibiert und die Bindung von STAT3 an DNA verhindert, ohne den STAT3 Phosphorylierungsstatus zu verändern (Weidler et al. 2000). Galiellalactone bindet an die Cystein-Reste (C468), die sich in der DNA bindenden Region von STAT3-Homodimeren befinden und bildet dadurch einen transkriptionsinaktiven Komplex (Weidler et al. 2000).



**Abbildung 15: Pharmakologische Transkriptionshemmung durch Actinomycin D (Act.D) und Galiellalactone.** Die CNTF vermittelte Wirkung auf das Axonwachstum *pmn* mutierter Motoneurone kann nicht durch Act.D oder Galiellalactone unterdrückt werden. n = 4 (A) und n = 3 (B) unabhängige Experimente, Daten repräsentieren den Mittelwert mit S.E.M.; statistische Analyse: \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01, ns = nicht signifikant (P>0.05); Kruskal-Wallis mit Dunns multiple comparison test.

## Ergebnisse

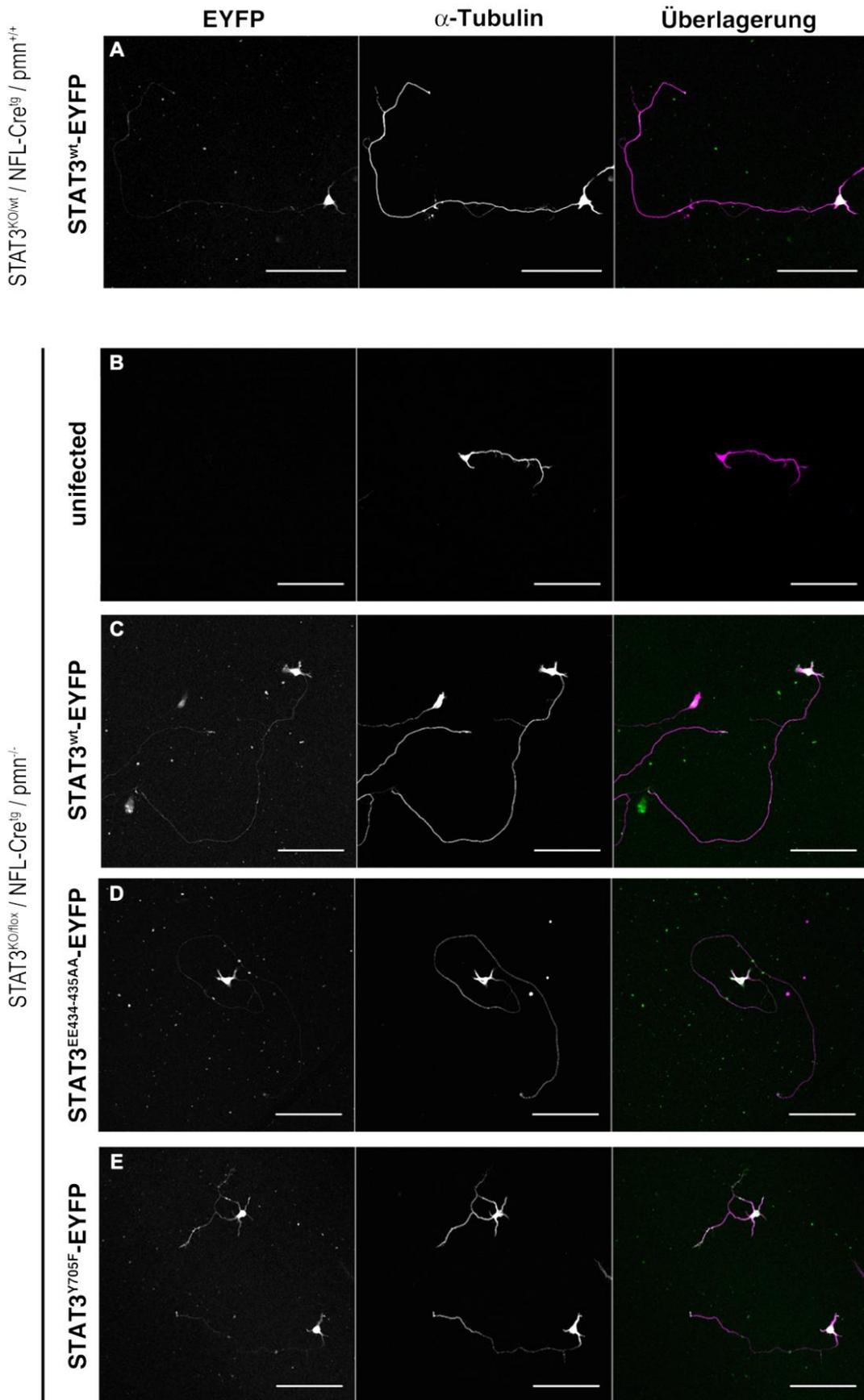
Wildtypische und *pnn* mutierte Motoneuronen wurden ab dem 3 DIV für 48 h mit 0.5  $\mu$ M Galiellalactone behandelt und nach 5 DIV wurde die Axonlänge ermittelt. In *pnn* mutierten Motoneuronen konnte die CNTF induzierte Wirkung auf des Axonwachstum nicht durch Galiellalactone aufgehoben werden (Abb. 15 B). Die mit den pharmakologischen Inhibitoren erzielten Resultate liefern einen weiteren Hinweis darauf, dass die CNTF induzierte Wirkung auf das Axonwachstums bei *pnn* mutierten Motoneuronen nicht auf Transkription basiert.

Weil aber die CNTF Applikation zur STAT3-Phosphorylierung an Y 705 und S 727 führen kann (Yokogami et al. 2000) , sollte durch eine genetische Methode im Anschluss untersucht werden, ob die CNTF induzierte Phosphorylierung von STAT3 an Y705 notwendig und ausreichend ist, um die Wirkung auf das Axonwachstum bei *pnn* mutierten Motoneuronen zu vermitteln. Hierzu wurde durch ortsspezifische Mutagenese ein dominant negatives STAT3<sup>EE434-435AA</sup>-EYFP generiert. Diese Mutation verhindert die DNA-Bindung von STAT3, ohne die STAT3 Phosphorylierung an Y705 zu verhindern (Horvath et al. 1995). Als Kontrolle wurde STAT3<sup>Y705F</sup>-EYFP erzeugt, das nicht durch die CNTF-aktivierten Rezeptorkomplex assoziierten JAK Kinasen aktiviert werden kann.

Die lentivirale Transduktion dieser dominant negativen STAT3-EYFP Isoformen in primären Motoneuronen zeigte, dass STAT3<sup>Y705F</sup>-EYFP die Phosphorylierung an Tyrosin 705 verhindert, während STAT3<sup>wt</sup>-EYFP und STAT3<sup>EE434-435AA</sup>-EYFP an Y705 phosphoryliert werden können (Dissertation Bhuvaneish T.S.). Dass die dominant negative STAT3<sup>EE434-435AA</sup>-EYFP Mutante keine Transkriptionsaktivität besitzt, erschließt sich aus dem Versuch, in neuralen Stammzellen (NSZ) durch LIF-Gabe die GFAP Expression zu induzieren (Rajan & McKay 1998). Bei lentiviraler Transduktion von NSZ mit STAT3<sup>EE434-435AA</sup>-EYFP zeigte die LIF-Gabe eine Reduzierung der GFAP Expression. Als Kontrolle wurde der bereits o.g. Transkriptioninhibitor Galiellalactone eingesetzt, der ebenfalls die GFAP Expression in LIF behandelten NSZ unterdrückt (Dissertation Bhuvaneish T.S.).

Um anschließend zu testen, ob STAT3 abhängige Transkription für das Längenwachstum von Axonen notwendig ist, wurde das Axonwachstum in konditionell Stat3 ablatierten *pnn* mutierten Motoneuronen untersucht, die lentiviral mit STAT3<sup>EE434-435AA</sup>-EYFP, STAT3<sup>Y705F</sup>-EYFP oder STAT3<sup>wt</sup>-EYFP transduziert wurden. Wildtypische (STAT3<sup>KO/wt</sup>; NFL-Cre<sup>tg</sup>; *pnn*<sup>+/+</sup>) STAT3<sup>wt</sup>-EYFP überexprimierende Motoneurone zeigen in Gegenwart von BDNF [5 ng/ml] und CNTF [10 ng/ml] nach 5 DIV Axonlängen, die vergleichbar sind mit nicht infizierten Kontrollen (Abb.16 und Abb. 17 B). In Gegenwart von BDNF kultivierte STAT3 defiziente *pnn* mutierte Motoneurone (STAT3<sup>KO/flox</sup>; NFL-Cre<sup>tg</sup>; *pnn*<sup>-/-</sup>) zeigten kürzere Axone als die wildtypischen Kontrollen des gleichen Wurfs (Abb.16 B, Abb. 17 B).

# Ergebnisse



Abbildung

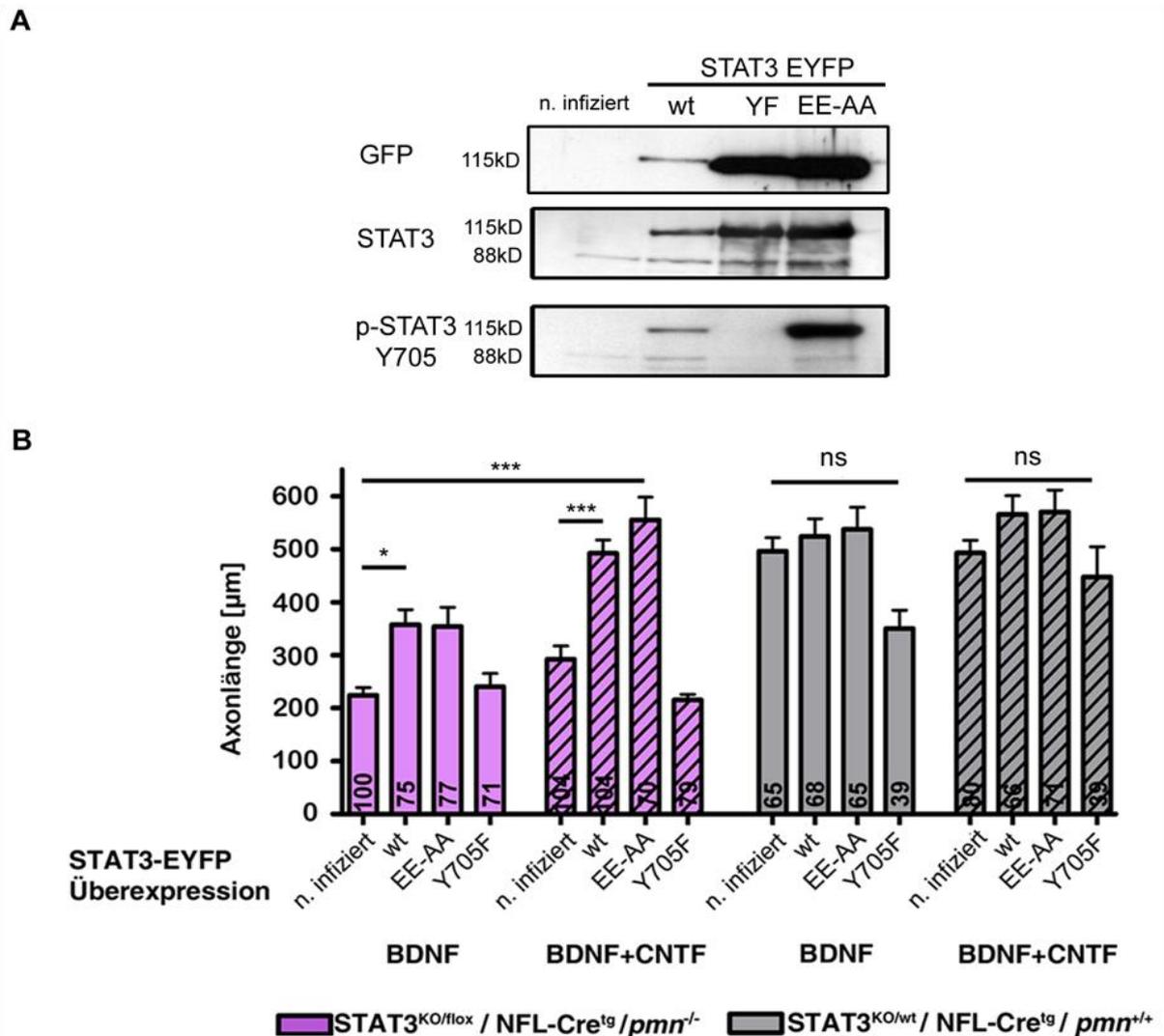
**16: CNTF vermittelt das Axonwachstum transkriptionsunabhängig über pSTATY705.** Repräsentative Aufnahmen von Motoneuronen, die lentiviral transduziertes STAT3<sup>wt</sup>, STAT3<sup>EE434-435AA</sup>- und STAT3<sup>Y705F</sup>-EYFP überexprimieren, gegengefärbt mit anti- $\alpha$ -Tubulin Antikörper, nach 5 DIV. A) wildtypisches Motoneuron,

## Ergebnisse

transduziert mit STAT3<sup>wt</sup> EYFP, kultiviert in Gegenwart von BDNF [5 ng/ml] und CNTF [10 ng/ml]. **B-E**) konditionell Stat3 ablatierte *pnn* mutierte Motoneurone. **B**) Nicht infiziert, **C**) STAT3<sup>wt</sup>-EYFP, **D**) STAT3<sup>EE434-435AA</sup>-EYFP (transkriptionsinaktives STAT3-EYFP), **E**) STAT3<sup>Y705F</sup>-EYFP (nicht über CNTF aktivierbares STAT3-EYFP). Maßstabsbalken: 100 µm

Mittels Westernblot Analyse konnte mit einem phospho-spezifischen Antikörper gegen pSTAT3<sup>Y705</sup> (cell signaling 4113, M9C6) gezeigt werden, dass in kultivierten Motoneuronen wildtypisches STAT3-EYFP und die dominant negative transkriptionsinaktive Isoform STAT3<sup>EE434-435AA</sup>-EYFP durch CNTF phosphorylierbar sind, nicht jedoch die dominant negative STAT3<sup>Y705F</sup>-EYFP Mutante (Abb. 17 A). Die Überexpression von STAT3<sup>wt</sup>-EYFP und STAT3<sup>EE434-435AA</sup>-EYFP aber nicht die Überexpression von STAT3<sup>Y705F</sup>-EYFP führte schon in Gegenwart von BDNF zu tendenziell längeren Axonen in STAT3 defizienten *pnn* mutierten Motoneuronen (Abb. 17 B). Jedoch konnte CNTF ausschließlich bei der Überexpression von STAT3<sup>wt</sup>-EYFP und STAT3<sup>EE434-435AA</sup>-EYFP jedoch nicht der Überexpression von STAT3<sup>Y705F</sup>-EYFP das Axonwachstums unterstützen (Abb.16 und 17 B). Dieses Ergebnis untermauert die Hypothese, dass pSTAT3<sup>Y705</sup> benötigt wird, nicht aber dessen transkriptionelle Aktivität, um in *pnn* mutierten Motoneuronen die CNTF abhängige Wirkung auf das Axonwachstum zu vermitteln.

# Ergebnisse



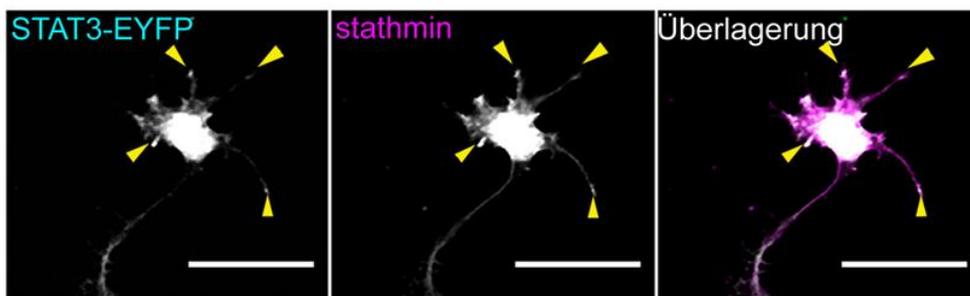
**Abbildung 17: CNTF induzierte STAT3 abhängige Wirkung auf das Axonwachstum ist transkriptionsunabhängig. A)** Westernblot Analyse zur Verifizierung der CNTF abhängigen Phosphorylierung der überexprimierten STAT3-EYFP Isoformen. wt = STAT3<sup>wt</sup>, YF = STAT3<sup>Y705F</sup>, EE-AA = STAT3<sup>EE434-435AA</sup>-EYFP. **B)** Quantifizierung der Axonlänge STAT3 defizienter und wildtypischer Motoneurone nach 5 DIV, die mit wildtypischem (wt), transkriptionsinaktivem (EE-AA) und nicht über CNTF aktivierbarem (Y705F) STAT3-EYFP transduziert wurden. Zahlen in den Balken geben die Anzahl gemessener Axone an. n = 3 unabhängige Experimente, Daten repräsentieren den Mittelwert mit S.E.M.; statistische Analyse: \*\*\*P<0.001, \*P<0.05, ns = nicht signifikant (P>0.05); Kruskal-Wallis mit Dunns multiple comparison test.

## Ergebnisse

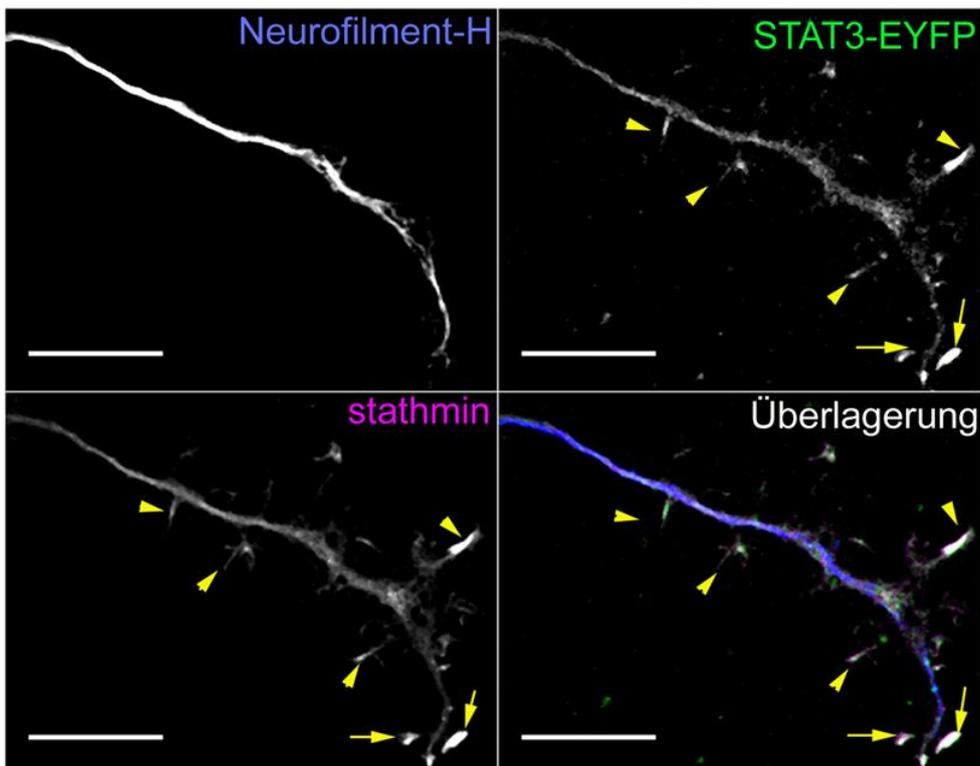
### 6.1.7 Stathmin ist ein Ziel des CNTF/STAT3 Signalwegs

Stathmin ist ein MT destabilisierendes Protein, das freie  $\alpha/\beta$ -Tubulin Heterodimere bindet und dadurch den Pool frei verfügbarer Tubulin Heterodimere für die MT-Polymerisierung reduziert (Amayed et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass Stathmin in nicht neuronalen Zellen mit dem C-terminus von STAT3 interagiert, und dass die Phosphorylierung von STAT3 an Y705 diese Interaktion verstärkt (Verma et al. 2009), wodurch Stathmin seine MT destabilisierende Wirkung verliert (D. C. H. Ng, Bao, et al. 2006). Deshalb wurde postuliert, dass Stathmin ein direktes Ziel der CNTF/STAT3 Signalkaskade bei *pnn* mutierten Motoneuronen ist.

A



B



**Abbildung 18: Kolokalisation von STAT3-EYFP und Stathmin in Dendriten, Zellkörpern und Axonen.** A: Mit STAT3<sup>wt</sup>-EYFP transduziertes STAT3 defizientes Motoneuron, immunzytochemisch gegen Neurofilament-H (Ratte polyklonal ;Alexa 405), STAT3 (Maus monoklonal 124H6, Cy2) und Stathmin (Kaninchen monoklonal, EP1573Y, Cy5 ) gefärbt. STAT3-EYFP und Stathmin kolokalisieren in Wachstumskegeln (Pfeile) und in axonalen Abzweigungen (Pfeilköpfe). Maßstabsbalken: 10  $\mu$ m.

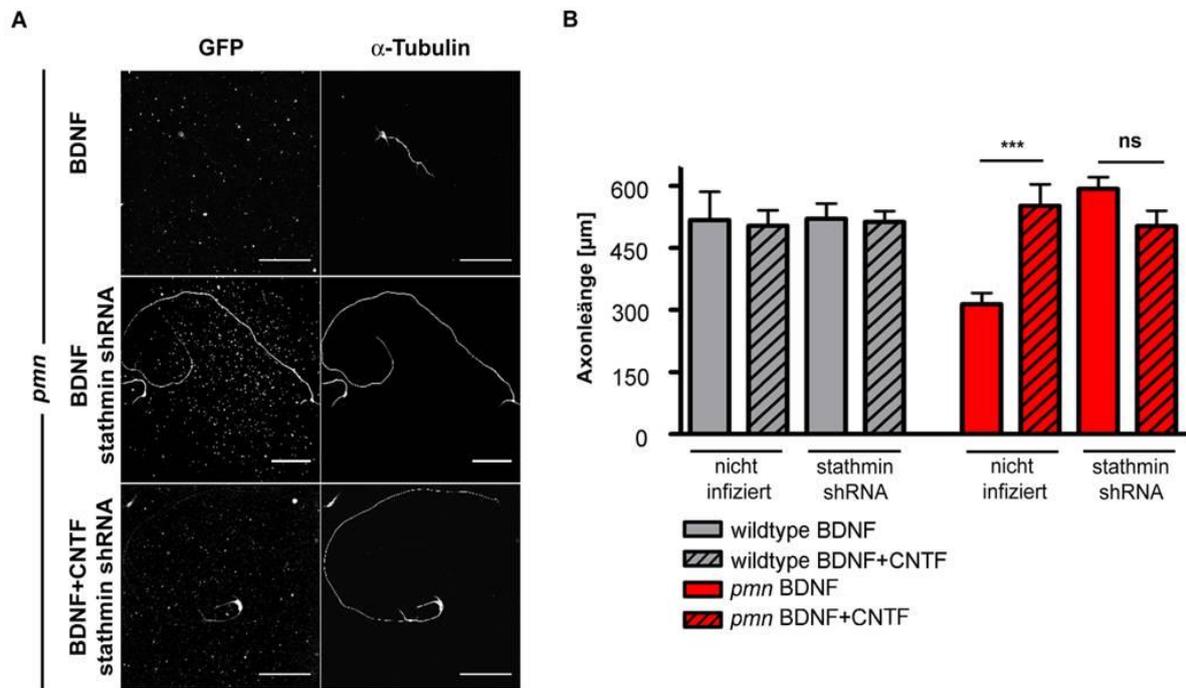
## Ergebnisse

Um diese Behauptung zu überprüfen, wurde die Lokalisierung beider Proteine in primären Motoneuronen untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass STAT3 und Stathmin besonders in Dendriten, Zellkörpern (Abb.18 A) und in Axonterminalen (Abb. 18 B) kolokalisieren. Um falsch positive Kolokalisationssignale zu verhindern, wurden Sekundärantikörper gewählt, deren Exzitations- und Emissionswellenlängen gut durch die Emissionfilter zu separieren sind (Alexa 405, Cy2, Cy5).

Wenn Stathmin für das verkürzte Axonwachstum in *pnn* mutierten Motoneuronen mitverantwortlich ist, sollte durch die shRNA vermittelte Reduzierung von Stathmin das Axonwachstum *pnn* mutierter Motoneurone gefördert werden. Vorherige Versuche von Florian Bender konnten bereits biochemisch und durch Analysen der Axonlänge die Funktionalität einer shRNA gegen Stathmin in lentiviral transduzierten Motoneuronen nachweisen. Es stellte sich allerdings die Frage, ob Stathmin tatsächlich durch die CNTF/STAT3 Signalkaskade inhibiert wird, und ob diese Inhibierung der Grund für die Wirkung von CNTF auf die axonalen Pathologien in *pnn* mutierten Mäusen ist.

Ein Experiment, bei dem der Stathmin knock-down in *pnn* mutierten Motoneuronen in Gegenwart von CNTF durchgeführt wird, sollte Aufschluss darüber geben. Ist Stathmin kein Ziel der CNTF/STAT3 Signalkaskade, würde man annehmen, dass sich der nützliche Effekt des Stathmin knock-down und die CNTF vermittelten Effekte im Axonwachstum aufaddieren. Deswegen wurden *pnn* mutierte Motoneurone in Gegenwart von BDNF oder einer Kombination von BDNF und CNTF kultiviert und mit einer shRNA gegen Stathmin transduziert, nach 5 DIV fixiert und mit einem anti  $\alpha$ -Tubulin Antikörper gegengefärbt und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie aufgenommen (Abb. 19 A).

## Ergebnisse



**Abbildung 19: Stathmin knock-down und die Wirkung von CNTF addieren sich nicht im Axonwachstum. A)** Fluoreszenz-aufnahmen von *pmn* mutierten Motoneuronen, die in Gegenwart von BDNF oder BDNF und CNTF kultiviert und mit einem shRNA codierenden Lentivirus gegen Stathmin transduziert wurden. Maßstabsbalken: 100  $\mu$ m **B)** Quantifizierung der Axonlänge nach 5 DIV. n = 3 unabhängige Experimente, Daten repräsentieren den Mittelwert mit S.E.M.; statistische Analyse: \*\*\* $P < 0.001$ , \* $P < 0.05$ , ns = nicht signifikant ( $P > 0.05$ ); Kruskal-Wallis mit Dunns multiple comparison test.

Die statistische Analyse der Axonlängen ergab, dass weder der knock-down von Stathmin noch die zusätzliche CNTF-Gabe das Axonwachstum in wildtypischen Motoneuronen gegenüber nicht infizierten Kontrollen verändert (Abb. 19 B). In Gegenwart von CNTF sind *pmn* mutierte Motoneuronen hinsichtlich der Axonlänge von wildtypischen Kontrollen nicht verschieden. Der knock-down von Stathmin in *pmn* mutierten Motoneuronen kann, ähnlich wie CNTF, das Axonwachstum auf wildtypisches Niveau steigern (Abb. 19 B). Die Gegenwart von CNTF kann in Stathmin-shRNA transduzierten *pmn* mutierten Motoneuronen kein zusätzliches Axonwachstum induzieren, das über die Axonlängen hinaus geht, die *pmn* mutierte Motoneurone bei der separaten Behandlung mit CNTF oder bei einem Stathmin knock-down zeigen (Abb.19).

Die Analyse des Axonwachstums und die Untersuchungen zum Einfluss von CNTF auf die Proteininteraktion zwischen Stathmin und STAT3 lieferten einen konkreten Hinweis darauf, dass die CNTF induzierte STAT3 Signalkaskade in der Unterdrückung der MT destabilisierenden Wirkung von Stathmin resultiert (Selvaraj et al., 2012).

## **6.2 Wie wirkt sich die Gabe von CNTF auf den axonalen Mitochondrientransport in *pnn* mutierten Motoneuronen aus?**

Es gibt eine Reihe von Hinweisen die die Hypothese stützen, dass gestörter axonaler Transport eine fundamentale Rolle bei der Pathogenese humaner Motoneuronenerkrankungen spielt (Sasaki & Iwata 1996; Stokin 2005; Stokin & Goldstein 2006). Bei der Alzheimer Erkrankung beispielsweise, sind erste Anzeichen der Degeneration axonale Schwellungen, die eine abnormale Menge von Mitochondrien aufweisen (Stokin 2005).

Vergleichbare axonale Schwellungen konnten, wie bereits erwähnt, bei kultivierten *pnn* mutierten Motoneuronen nachgewiesen werden (Bommel et al. 2002; Selvaraj et al. 2012). Wenn das reduzierte Axonwachstums von *pnn* mutierten Motoneuronen *in vitro* auf Veränderungen des axonalen Mikrotubuliskeletts basiert (Schaefer et al. 2007), sollte auch der axonale Transport in *pnn* mutierten Motoneuronen gestört sein.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden primäre Motoneurone aus *pnn* mutierten und wildtypischen Embryonen (E13.5) isoliert und anschließend der axonale Transport von Mitochondrien mittels Fluoreszenzmikroskopie verfolgt.

### **6.2.1 Axonaler Transport von Mitochondrien**

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass *pnn* mutierte im Vergleich zu wildtypischen Motoneuronen *in vitro* ein verkürztes Axonwachstum aufweisen. Elektronenmikroskopische Analysen von Axonen kultivierter *pnn* mutierter Motoneurone konnten überdies zeigen, dass sich in den irregulären axonalen Schwellungen verstärkt (dysmorphe) Mitochondrien akkumulieren (Selvaraj et al., 2012). Zur abnormalen Akkumulationen könnte auch ein vermindertes mitochondriales Membranpotential beitragen, wie ältere Untersuchungen am SOD1<sup>G93A</sup> Mausmodell, einem Modell für familiäre Amyotrophe Laterale Sklerose, zeigen (De Vos et al. 2007). Diese Beobachtungen geben Grund zur Annahme, dass Mitochondrien in der Entwicklung der axonalen Pathogenese *pnn* mutierter Motoneurone eine Rolle spielen könnten. Daher wurde im Folgenden der axonale Transport von Mitochondrien sowie das mitochondriale Membranpotential ( $\Psi_{\text{mito}}$ ) in primären *pnn* mutierten Motoneuronen untersucht.

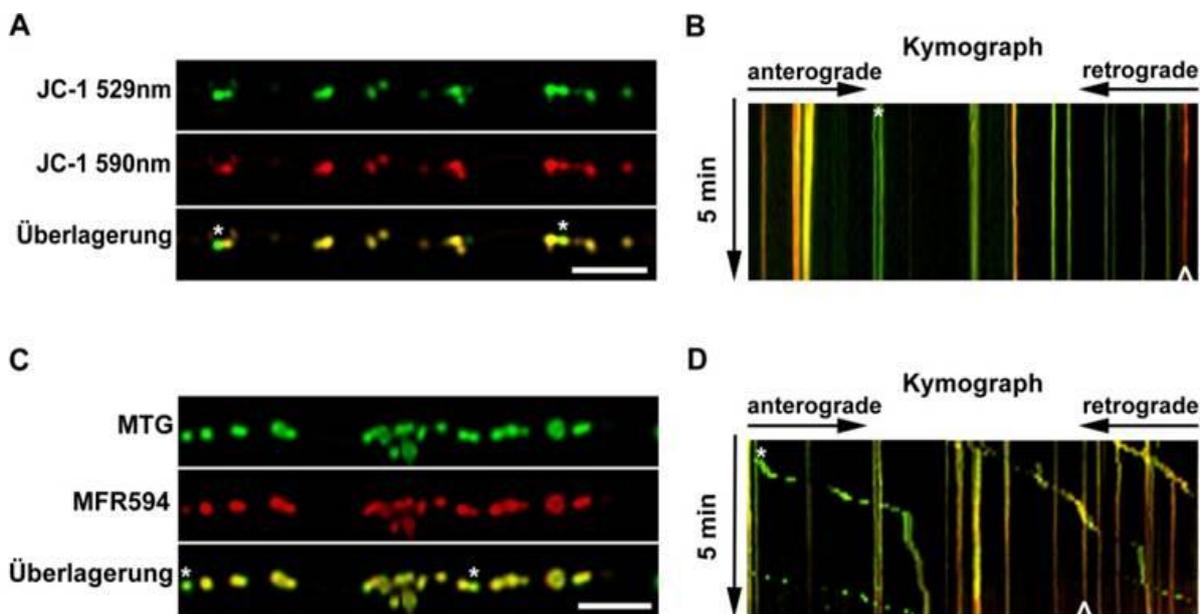
### **6.2.2. Charakterisierung von Farbstoffeigenschaften zur Analyse des axonalen Transports in kultivierten Motoneuronen**

Der ratiometrische Mitochondrien-selektive Farbstoff JC-1 akkumuliert potentialabhängig in der Mitochondrienmatrix. Bei niedrigem Membranpotential existiert der Farbstoff als

## Ergebnisse

Monomer mit einem Emissionsmaximum von 529 nm. Verbunden mit steigendem  $\Psi_{\text{mito}}$  kommt es zur konzentrationsabhängigen Aggregatbildung des Farbstoffs. Unter diesen Umständen verschiebt sich das Emissionsmaximum des Farbstoffs hin zu 590 nm. Bis zu einer Konzentration von 0,75  $\mu\text{g/ml}$  JC-1 konnten Mitochondrien in lebenden Motoneuronen präzise detektiert werden. Jedoch inhibierte JC-1 selbst bei dieser Konzentration den Transport von Mitochondrien in isolierten Motoneuronen. Daher war eine Korrelation von  $\Psi_{\text{mito}}$  und Transport, wie von Miller und Sheetz beschrieben (Miller & Sheetz 2004) nicht möglich (Abb. 20 A, B).

Rhodamin 123 ist ein lipophiler kationischer Mitochondrienfarbstoff, der häufig zur Lebendzellbeobachtung eingesetzt wird (Morris & Hollenbeck 1995). Der Fluoreszenzfarbstoff akkumuliert abhängig vom Membranpotential in Mitochondrien jedoch tritt bei zu starker mitochondrialer Akkumulation eine Fluoreszenzauslöschung (Quenching) ein (Emaus et al. 1986).



**Abbildung 20:** Vergleich der JC-1 Fluoreszenzmarkierung mit MitoFluor Red 594 (MFR594)/MitoTracker Green (MTG) Doppelfärbung in primären Motoneuronen (Weitfeld-Mikroskopie). **A)** JC-1 gefärbte Mitochondrien deuten das mitochondriale Membranpotential durch relative Fluoreszenzintensitätsänderung bei 590 nm an. **B)** Die repräsentative Zeitrafferaufnahme (Kymograph) von JC-1 gefärbten axonalen Mitochondrien zeigt ausschließlich stationäre Mitochondrien mit unterschiedlichem Membranpotential. **C-D)** Die Doppelfärbung von Mitochondrien mit MFR594/MTG erlaubt die Detektion von Änderungen des Membranpotentials als relative Fluoreszenzintensitätsänderung von MFR594 gegenüber MTG, ohne dabei den Transport zu inhibieren - wie die repräsentative Zeitrafferaufnahme zeigt (**D**). Maßstabsbalken 10  $\mu\text{m}$ . \* niedriges Membranpotential, ^ hohes Membranpotential.

Durch die Analyse des axonalen Transports von Rhodamin 123 markierten Mitochondrien konnte ein axonales Transportdefizit in *pnm* mutierten Motoneuronen aufgedeckt werden (Selvaraj et al., 2012). Hierzu wurden kultivierte Motoneurone mit 0,2  $\mu\text{g/ml}$  Rhodamin 123

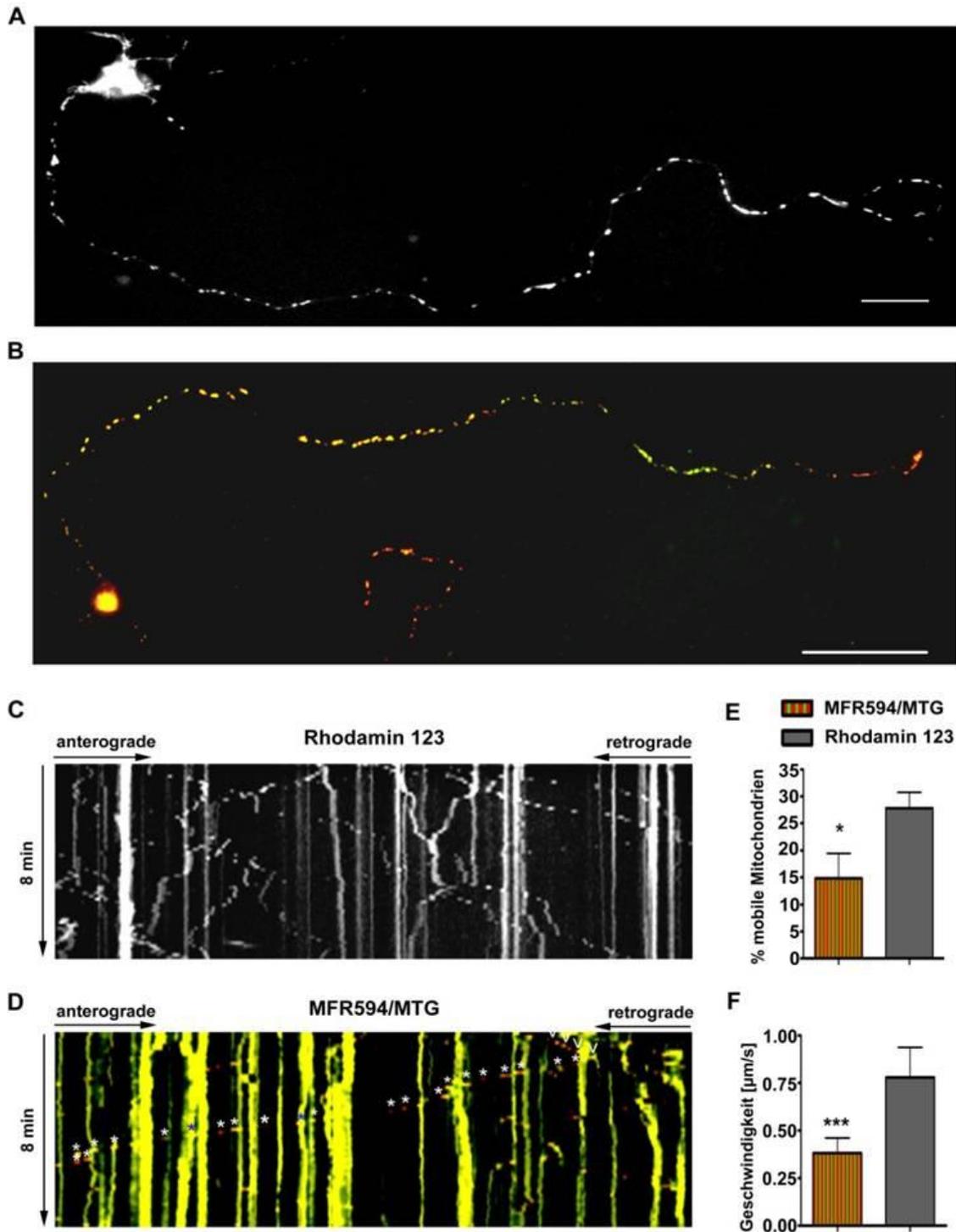
## Ergebnisse

inkubiert und anschließend mittels Konfokaler Laserscanning (TCS SP2, Leica) oder Weitfeld Mikroskopie (Nikon Eclipse 2000 TE) visualisiert.

Aufgrund der Eigenschaft des Quenchings von Rhodamin 123 wurde zur Bestimmung des  $\Psi_m$  während des axonalen Transports eine Kombination von MitoTracker Green FM (MTG) und MitoFluor Red594 (MFR594) standardisiert. MTG ist ein Mitochondrien-selektiver Fluoreszenzfarbstoff, der unabhängig vom Membranpotential in Mitochondrien akkumuliert (Baumann & Murphy 1995), und gegenüber Rhodamin 123 eine höhere Photostabilität aufweist. MFR594 ist ebenfalls ein ekliptischer Indikator und selektiv für Mitochondrien. Änderungen im mitochondrialen Membranpotential werden durch die Änderung der Fluoreszenzintensität wiedergegeben (Abb. 20 C, D).

Für die zweifarbige Fluoreszenzmarkierung von Mitochondrien wurden kultivierte Motoneuronen in Gegenwart von 25 nM MTG und 100 nM MFR594 in Kulturmedium 15 min bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurden Motoneurone 3 Mal mit 37°C warmen Leibowitz's Medium gewaschen, um Rückstände der Farbstofflösung zu entfernen. Die Lebendzellbeobachtung wurden am inversen Weitfeld-Mikroskop (Nikon Eclipse 2000 TE) in einer, auf dem Objektisch platzierten, Inkubationskammer durchgeführt. Dieses Mikroskop ist zusätzlich mit einem „Perfect Focus System“ ausgestattet, welches hilft über die Dauer der Aufnahmen den Fokus zu halten.

# Ergebnisse



**Abbildung 21: MFR594/MTG Färbung reduziert die Transportfrequenz und maximale Transportgeschwindigkeit von axonalen Mitochondrien. A)** Repräsentatives Motoneuron mit Rhodamin 123 fluoreszenzmarkierten Mitochondrien; 60x, Balken: 25  $\mu\text{m}$ . **B)** Repräsentatives Motoneuron mit MFR594/MTG gefärbten Mitochondrien; 40x, Balken: 50  $\mu\text{m}$ . **C-D)** Der Vergleich der Kymographen Rhodamin 123 und MFR594/MTG gefärbter Mitochondrien zeigt deutlich die Abnahme in der Transportfrequenz. \* markieren ein retrograd transportiertes Mitochondrium mit hohem Membranpotential; „v“ markiert ein anterograd transportiertes Mitochondrium mit hohem Membranpotential. Quantifizierung der Transportfrequenz **E)** und der Transportgeschwindigkeit **F)**; Daten repräsentieren den Mittelwert mit S.E.M.; Statistische Analyse: \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ ; Mann-Whitney Test, (n = 2 Experimente, 18 Motoneurone Rhodamin 123, 10 Motoneurone MFR594/MTG; Geschwindigkeit: 38 Mitochondrien Rhodamin 123, 39 Mitochondrien MFR594/MTG)

## Ergebnisse

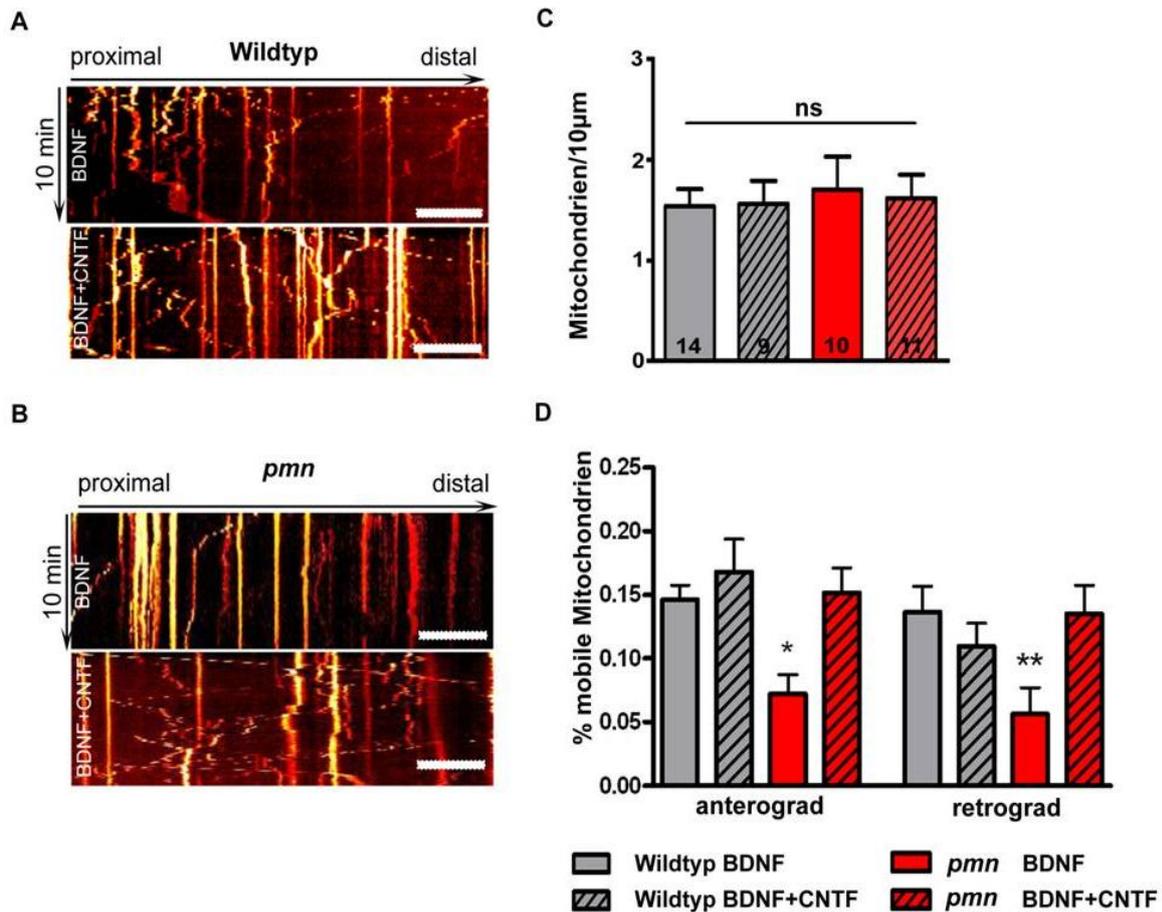
Aufgrund des Mikroskop- und Fluoreszenzfarbstoffwechsels wurde die oben genannte Fluoreszenzmarkierung mit Rhodamin 123 in wildtypischen Motoneuronen (BG NMRI) wiederholt und mit der Doppelfärbung MFR594/MTG verglichen (Abb.21 A, B). Interessanterweise zeigte der Vergleich der MFR594/MTG und Rhodamin 123 Färbung, dass die Transportfrequenz und die maximale Transportgeschwindigkeit von MFR594/MTG markierten Mitochondrien gegenüber Mitochondrien mit Rhodamin 123 Färbung reduziert ist (Abb. 21 C-F).

### **6.2.3 CNTF und der knock-down von Stathmin retten das axonale Transportdefizit in *pnn* mutierten Motoneuronen**

Zu Beginn dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die neurotrophen Faktoren GDNF, BDNF und CNTF das Überleben von Motoneuronen *in vitro* vergleichbar unterstützen, jedoch ausschließlich CNTF die Fähigkeit besitzt, den Veränderungen des Axonwachstums in *pnn* mutierten Motoneuronen entgegenzuwirken. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der lentivirale knock-down des MT destabilisierenden Proteins Stathmin, das Axonwachstum in *pnn* mutierten Motoneuronen fördert. Beide Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass CNTF und der knock-down von Stathmin auch den axonalen Transport in *pnn* mutierten Motoneuronen beeinflussen könnten.

Um diese Vermutung zu stützen, wurden *pnn* mutierte und wildtypische embryonale Motoneurone (E13.5) für einen Zeitraum von 5 DIV in Gegenwart von BDNF bzw. einer Kombination aus BDNF und CNTF kultiviert. Anschließend wurde die axonale Mobilität von MFR594/MTG markierten Mitochondrien fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 20 C, D, 21 B, D, 22). Aus Zeitrafferaufnahmen erstellte Kymographen verdeutlichen das Transportdefizit in Axonen *pnn* mutierter Motoneuronen. Durch die Kultivierung in Gegenwart von CNTF war die Mobilität axonaler Mitochondrien in *pnn* mutierten Motoneuronen deutlich erhöht (Abb. 22 B). Die Auswertung der Kymographen zeigt, dass weder der Genotyp der untersuchten Motoneuronen, noch CNTF einen Einfluss auf die Anzahl axonaler Mitochondrien hat (Abb. 22 C). Dagegen konnte gezeigt werden, dass CNTF den Transport axonaler Mitochondrien in *pnn* mutierten Motoneuronen in anterograder und retrograder Richtung auf das Niveau wildtypischer Kontrollen steigert (Abb. 22 D).

## Ergebnisse



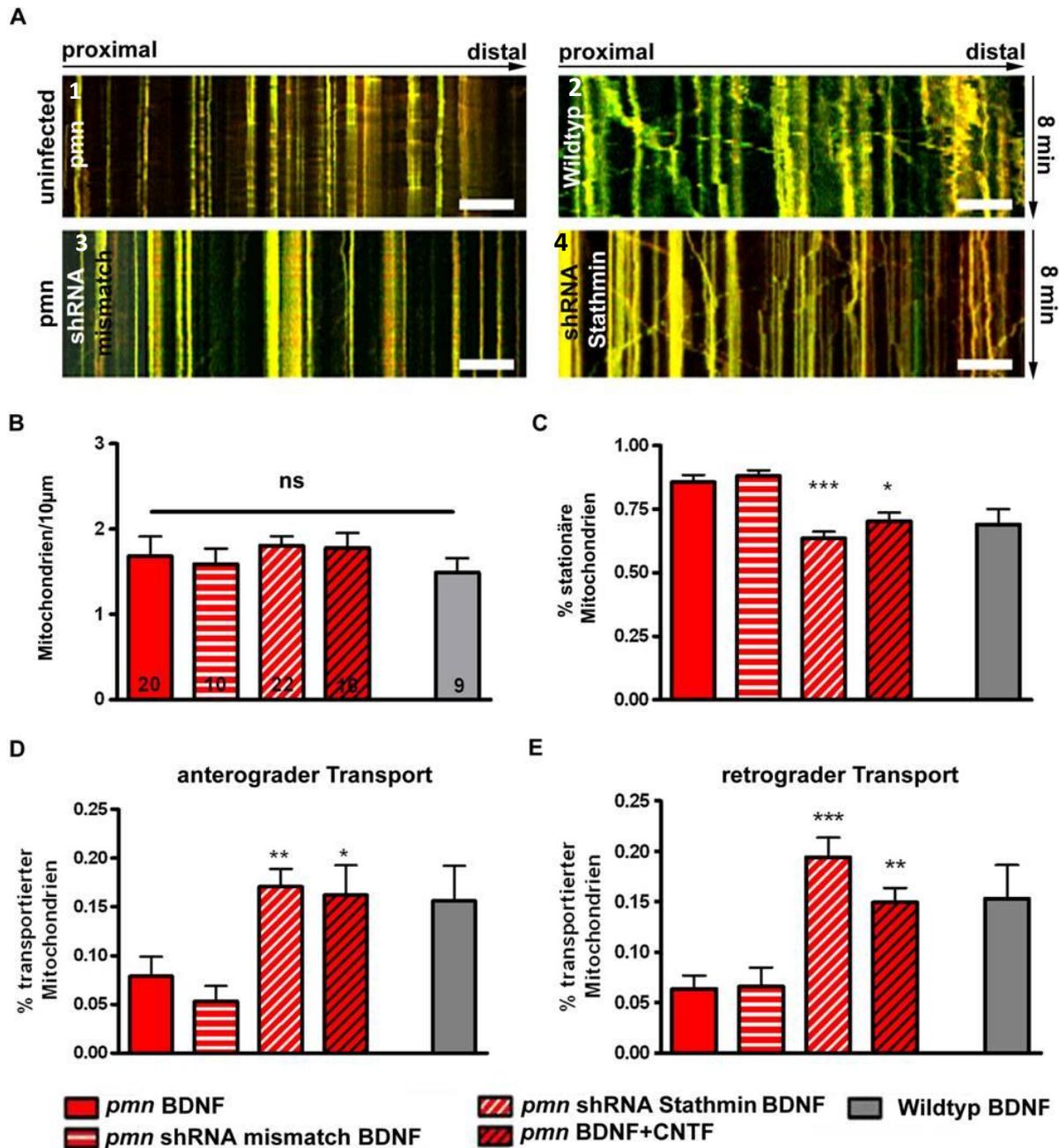
**Abbildung 22: CNTF behebt das axonale Transportdefizit in kultivierten *pmn* mutierten Motoneuronen.** A-B) Repräsentative Kymographen von axonalen Mitochondrien aus wildtypischen und *pmn* mutierten Motoneuronen, die 5 Tage in Gegenwart von BDNF [5 ng/ml] oder einer Kombination aus BDNF und CNTF [10 ng/ml] kultiviert wurden; Maßstabsbalken: 25 µm. C) Analyse der Anzahl axonaler Mitochondrien in wildtypischen und *pmn* mutierten Motoneuronen. Zahlen in den Balken zeigen die Anzahl untersuchter Zellen, n = 3 unabhängige Experimente. D) CNTF rettet den anterograden und retrograden Mitochondrientransport in Axonen von *pmn* mutierten Motoneuronen; die Daten repräsentieren den Mittelwert mit S.E.M.; Statistische Analyse: Mann-Whitney test; \*\*P<0.01; \*P<0.05; ns = nicht signifikant (P>0.05).

Stathmin destabilisiert MT, und diese Funktion begünstigt im dynamischen Gleichgewicht von MT-Polymerisierung und -Depolymerisation den Zerfall der MTs. Wenn der knock-down von Stathmin sowie die Gabe von CNTF in gleicher Weise das Wachstum von Axonen *pmn* mutierter Motoneurone unterstützen, nämlich durch die Stabilisierung der axonalen MT, dann sollte der Stathmin knock-down ebenfalls das axonale Transportdefizit in *pmn* mutierten Motoneuronen beheben.

Daher wurden vor dem Ausplattieren *pmn* mutierte Motoneuronen mit Lentiviren infiziert, die für eine shRNA gegen Stathmin (shRNA Stathmin) oder für eine unspezifische shRNA („mismatch“ Kontrolle) kodieren. Nach 5 DIV wurden die Mitochondrien der Motoneurone

## Ergebnisse

mittels MFR594/MTG Doppelfärbung fluoreszenzmarkiert und der anterograde sowie retrograde Transport in Axonen analysiert.



**Abbildung 23: Der knock-down von Stathmin behebt das axonale Transportdefizit von Mitochondrien in *pmn* mutierten Motoneuronen.** **A 1-4)** Repräsentative Kymographen von MFR594/MTG markierten axonalen Mitochondrien in *pmn* mutierten und wildtypischen Motoneuronen die für einen Zeitraum von 5 DIV in Gegenwart von BDNF kultiviert wurden. **A 3)** Axonale Mitochondrien eines *pmn* mutierten Motoneurons, transduziert mit einem shRNA „mismatch“ kodierenden Lentivirus. **A 4)** Axonale Mitochondrien eines *pmn* mutierten Motoneurons, transduziert mit einem shRNA „Stathmin“ kodierenden Lentivirus. Maßstabsbalken: 25 µm. **B-E)** Quantifizierung des anterograden und retrograden axonalen Transports in *pmn* mutierten Motoneuronen bei lentiviral vermitteltem knock-down von Stathmin, Daten repräsentieren den Mittelwert mit S.E.M.; n = 3 unabhängige Experimente, Zahlen im Balkendiagramm B zeigen die untersuchte Zellzahl pro Kondition. Statistische Analyse: \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01, \*P<0.05; ns= nicht signifikant (P>0.05); Kruskal-Wallis mit Dunns multiple comparison test.

## Ergebnisse

Wie bereits beschrieben, zeigt der Vergleich von *pmn* mutierten mit wildtypischen Motoneuronen ein Transportdefizit von axonalen Mitochondrien in *pmn* mutierten Motoneuronen (Abbildung 23 A1, 2 und Abb. 22). Bei Transduktion mit shRNA „mismatch“ kodierenden Lentiviren konnte der Anteil stationärer Mitochondrien in Axonen *pmn* mutierter Motoneuronen nicht reduziert werden (Abb. 23 A3) während der knock-down von Stathmin die Transportrate axonaler Mitochondrien in *pmn* mutierten Motoneuronen steigerte (Abb. 23 A4). Die Transduktion selbst bewirkte keine Änderung der Anzahl axonaler Mitochondrien (Abb. 23 B), was einen direkten Vergleich der Transportraten der unterschiedlichen Konditionen zulässt.

Die Analyse der Mobilität axonaler Mitochondrien zeigt, dass die Infektion mit Kontrollviren keinen Einfluss auf den prozentualen Anteil stationärer Mitochondrien hatte, jedoch reduzierte der Stathmin knock-down den Anteil stationärer Mitochondrien in *pmn* mutierten Motoneuronen auf ein Niveau, das vergleichbar ist mit dem von *pmn* mutierten Motoneuronen bei CNTF-Behandlung, bzw. mit dem in wildtypischen Motoneuronen. Der Stathmin knock-down in *pmn* mutierten Motoneuronen steigerte des Weiteren sowohl die anterograde als auch retrograde Transportrate auf das Niveau von *pmn* mutierten Motoneuronen die in Gegenwart von CNTF kultiviert wurden bzw. auf das von wildtypischen Motoneuronen. Interessanter Weise war die durch den knock-down von Stathmin erzielte Verbesserung des axonalen Transports in *pmn* mutierten Motoneuronen effektiver als die Kultivierung in Gegenwart von CNTF, wahrscheinlich weil CNTF induziertes pSTAT3<sup>Y705</sup> nicht dauerhaft sämtliches Stathmin inhibiert.

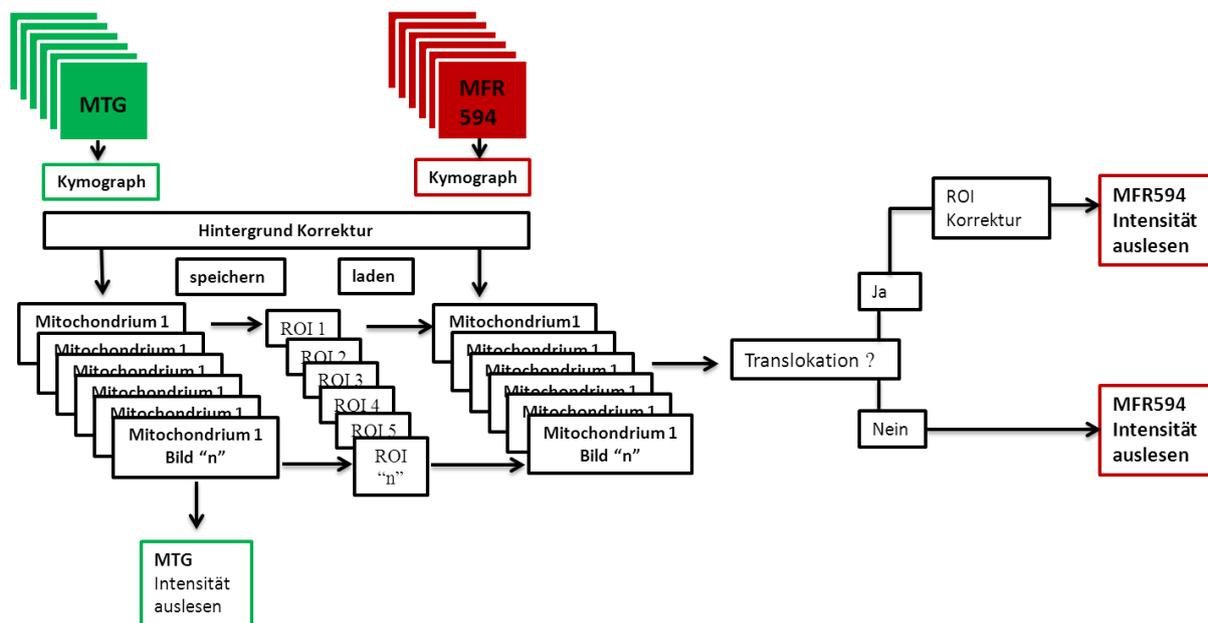
### 6.2.4 Analyse des Membranpotentials axonal transportierter Mitochondrien

Das in kultivierten *pmn* mutierten Motoneuronen festgestellte Transportdefizit kann einerseits durch eine gestörte Mikrotubulidynamik bedingt sein, andererseits könnte die Ursache dafür bei den Mitochondrien selbst liegen. Um die Frage zu beantworten, ob ein verändertes mitochondriales Membranpotential in *pmn* mutierten Motoneuronen für den reduzierten Transport verantwortlich ist, wurden *pmn* mutierte und wildtypische Motoneurone 5 DIV in Gegenwart von BDNF kultiviert und Mitochondrien durch Inkubation MFR594/MTG fluoreszenzmarkiert.

Die Aufnahmen erfolgten mit dem Weitfeld-Mikroskop, wobei die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe über Wellenlängen spezifische Exzitationsfilter erfolgte. Die MTG und MFR594 spezifische Emission wurde über einen Dualbandfilter mit einer gekühlten CCD-Kamera (Andor Xion) aufgenommen. Die Verwendung eines Dualbandfilters bei der

## Ergebnisse

Detektion der Emission macht einen Filterwechsel während der Fluoreszenzdetektion überflüssig, sodass beide Emissionsspektren beinahe simultan aufgenommen werden können. Jedoch führt die festgelegte Belichtungszeit der Kamera (500 ms) zu einer Aufnahmeverzögerung beim Wechsel vom kurzwelligen in den langwelligeren Kanal. Das hat zur Folge, dass sich schnell bewegende Objekte bei abwechselnder Aufnahme an unterschiedlichen Positionen befinden. Diese unvermeidbare experimentelle Beschaffenheit musste während der Analyse korrigiert werden (Abb 24).

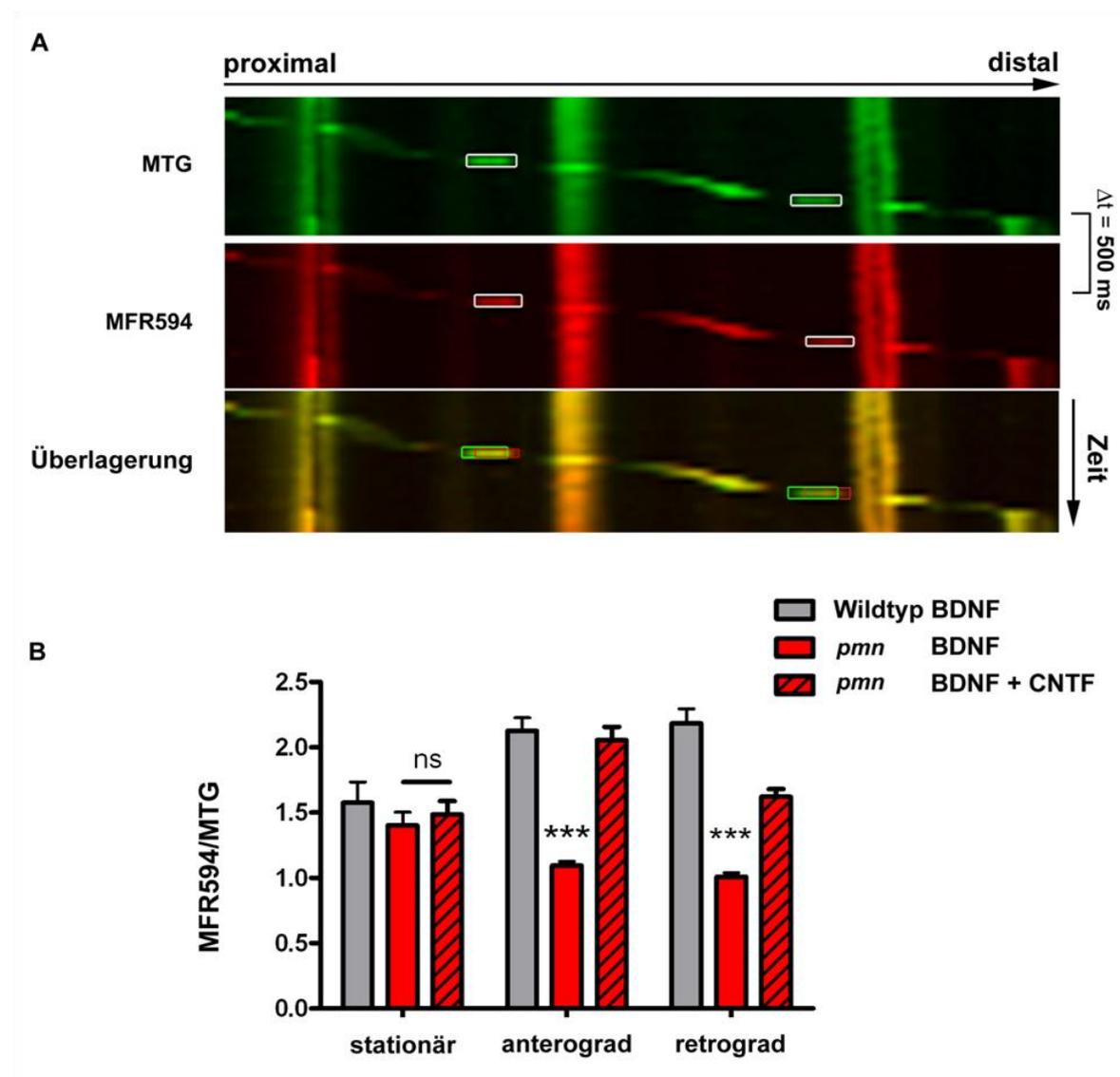


**Abbildung 24: Schematische Darstellung der Auswertung von Fluoreszenzintensitäten bei einer MFR594/MTG Doppelfärbung.** Aus der Zeitrafferaufnahme MTG markierter Mitochondrien wird ein Kymograph erzeugt. Die Bewegung eines grün fluoreszierenden Mitochondriums (MTG) wird durch die Positionierung einer „region of interest“ (ROI) im Kymograph verfolgt und die Positionsinformation der einzelnen ROIs abgespeichert. Anschließend wird ein identischer Kymograph aus der Zeitrafferaufnahme MFR594 markierter Mitochondrien erzeugt und die abgespeicherten ROIs in diesen Kymographen übertragen. Kam es bedingt durch die Belichtungszeit der Kamera zur Translokation des Mitochondriums im roten Kanal, muss die gespeicherte ROI für diesen Kanal korrigiert werden. Anschließend kann die Fluoreszenzintensität ausgelesen und das Verhältnis von MFR594 zu MTG gebildet werden.

Die Analyse des axonalen Transports erfolgte durch Kymographen, die jeweils aus der Zeitrafferaufnahme der MTG bzw. MFR594 Emission erzeugt wurden. Durch die Überlagerung beider Kymographen entsteht ein Mischbild, in dem die Transportgeschwindigkeit sowie das  $\Psi_{\text{mito}}$  als Verhältnis von MTR594/MTG Emission dargestellt werden kann. Die Erfassung der Fluoreszenzintensität von MFR594 und MTG erfolgte durch Markierung einzelner Mitochondrien im Kymographen des grünen Kanals und der anschließenden Übertragung der Region von Interesse (ROI) in den Kymographen des

## Ergebnisse

„roten“ Kanals. Auf diese Weise war es möglich, die o.g. Verschiebung sich schnell bewegender Mitochondrien durch Pixelgenaue Korrektur der ROI zu beheben (Abb. 25 A)



**Abbildung 25: Membranpotentialanalyse von MFR594/MTG markierten axonalen Mitochondrien in wildtypischen und *pmn* mutierten Motoneuronen. A)** Repräsentative Kymographen einer Zeitrafferaufnahme von Mitochondrien. Weiße Rechtecke heben ein Mitochondrium hervor, dass sich in anterograder Richtung bewegt. Das Überlagerungsbild zeigt die ROI-Korrektur für den „roten“ Kanal. **B)** Quantifizierung des MFR594/MTG Verhältnisses. n = 3 unabhängige Experimente, 5 Motoneurone pro Kondition und 3-5 Mitochondrien pro Motoneuron. Daten repräsentieren den Mittelwert mit S.E.M.; Statistische Analyse: \*\*\*P<0.001; ns = nicht signifikant (P>0.05); Kruskal-Wallis mit Dunns multiple comparison test.

Es zeigte sich, dass zwischen den stationären Mitochondrien in *pmn* mutierten und wildtypischen Motoneuronen kein Unterschied hinsichtlich des  $\Psi_{\text{mito}}$  besteht (n = 3), wenn diese in Gegenwart von BDNF oder mit BDNF und CNTF kultiviert wurden. Allerdings wiesen sowohl anterograd als auch retrograd transportierte Mitochondrien aus *pmn* mutierten Motoneuronen, die in Gegenwart von BDNF kultiviert wurden, ein signifikant reduziertes

## Ergebnisse

Membranpotential gegenüber transportierten Mitochondrien wildtypischer Motoneuronen auf. Die Kultivierung von *pnn* mutierten Motoneuronen in Gegenwart von CNTF erhöhte das Membranpotential transportierter Mitochondrien. Interessanter Weise war der durch CNTF bedingte Anstieg von  $\Psi_{\text{mito}}$  in anterograd transportierten Mitochondrien stärker als bei retrograd transportierten (Abb 25 B).

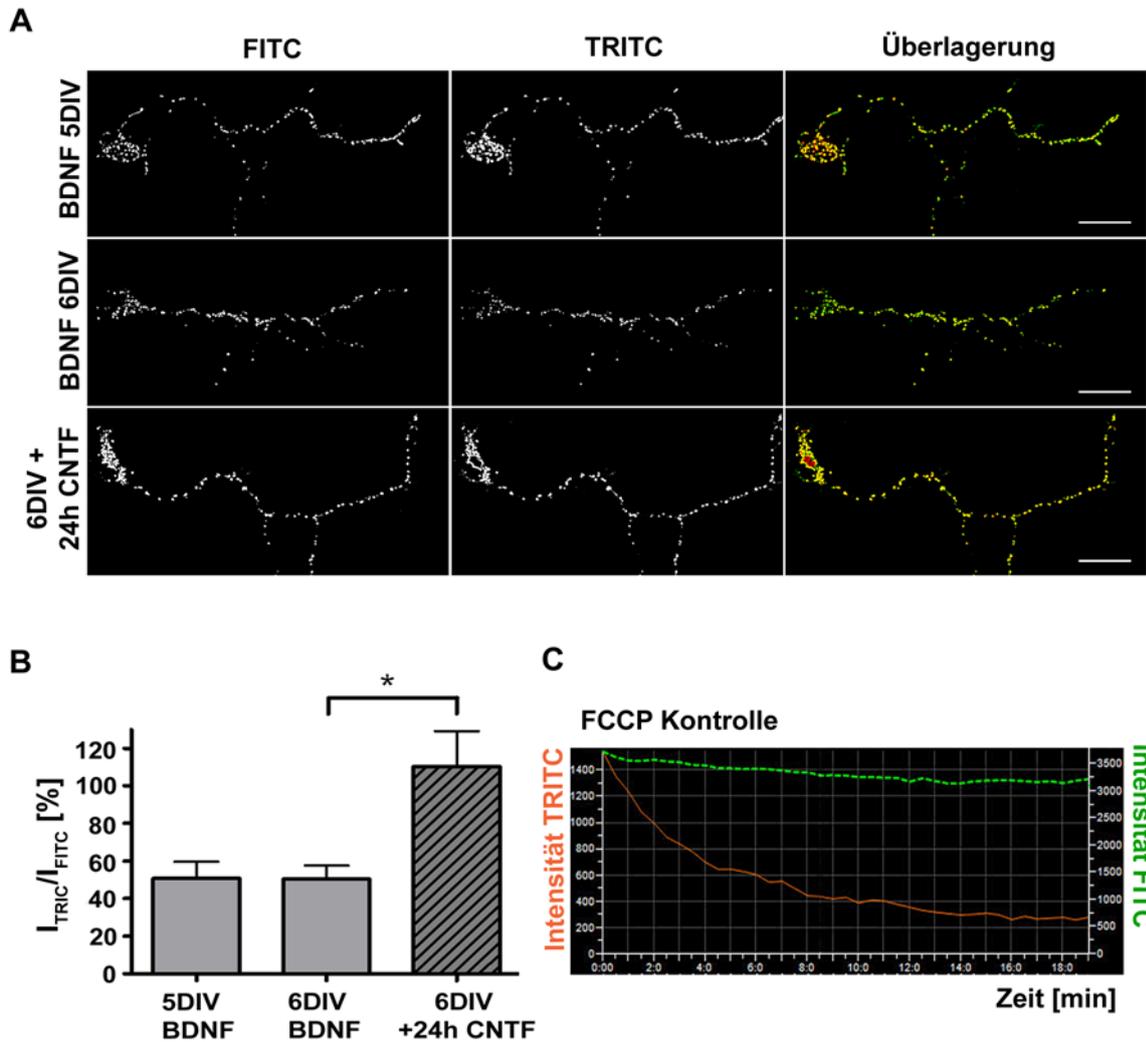
### 6.2.5 CNTF steigert die Aufnahme von JC-1 in axonalen Mitochondrien

Zur Verifikation des CNTF bedingten Anstiegs von  $\Psi_{\text{mito}}$  wurden wildtypische Motoneuronen 5 DIV in Gegenwart von BDNF [5 ng/ml] kultiviert und ein Teil der Zellen mit dem ratiometrischen Fluoreszenzfarbstoff JC-1 inkubiert. Anschließend wurden die Fluoreszenzintensitäten bei 590 nm und 529 nm über die im Nikon Eclipse 2000TE installierten TRITC- bzw. FITC-Einzelband-Filter aufgenommen. Im Vergleich zum oben beschriebenen Dualband Filter zeichnen sich Einzelbandfilter durch eine schärfere Trennung der Transmission aus. Der andere Teil der kultivierten Zellen wurde für weitere 24h mit BDNF bzw. mit einer Kombination von BDNF und CNTF inkubiert.

Die ratiometrische Analyse der Fluoreszenzemission von JC-1 zeigte, dass axonale Mitochondrien in Motoneuronen, die 5 Tage lang in Gegenwart von BDNF [5 ng/ml] kultiviert wurden, nach Applikation von CNTF [10 ng/ml] für 24h eine signifikante Erhöhung im Verhältnis von 590 nm/529 nm Emission aufweisen (Abb. 26 A-B). Um zu überprüfen, ob die gemessene Fluoreszenzemission bei 590 nm tatsächlich ein höheres  $\Psi_{\text{mito}}$  widerspiegelt, wurden Motoneurone mit 300 nM des Entkopplers FCCP (Carbonyl-Cyanid p-Trifluoromethoxyphenylhydrazon) behandelt. FCCP induziert einen  $\text{H}^+$ -Flux über die innere Mitochondrienmembran, bevor die Protonen zur ATP Generierung genutzt werden können. Durch die Aufhebung des elektrochemischen Gradienten zwischen Intermembranraum und Lumen kommt es zum Zusammenbruch des mitochondrialen Membranpotentials (Abb. 26 C).

Diese Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass sich CNTF mehrfach positiv auf die Aufrechterhaltung von *pnn* mutierten Axonen auswirkt. Einerseits durch die Phosphorylierung von  $\text{STAT3}^{\text{Y705}}$  und die damit verbundene Inhibierung von Stathmin und andererseits durch die Aktivierung des Membranpotentials von axonalen Mitochondrien.

## Ergebnisse



**Abbildung 26: CNTF bewirkt eine stärkere Akkumulation von JC-1 in axonalen Mitochondrien.** **A)** Repräsentative Lebendzellaufnahme von JC-1 gefärbten Mitochondrien in Motoneuronen nach 5 bzw. 6 DIV ohne bzw. mit 24 h CNTF Behandlung. Fluoreszenzaufnahmen über FITC (529 nm) und TRITC (590 nm)- Filter, Maßstabsbalken 25  $\mu$ m **B)** Ratiometrische Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten  $I_{TRITC}$  und  $I_{FITC}$ . **C)** Der Entkoppler FCCP führt zum Verlust der  $\Psi_{mito}$ abhängigen JC-1 Akkumulation.

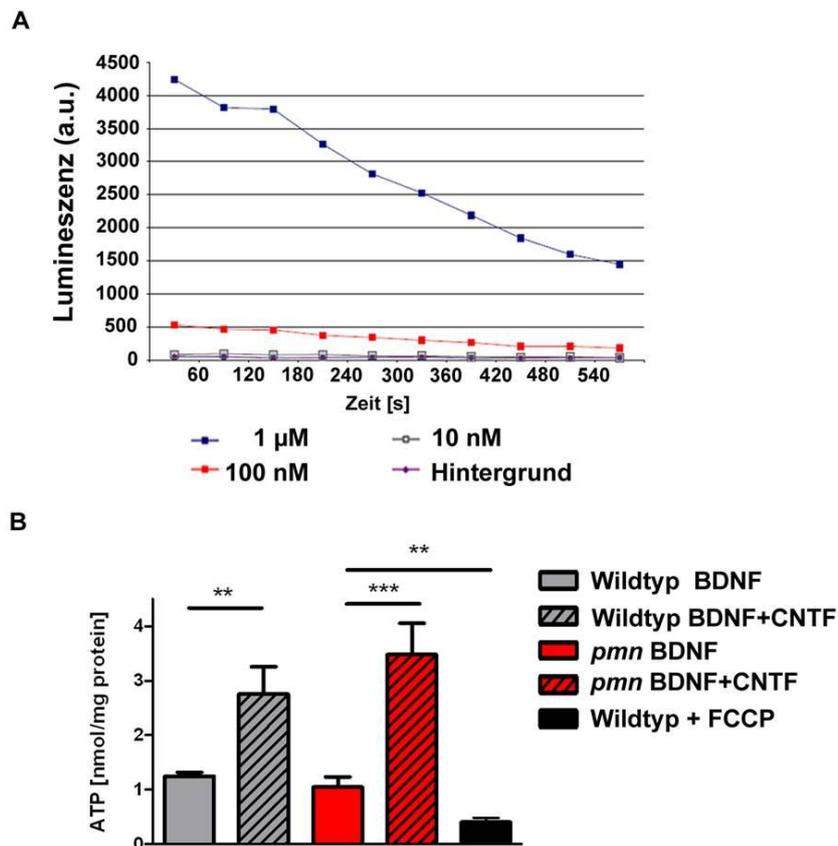
### 6.2.6 CNTF erhöht die ATP-Menge in kultivierten Motoneuronen

Um zu überprüfen, ob mit dem fluoreszenzmikroskopisch festgestellten Anstieg im mitochondrialen Membranpotential auch ein Anstieg im ATP-Level einhergeht, wurden die ATP-Mengen in wildtypischen und *pnn* mutierten Motoneuronen bestimmt. Für diesen Versuch wurden primäre wildtypische und *pnn* mutierte Motoneurone (E12) isoliert und die Zellen eines Embryos auf zwei Kulturschalen aufgeteilt. Beide Kulturen wurden über einen Zeitraum von 5 DIV in Gegenwart von BDNF kultiviert und zur Untersuchung des Einflusses von CNTF auf die ATP-Menge eine Kultur für 30-40 min mit CNTF [10 ng/ml] behandelt. Die ATP Messungen fanden alle zwischen 90 s und 150 s nach Kombination von Lysat und

## Ergebnisse

Reaktionsmix statt, da vorherige Messungen eine stabile Enzym-Substrat Umsetzung zeigten (Abb. 27 A). Standardkurven der Biolumineszenz wurden gemäß Herstellerangaben zwischen 1 nM und 1  $\mu$ M erstellt und zur Bestimmung der ATP-Mengen in den Proben herangezogen. Die Proteinmenge in den Proben wurde anhand einer Bicinchonin Säure (BCA) Standard-Verdünnungsreihe abgeleitet.

Wie die Quantifizierung zeigt, steigert die Gabe von CNTF die ATP-Mengen in wildtypischen als auch *pnm* mutierten Motoneuronen. Als Kontrolle für die Messung der ATP-Menge wurden parallel Motoneurone von wildtypischen Geschwistertieren kultiviert und vor dem Lysieren für 30-40 min mit 300 nM FCCP behandelt. Die FCCP-Kontrolle zeigt gegenüber unbehandelten Kulturen eine signifikante Abnahme der ATP Mengen.



**Abbildung 27: CNTF erhöht die ATP-Mengen in wildtypischen und *pnm* mutierten Motoneuronen.** A) Daten repräsentieren den Mittelwert mit Standardfehler, n = 4 unabhängige Experimente (Embryonen: 7 x Wildtyp, 9 x *pnm* Mutante); Statistische Analyse: \*\*\*P<0.001, \*\*P<0.01, \*P<0.05, two-tailed t-test.

Diese Ergebnisse legen nahe, dass CNTF unabhängig von der Unterstützung der MT-Assemblierung (Selvaraj et al. 2012) den Transport von Mitochondrien durch die Aktivierung des Membranpotentials steigern könnte.

## Ergebnisse

### 6.2.7 Kolokalisation von pSTAT3<sup>S727</sup> mit Mitochondrien

Insbesondere das zuletzt beschriebenen Ergebnis der CNTF abhängigen Erhöhung der ATP-Mengen in wildtypischen und *pnn* mutierten Motoneuronen, wirft die Frage auf, ob CNTF auch über eine Verbesserung der Energieversorgung die Aufrechterhaltung von Axonen in *pnn* mutierten Motoneuronen unterstützt. Da nach der Phosphorylierung von STAT3 an Serin 727 (pSTAT3<sup>S727</sup>) bereits eine Aktivierung der mitochondrialen Atmungskette nachgewiesen wurde (Wegrzyn et al. 2009), liegt die Vermutung nahe, dass die CNTF-Gabe zu einer pSTAT3<sup>S727</sup> abhängigen ATP Generierung in kultivierten Motoneuronen führt.

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden wildtypische und *pnn* mutierte Motoneuronen über einen Zeitraum von 5 DIV in Gegenwart von BDNF oder einer Kombination von BDNF und CNTF kultiviert. Anschließend wurden Motoneurone die mit BDNF kultiviert wurden, für 15 oder 30 min mit CNTF [10 ng/ml] behandelt und während dessen mit MitoTracker Red CMXRos (CMXRos) inkubiert. CMXRos akkumuliert, abhängig vom  $\Psi_{\text{mito}}$ , in der Mitochondrienmembran wodurch die Fluoreszenzintensität steigt. Durch die Fixierung in 4 % PFA sollte nachfolgend die Lokalisation von pSTAT3<sup>S727</sup> immunzytochemisch nachgewiesen werden.

Die CMXRos Fluoreszenzintensitäten in Mitochondrien wildtypischer Motoneurone, die für jeweils 5 DIV in Gegenwart von BDNF oder BDNF und CNTF gehalten wurden, waren nicht verschieden. Jedoch zeigte die akute Gabe von CNTF [10 ng/ml] für 15 und 30 min während der Farbstoffinkubation einen signifikanten Anstieg in der Fluoreszenzintensität gegenüber Kulturen, die chronisch mit CNTF behandelt wurden (Abb. 28 A). In Mitochondrien *pnn* mutierter Motoneuronen induzierte CNTF schon bei chronischer Inkubation einen Fluoreszenzanstieg von CMXRos (Abb.28 A). Eine weitere Fluoreszenzintensitätssteigerung von CMXRos konnte für die akute Applikation von CNTF für 15 bzw. 30 min nicht detektiert werden.

Im Anschluss sollte untersucht werden, ob die CNTF abhängige Fluoreszenzintensitätssteigerung von CMXRos mit einer verstärkten Kolokalisation von pSTAT3<sup>S727</sup> mit Mitochondrien einhergeht. Hierfür wurden wie o.g. *pnn* mutierte und wildtypische Motoneurone mit CMXRos in Ab- bzw. Anwesenheit von CNTF kultiviert, anschließend fixiert und gegen pSTAT3<sup>S727</sup> (Cell signaling, 9134) immunzytochemisch gefärbt. In konfokalen Zweikanalaufnahmen (pSTAT3<sup>S727</sup>= Cy2, CMXRos = rot) wurde untersucht, wie viel pSTAT3<sup>S727</sup> unter der jeweiligen Bedingung mit Mitochondrien kolokalisiert (Abb. 28 B). Die CNTF Applikation für die gesamte Kulturdauer von 5 Tagen als auch die akute Gabe von 15 bzw. 30 min steigerte den Grad der Kolokalisation von

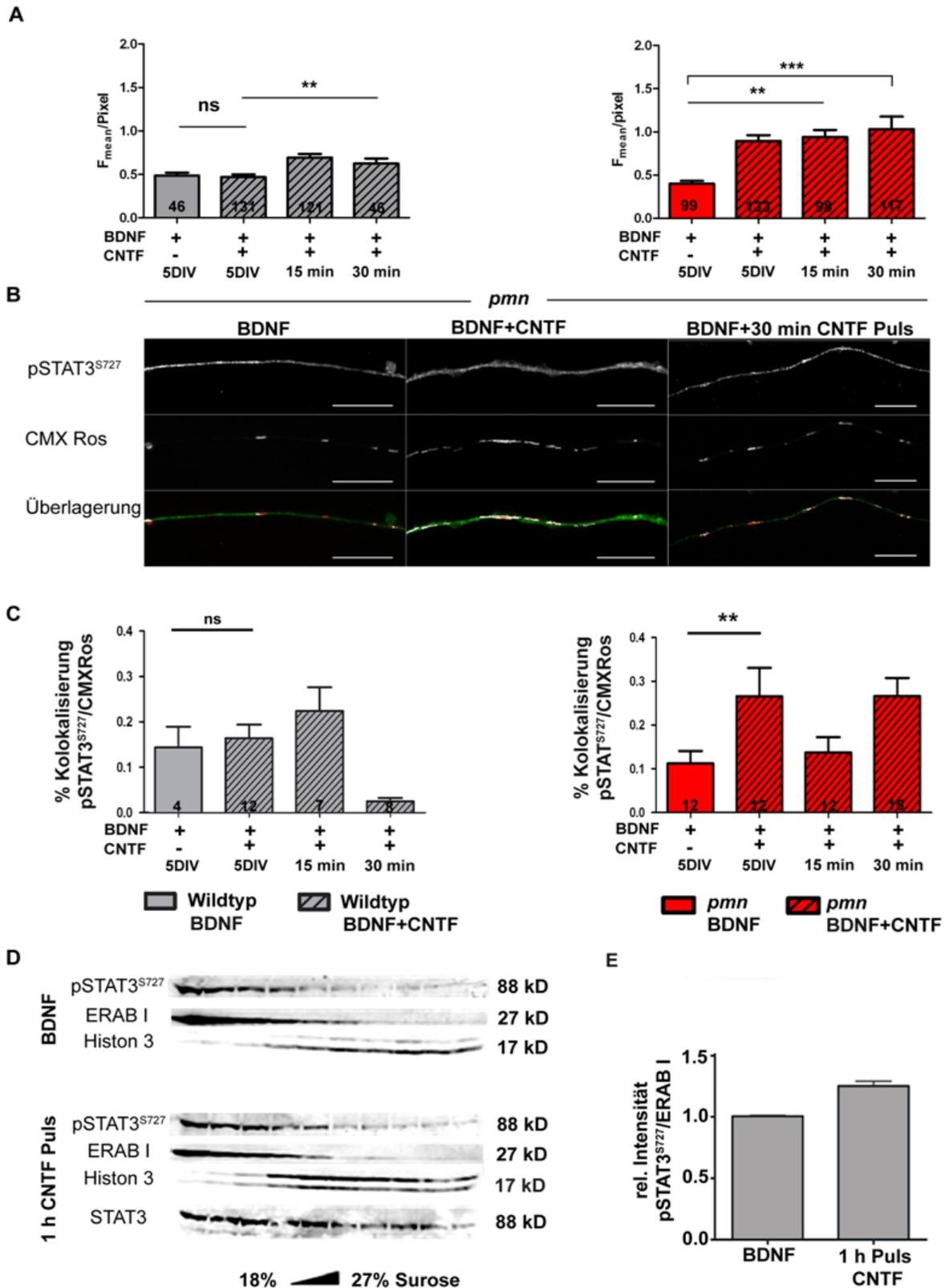
## Ergebnisse

pSTAT3<sup>S727</sup> in Mitochondrien nicht. In *pnn* mutierten Motoneuronen hingegen war eine gesteigerte Kollokalisierung zu sehen, wenn *pnn* mutierte Motoneurone für 5 DIV mit CNTF behandelt wurden (Abb. 28 B und C).

Da der immunzytochemische Nachweis der Kollokalisierung nicht eindeutig war, sollte der Grad der Kofraktionierung im Westernblot untersucht werden. Hierzu wurden wildtypische Motoneurone (CD-1) aus dem lumbalen Rückenmark von 60-80 Embryonen (E13 - E14) isoliert und für einen Zeitraum von 4 DIV in Gegenwart von BDNF kultiviert. Nach 4 DIV wurde den Kulturen über Nacht das Serum entzogen (NB-Medium + Glx + 2 % B27), um sämtliche, eventuell auftretenden, serumabhängigen Phosphorylierungen von STAT3 auf ein Minimum zu reduzieren. Anschließend wurde eine dieser Kultur mit einem CNTF-Puls von 1 h [10 ng/ml] behandelt. Beide Kulturbedingungen wurden danach zeitgleich lysiert und auf einen Sucrose-Gradienten aufgetragen. Der Westernblot zeigt die Separierung der mitochondrialen (ERAB I) und nukleären Fraktion (Histon 3) nach Ultrazentrifugation. Für die Quantifizierung von pSTAT3<sup>S727</sup> im Westernblot wurde das pSTAT3-Signal auf das ERAB I-Signal normalisiert. Dadurch konnte ein ca. 30 prozentiger Anstieg von pSTAT3<sup>S727</sup> in der mitochondrialen Fraktionen nach CNTF-Gabe nachgewiesen werden (Abb. 28 E).

Diese Ergebnisse stützen die Annahme, dass STAT3 in Motoneuronen eine mitochondriale Funktion besitzt und dass CNTF zu einer verstärkten Interaktion von pSTAT3<sup>S727</sup> mit Mitochondrien führt, wahrscheinlich mit der Funktion, deren Aktivität zu steuern.

# Ergebnisse



**Abbildung 28: Mitochondrien und pSTAT3<sup>S727</sup> kolokalisieren in isolierten Motoneuronen. A-B)** Quantifizierung der Fluoreszenzintensität von MitoTracker RedCMXRos (CMXRos, 75 nM) in Mitochondrien kultivierter *pmn* Motoneurone in Abhängigkeit von CNTF. Zahlen in den Balken repräsentieren die Anzahl der untersuchten Mitochondrien; n = 2 unabhängige Experimente, Daten repräsentieren den Mittelwert mit S.E.M., Statistische Analyse: Kruskal-Wallis mit Dunns multiple comparison test. **B)** Repräsentative Konfokale Fluoreszenzaufnahmen von pSTAT3<sup>S727</sup> (Cy2) und CMXRos (Emission: 595 – 630 nm). Im Überlagerungsbild sind die kolokalisierten Pixel in „weiß“ hervorgehoben. Maßstabsbalken: 10 μm. **C)** Die Kolokalisierungsstudie

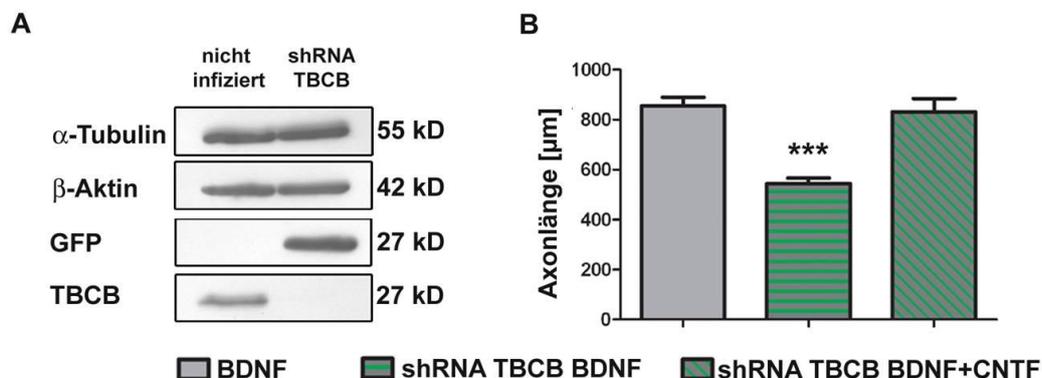
## Ergebnisse

wurde mit ImageJ plugin „Colocalization finder“ durchgeführt. Quantifizierung der Kolokalisierung von pSTAT3<sup>5727</sup> (Cell signalling 9134) und CMXRos. Zahlen in den Balken repräsentieren die Anzahl der untersuchten Zellen. n = 3 unabhängige Experimente, Statistische Analyse: ns (nicht signifikant; P>0,05), \*\*P < 0.01, two tailed t-Test. **D**) Mitochondriale Fraktionierung aus Lysaten von BDNF bzw. CNTF gepulsten Motoneuronen nach 5 DIV. Westernblot zeigt eine pSTAT3<sup>5727</sup> Anreicherung in der mitochondrialen Fraktion (ERAB I) und der nukleären Fraktion (Histon als Marker 3). **E**) Quantifizierung der pSTAT3<sup>5727</sup> Intensität normalisiert auf ERAB I. Quantifizierung beruht auf 3 unabhängigen Experimenten.

### 6.2.7 CNTF rettet das reduziertes Axonwachstum primärer Motoneurone bei TBCB Knock down

Das Tubulinspezifische Chaperon B (TBCB) ist neben TBCE das zweite Chaperon, das zur korrekten Faltung von  $\alpha$ -Tubulin beiträgt (Tian et al. 1996; Tian et al. 1997; Tian et al. 1999). Es konnte gezeigt werden, dass TBCE und TBCB nicht nur eine Funktion bei der  $\alpha/\beta$ -Tubulin Heterodimerisierung haben, sondern auch die dynamische Instabilität der Mikrotubuli durch die Tubulinheterodimer-Dissoziation beeinflussen (Tian et al. 1999). Es könnte also sein, dass durch die shRNA vermittelte Reduzierung von TBCB die Tubulin-Heterodimerisierung vermindert wird und dadurch ein *pnm* ähnlicher Phänotyp *in vitro* entsteht.

Um die Auswirkung eines TBCB knock-down sowohl im Westenblot als auch mittels Fluoreszenzmikroskopie zu verifizieren, wurde die shRNA gegen TBCB (Vadlamudi et al. 2005) in einen lentiviralen Vektor kloniert, der zusätzlich GFP exprimiert. Primäre wildtypische Motoneuronen wurden vor Ausplattieren lentiviral mit spezifischer TBCB shRNA transduziert und für einen Zeitraum von 5 DIV in Gegenwart von BDNF [5 ng/ml] kultiviert.



**Abbildung 29: CNTF rettet das axonale Wachstumsdefizit Motoneuronen mit TBCB knock down.** **A**) Westernblot Analyse von lentiviral transduzierten Motoneuronen nach 5 DIV [5 ng/ml]. Als TBCB unabhängige Ladekontrolle wurde  $\beta$ -Aktin mitgeführt. **B**) Auswirkung der shRNA vermittelten TBCB Reduzierung auf das Axonwachstum. Quantifizierung der Axonlängen von kultivierten Motoneuronen nach 7DIV. n = 3 unabhängige Experimente, Statistische Analyse: \*\*\*P < 0.001, Kuskal-Wallis mit Dunns multiple comparisonstest.

## Ergebnisse

Die Untersuchung von Motoneuronenlysaten im Westernblot zeigt, dass durch ein stark reduziertes Level von TBCB die Mengen von  $\alpha$ -Tubulin nicht beeinflusst sind (Abb 29 A).

Die Quantifizierung der Axonlänge GFP positiver Motoneurone zeigt jedoch, dass der knock-down von TBCB zu einer signifikant reduzierten Axonlänge nach 7 DIV führt. Interessanter Weise, rettet die Applikation von CNTF das durch TBCB-knock-down induzierte, axonale Wachstumsdefizit in primären Motoneuronen (Abb. 29 B).

Dieses Ergebnis lässt die vage Vermutung zu, dass die CNTF abhängige Aufrechterhaltung von Motoraxonen *in vitro* weitaus universeller wirkt, als von Seiten der *pnn* spezifischen TBCE Mutation her anzunehmen ist.

## 7. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie CNTF erhaltend auf Axone *pnm* mutierten Motoneuronen wirkt, während BDNF und GDNF zwar das Überleben von Motoneuronen unterstützen, im Gegensatz zu CNTF jedoch nicht in der Lage sind die Axondegeneration in diesem Mausmodell zu verhindern. Die Ursache der Motoneuronopathie in der *pnm*-Mause liegt in einer Punktmutation im Tubulin spezifischen Chaperon E (Tbce) Gen (Bommel et al. 2002; Martin et al. 2002). TBCE ist eines von fünf Tubulin spezifischen Chaperonen (TBCE - TBCE) die für die  $\alpha/\beta$ -Heterodimerisierung von Tubulin verantwortlich und für die funktionelle Bildung von Mikrotubuli (MT) essentiell sind.

In dieser Arbeit konnten ich zeigen, dass STAT3 durch CNTF aktiviert aber überraschenderweise anschließend nicht retrograd in Richtung Nukleus transportiert wird. Stattdessen interagiert STAT3 lokal mit dem MT destabilisierenden Protein Stathmin, das  $\alpha/\beta$ -Tubulinheterodimere bindet (Ng et al. 2006b). Durch die Interaktion von STAT3 mit Stathmin werden Stathmin gebundene  $\alpha/\beta$ -Tubulinheterodimere freigesetzt und stehen zum „Self-Assembly“ an Mikrotubuli bereit, wodurch axonale Schwellungen reduziert werden und das Axonwachstum auf ein wildtypisches Niveau gesteigert wird.

Des Weiteren konnte ich zeigen werden, dass die CNTF abhängige Stabilisierung der Mikrotubuli das anterograde sowie retrograde Transportdefizit von axonalen Mitochondrien *pnm* mutierter Motoneurone behebt. CNTF erhöht darüber hinaus das mitochondriale Membranpotential von anterograd sowie retrograd transportierten axonalen Mitochondrien und führt vermutlich zur pSTAT3<sup>S727</sup>-abhängigen zu einer Steigerung der ATP Synthese in primären Motoneuronen.

### 7.1 Die differentielle Wirkung von CNTF auf Axone

Es ist seit längerem bekannt, dass die neurotrophen Faktoren BDNF, GDNF und CNTF das Überleben von Motoneuronen *in vivo* und *in vitro* unterstützen (Sendtner, et al. 1992a; Henderson et al. 1994; Sendtner et al. 1991; Sendtner, et al. 1992b). *In vitro* wird das Überleben bspw. über den PI3K/Akt und den ERK/MAPK Singalweg vermittelt (Soler et al. 1999; Dolcet et al. 1999; Dolcet et al. 2001; Besset et al. 2000; Heinrich et al. 2003). Beide Signalkaskaden können durch BDNF, GDNF und CNTF direkt bzw. indirekt über Ras/Raf Kinasen aktiviert werden (Wiese et al. 2001). Diese Erkenntnis findet sich durch den Nachweis bestätigt, dass die neurotrophen Faktoren GDNF, BDNF und CNTF hinsichtlich ihres Potentials, das Überleben kultivierter Motoneurone zu unterstützen, vergleichbar sind.

## Diskussion

Und des Weiteren dadurch, dass die Kombination dieser Faktoren das Überleben *in vitro* nicht weiter steigern kann (Abb. 1) (Selvaraj et al. 2012).

In der *pnn-Maus* kann jedoch allein durch die bcl-2 oder GDNF abhängige Vermittlung anti-apoptotischer Signale weder die Axondegeneration aufgehalten noch das retrograde Transportdefizit in spinalen Motoneuronen behoben werden (Sagot et al. 1996; Yves Sagot et al. 1998). Die CNTF-Behandlung von *pnn* Mäusen führt dagegen zum verzögerten Krankheitsbeginn und einem längeren Überleben (Sendtner, et al. 1992b; Sendtner et al. 1997). CNTF ist in seiner Wirkung als neurotropher Faktor von STAT3 abhängig, wohingegen BDNF und GDNF auch bei STAT3 Defizienz das Überleben von axotomierten Motoneuronen verbessern (Schweizer et al. 2002). Die besondere Wirkung von CNTF auf Motoraxone wird am Beispiel der *Smn<sup>+/-</sup>* Maus, einem Model für Typ III SMA deutlich. In dieser Maus löst CNTF aus myelinisierenden Schwann-Zellen die Verzweigung von Axonen und Neubildung neuromuskulärer Synapsen an denervierten Muskelfasern aus, wodurch der frühe Verlust von Motoneuronen kompensiert wird, bevor der klinische Phänotyp in Erscheinung tritt, ein Prozess der im Englischen auch als „sprouting“ bezeichnet wird (Simon et al. 2010).

Zu Beginn dieser Untersuchungen konnte wir ich feststellen, dass CNTF nicht aber GDNF oder BDNF *in vitro* axonale Schwellungen reduzieren und das Axonwachstum von primären *pnn* mutierten Motoneuronen auf wildtpische Level steigern kann (Selvaraj et al. 2012). Wie CNTF diese Wirkung entfaltet soll im Folgenden diskutiert werden.

### 7.2 CNTF wirkt über STAT3 auf die Erhaltung von Axonen

Es konnte bereits gezeigt werden, dass in Neuronen CNTF über den Heterotrimeren-Rezeptorkomplex, bestehend aus gp130, LIFR $\beta$  und CNTFR $\alpha$  (Davis et al. 1993), die Tyrosin-Kinaseaktivität der gp130-Rezeptor assoziierten Januskinasen induziert wird. Ist dieser Rezeptorteil phosphoryliert, kann er durch die Rekrutierung von Gbr2/SOS Ras/Raf Kinasen abhängige Signalwege aktivieren, die das Überleben von primären Neuronen ähnlich wie BDNF oder GDNF unterstützen (Wiese et al. 2001; Frebel & Wiese 2006). Auf Grund der o.g. Unterschiede scheinen jedoch Ras/Raf abhängige Signalwege nicht für die differentielle Wirkung von CNTF auf Axone verantwortlich zu sein.

In vorangegangenen Arbeiten wurden Mäuse mit einer motoneuronenspezifischen Ablation von Stat3 (*STAT3<sup>fllox/KO</sup>;NFL-Cre<sup>tg</sup>*) erzeugt (K Takeda et al. 1997; Takeda et al. 1998; Schweizer et al. 2002), um die Bedeutung von STAT3 für das Überleben von Motoneuronen nach Nervenläsion zu untersuchen. Mäuse mit motoneuronenspezifischer STAT3-Defizienz

## Diskussion

sind klinisch unauffällig und das Überleben von embryonalen spinalen Motoneurone ist während der Phase des natürlichen Zelltods nicht reduziert. Im adulten Tier jedoch, wird nach Läsionen STAT3 zur Übertragung von Überlebenssignalen (Schweizer et al. 2002) und zur Regeneration von Axonen benötigt (Bareyre et al. 2011). Diese Untersuchungen konnten aber nicht klären, ob die STAT3 abhängigen Signalwege identisch sind, die einerseits zum Überleben und andererseits zur Axonregeneration führen.

Die bisherigen Befunde zur STAT3 abhängigen Aufrechterhaltung von Motoneuronen und deren Axone basieren auf Läsionsexperimenten. Zellautonome pathologische Veränderung, die als Konsequenz den Verlust von Neuromuskulären Synapsen und das retrograde Absterben von Axonen haben, können so nicht immer nachgebildet werden.

Die hier vorgestellten Untersuchungen von primären *pnn* mutierten und *Stat3* ablatierten Motoneuronen ( $STAT3^{KO/flox} / NFL-Cre^{tg} / pnn^{-/-}$ ) zeigen, dass das CNTF bedingte Axonwachstum auch in unverletzten jedoch degenerierenden Motoneuronen von STAT3 abhängt (Abb.16 und 17) (Selvaraj et al. 2012).

### 7.3 STAT3 wirkt lokal im Axon von *pnn* mutierten Motoneuronen

Führt die Gabe von CNTF *in vitro*, konform der „signaling endosome“-Theorie, zum retrograden Transport von axonalem STAT3 und anschließender STAT3 abhängiger Transkriptionsinduktion?

Die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung zur axonalen Mobilität von STAT-EYFP in kultivierten Motoneuronen zeigt, dass STAT3 nach CNTF-Applikation nicht durch MT abhängigen retrograden Transport in den Zellkern gelangt, um die Tanskription von Zielgenen zu induzieren (Abb.11 - 15). Dieser Befund wird durch biochemische Daten gestützt, welche die CNTF-Puls abhängige STAT Phosphorylierung an Y705 (pSTAT3<sup>Y705</sup>) im Zytoplasma nicht aber im Nukleus zeigen (Selvaraj et al. 2012). Eine durch diese Erkenntnis nahegelegte zytoplasmatische Funktion von pSTAT3<sup>Y705</sup> könnte einen alternativen Signalweg von CNTF vermittelten STAT3 Effekten darstellen, der in *pnn* mutierten Motoraxonen die degenerativen Prozesse lindert.

Im Gegensatz zu den hier vorgestellten Ergebnissen konnte eine Arbeit an Läsionsmodellen zeigen, dass axonale Stat3-mRNA existiert, die als Antwort auf eine Läsion und den dadurch ausgelösten Ca<sup>2+</sup>-Einstrom translatiert wird. Axonal translatiertes STAT3 wird anschließend an Tyrosin 705 phosphoryliert und kann dardurch pSTAT3<sup>Y705</sup> abhängig von Dynein retrograd in den Nukleus translozieren (Ben-Yaakov et al. 2012), vermutlich um dort zur

## Diskussion

Hochregulierung von anti-apoptischen Proteinen wie Bcl-xL und Reg-2 beizutragen (Nishimune et al. 2000; Schweizer et al. 2002).

Trotz der Gegenwart von unspezifischen (Actinomycin D) und STAT3 spezifischen (Galiellalactone) pharmakologischen Transkriptionsblockern kann das CNTF abhängige Axonwachstum in *pnn* mutierten Motoneuronen aufrechterhalten werden. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, wonach pSTAT3<sup>Y705</sup> in *pnn* mutierten Motoneuronen einen Transkriptionsunabhängigen Signalweg zur Stabilisierung von Axonen nutzt (Abb. 13 -15).

Die lentivirale Überexpression von fluoreszenzmarkiertem wildtypischem STAT3, dominant negativen (STAT3<sup>Y705F</sup>-EYFP) sowie transkriptionsinaktiven (STAT3<sup>EE-AA</sup>-EYFP) Isoformen in konditionell *Stat3* ablatierten *pnn* mutierten Motoneuronen (STAT3<sup>KO/flox</sup> / NFL-Cre<sup>tg</sup> / *pnn*<sup>-/-</sup>) zeigt, dass die CNTF induzierte Phosphorylierung von STAT3 an Y705 zur Unterstützung des Axonwachstums notwendig und ausreichend ist (Abb. 16 und 17b). Klar ist damit, dass die transkriptionsunabhängige Wirkung vermutlich über den JAK/STAT - Signalweg vermittelt wird. Ob eine CNTF induzierte Ras/Raf- Kinasen abhängige Serin-Phosphorylierung von STAT3 (pSTAT<sup>S727</sup>) in Motoneuronen zu synergistischen aber transkriptionsunabhängigen Effekten führt, die degenerativen Entwicklungen in Axonen von *pnn* mutierten Motoneuronen entgegen wirken, muss noch gezeigt werden.

Aus den bisherigen Beobachtungen dieser Arbeit scheint eine BDNF-TrkB abhängige Aktivierung von STAT3 z.B. durch die Phosphorylierung an Serin 727 (Ng et al. 2006a) nicht für die Aufrechterhaltung von Axonen in *pnn* mutierten Motoneuronen notwendig zu sein.

Die Beobachtung, dass STAT3 defiziente *pnn* mutierte Motoneurone mit Überexpression von wildtypischem STAT3-EYFP auch in Abwesenheit von CNTF längere Axone entwickeln, legt die Vermutung nahe, dass es eine kritische Konzentration von STAT3 im Axon von Motoneuronen gibt auch wenn diese nur teilweise die Funktion von pSTAT3<sup>Y705</sup> erfüllt (Abb. 17b) Dies widerspräche der Hypothese, wonach STAT3 erst postnatal in Motoneuronen benötigt wird, um das Überleben die Regeneration von Axonen nach Läsion zu unterstützen (Schweizer et al. 2002; Bareyre et al. 2011).

### 7.4 Die lokale axonale Wirkung von STAT3 basiert auf der Interaktion mit Stathmin

Ein Ziel von zytoplasmatisch vorliegendem pSTAT3<sup>Y705</sup> könnte das MT destabilisierende Protein Stathmin sein (Ng et al. 2006b; Verma et al. 2009). Stathmin ist ein MT destabilisierendes Protein, das freie  $\alpha/\beta$ -Tubulin Heterodimere bindet (T2S-Komplex) und dadurch den Pool frei verfügbarer Tubulin-Heterodimere für die MT-Polymerisierung reduziert (Amayed et al. 2002). Die Kontrolle der Stathmin-Aktivität ist für die Entwicklung von Axonen bedeutend. Dies wird deutlich durch die DOCK7 abhängige Aktivität von Rac GTPasen im Axon, welche die inaktivierende Phosphorylierung von Stathmin auslösen und so die Differenzierung von Axonen in hippokampalen Neuronen unterstützt (Watabe-Uchida et al. 2006). Oder durch die BDNF induzierte Expression von MAP kinase phosphatase-1 (MKP-1), die zur räumlich-zeitlichen Inaktivierung der c-jun N-terminal kinase (JNK) führt und so die deaktivierende Phosphorylierung von Stathmin verhindert, wodurch axonale Verzweigungen entstehen (Jeanneteau et al. 2010).

Die Kollokalisierung von STAT3 und Stathmin in primären embryonalen Motoneuronen zeigt die Anwesenheit beider Proteine in subzellulären Kompartimenten, die mit einer hohen MT-Dynamik in Verbindung stehen (Kalil & Dent 2005), nämlich im Wachstumskegeln und axonalen Abzweigungen (Abb. 18). Die vorliegende Arbeit zeigt, dass durch den shRNA vermittelten knock-down von Stathmin in primären *pnn* mutierten Motoneuronen das Axonwachstum auf wildtypisches Niveau gesteigert werden kann. Jedoch zeigt die Kombination einer CNTF-Behandlung mit einem Stathmin knock-down in *pnn* mutierten Motoneuronen keine weitere Steigerung des Axonwachstums im Vergleich zu *pnn* mutierten Motoneuronen die ausschließlich mit CNTF behandelt wurden oder ein reduziertes Stathmin-Level zeigen (Abb.19). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass Stathmin ein Ziel der CNTF – STAT3 Signalkaskade in *pnn* mutierten Motoneuronen ist, und dass die MT-Polymerisation durch eine weitere Steigerung polymerisierungskompetenter  $\alpha/\beta$ -Tubulinheterodimere scheinbar nicht weiter gesteigert werden kann. Vermutlich weil andere die MT- Dynamik kontrollierende Proteine eingreifen, wie für Cytoplasmic linker associated protein 2 (CLASP2) gezeigt, das in Wachstumskegeln glycogen synthase kinase 3  $\beta$  (GSK3 $\beta$ ) abhängig durch Phosphorylierung inaktiviert wird und das Axonwachstum von kortikalen Neuronen reguliert (Hur et al. 2011).

Des Weiteren konnte durch CNTF-Gabe die direkte Interaktion von pSTAT3<sup>Y705</sup> mit Stathmin verstärkt werden, wie durch Co-Immunopräzipitation gezeigt (Selvaraj et al. 2012). Diese Befunde sind aus therapeutischer Sicht interessant, da in Motoneuronen von SMN<sup>-/-</sup>;SNM2<sup>tg</sup>

## Diskussion

Mäusen, einem Model für Typ III SMA, Stathmin im Vergleich zu wildtypischen Kontrollen hochreguliert ist und dadurch Dichte von MT in *N. phrenicus* abnimmt (Wen et al. 2010). Heterozygot Stathmin defiziente SMA ähnlichen Mäuse (SMA-Stmn<sup>+/-</sup>) zeigen eine verbesserte Motoraktivität und mehr reife neuromuskuläre Endplatten als SMA-ähnliche Tiere ohne Stathmin knock-out (SMA-Stmn<sup>+/+</sup>) oder homozygot Stathmin defiziente (SMA-Stmn<sup>-/-</sup>) Tiere. Interessanter Weise überleben SMA-Stmn<sup>+/-</sup> Mäuse trotz der positiven Wirkung reduzierter Stathmin-Level auf Motoneurone nicht länger, vermutlich wegen Versagen anderer Organe (Wen et al. 2013). Diese *in vivo* Daten legen die Vermutung nahe, dass die Existenz eines Pools Stathmin gebundener  $\alpha/\beta$ - Tubulinheterodimere zur sensiblen Regulierung der MT-Dynamik wichtig ist, um z.B. Tubulinheterodimere auch vor der degradierenden Wirkung anderer Proteine wie bspw. TBCE und TBCB zu schützen (Kortazar et al. 2007).

Durch die Überexpression eines Fluoreszenz markierten MT „plus end binding protein“ 1 oder 3 (EB1 und EB3) in *pnn* mutierten Motoneuronen wäre es möglich in live imaging Experimenten die Dynamik und den Entstehungsort axonaler Mikrotubuli zu verfolgen. Dieses Experiment könnte zeigen, ob in primären *pnn* mutierten Motoneuronen 1) proximal, intermedial und distal eine geringer Anzahl von MT gebildet werden als im Wildtyp (EB1), 2) ob in *pnn* mutierten Motoneuronen in Gegenwart von BDNF axonale MT nicht mehr linear Polymersisieren sondern gekrümmt „wachsen“ und die Ursache von axonalen Schwellungen sind (Ertürk et al. 2007), 3) ob die Turn-over Rate von MT durch die CNTF-STAT3-Stathmin Signalkaskade zugunsten der MT Polymerisation verschoben wird oder bestehende MT weniger destabilisiert werden (EB1) 4) ob das Auswachsen von distalen MT in die Peripherie von Wachstumskegeln durch die akute lokale Applikation von CNTF, Cardiotrophin-1 (CT-1) oder BDNF beeinflusst wird und 5) ob durch ein evtl. zu geringes Auswachsen der MT in den Wachstumskegel die Interaktion mit Aktin gestört ist. Letzteres könnte einen Hinweis darauf geben, wieso *in vivo* während der frühen postnatalen Wachstumsphase, in der CNTF noch nicht in ausreichenden Mengen exprimiert wird (Sendtner et al. 1997b), bereits bestehende neuromuskuläre Kontakte in Mäusen abreißen können. Im Vergleich zu CNTF wird CT-1, ein von Skelettmuskeln sezernierter neurotropher Faktor (Pennica et al 1996) und Ligand des heterodimeren gp130/LIFR $\beta$  Rezeptors, bereits embryonal exprimiert und ist notwendig für das Überleben von embryonalen Motoneuronen. Da CT-1 STAT3 unabhängige Signalwege durch die Aktivierung von gp130/LIFR $\beta$  induzieren kann (Oppenheim et al. 2001), könnte ein solcher Versuch helfen, zu erfahren ob die Stabilisierung des MT-Skeletts embryonal bzw. in frühen postnatalen Phasen über die gp130 abhängige Phosphorylierung von JAK kontrolliert

## Diskussion

wird und von der inaktivierenden Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung MT bindender Proteine abhängig ist.

### **7.5 Die CNTF induzierte pSTAT3Y705 – abhängige Interaktion mit Stathmin stabilisiert Mikrotubuli in *pnn* mutierten Motoneuronen**

Ein direkter Nachweis, dass CNTF STAT3 abhängig das MT-Skelett stabilisiert, gelang mit der Untersuchung der MT-Polymerisation in STAT3 defizienten *pnn* mutierten Motoneuronen, die Bhuvaneish Thangraj Selvaraj und ich in Zusammenarbeit durchgeführt habe. Die Inkubation primärer *pnn* mutierter STAT3 defizienter Motoneuronen in Gegenwart der MT-destabilisierenden Substanz Nocodazol führt nicht nur zu kürzeren MT sondern auch zu einer geringeren Anzahl von neu gebildeten MT nach dem Auswaschen von Nocodazol. Während die geringere Dichte und die reduzierte Länge von MT in *pnn* mutierten Motoneuronen durch 5 minütige Inkubation mit CNTF auf wildtypische Level gesteigert werden kann, bleibt dieser Effekt bei STAT3 Defizienz aus (Selvaraj et al. 2012). Aufgrund des schnellen experimentellen Ablaufs ist anzunehmen, dass weder transkriptionale noch translationale Effekte die MT-Polymerisation beeinflussen. Bedauerlicher Weise war es nicht möglich den Versuch mit primären Stathmin defizienten Motoneuronen zu wiederholen (Wen et al. 2010), um in diesem Versuch zur MT-Polymerisation zu zeigen, dass die STAT3 abhängige Wirkung von CNTF vergleichbar ist mit dem Verlust der Stathmin-Aktivität.

Der knock-down von TBCB, dem zweiten Tubulin spezifischen Chaperon, das für die richtige Assemblierung von  $\alpha$ -Tubulin notwendig ist, reicht aus, um in primären wildtypischen Motoneuronen ein verkürztes Axonwachstum zu induzieren. Die Gabe von CNTF führt auch in diesem Szenario zur Wiederherstellung eines wildtypischen Axonwachstum. Dieses Ergebnis unterstützt die Hypothese, dass die *pnn*-Mutation eine „Erkrankung des MT-Zytoskeletts“ verursacht, die sich primär in stark polarisierten Zellen wie den Motoneuronen bemerkbar macht.

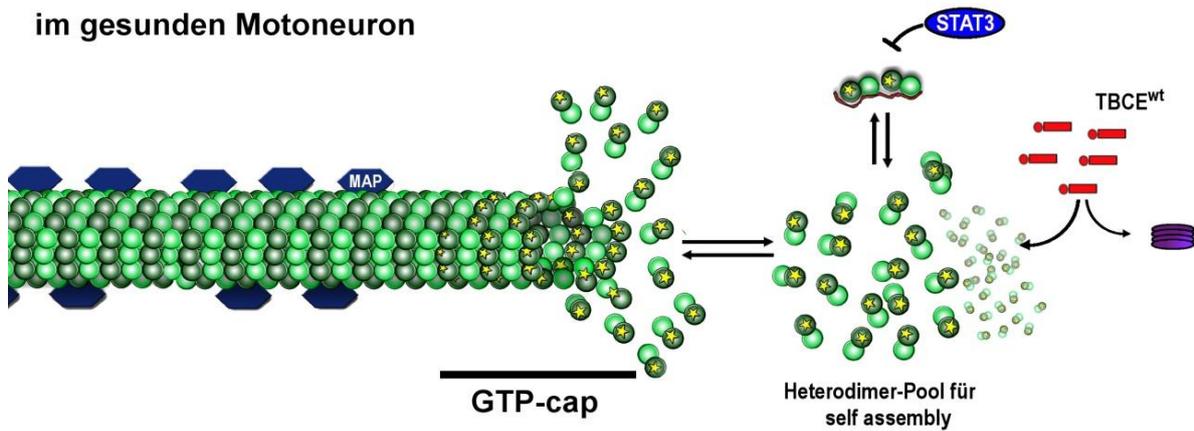
## Diskussion

Aus den bisherigen eigenen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass

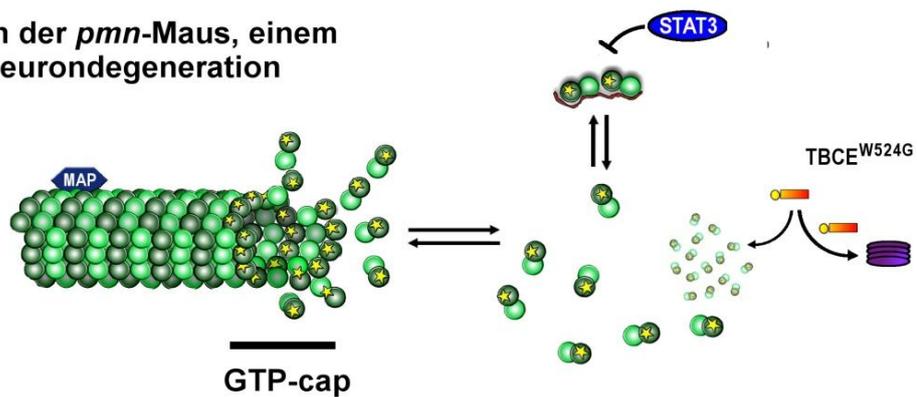
- I. in *pnn*-mutierten Motoneuronen aufgrund der geringeren Stabilität von TBCE<sup>W524G</sup> ein reduzierter Pool von  $\alpha/\beta$ -Tubulinheterodimeren zur MT-Polymerisation besteht und daher eine geringere Dichte von MT in peripheren Nerven der *pnn*-Maus nachweisbar ist und primäre *pnn* mutierte Motoneurone daher ein reduziertes Axonwachstum und evtl. axonale Schwellungen (Bommel et al. 2002; Martin et al. 2002; Schaefer et al. 2007; Selvaraj et al. 2012) zeigen.
- II. dass der neurotrophe Faktor CNTF die Affinität von STAT3 zum MT destabilisierenden Protein Stathmin erhöht, welches in Folge dieser Interaktion zwei gebundene  $\alpha/\beta$ -Heterodimere aus dem T2S freisetzt. Ein Prozess der zum Erreichen der kritischen Konzentration freier polymerisierungskompetenter  $\alpha/\beta$ -Heterodimere führt und so das „Self Assembly“ unter Aufrechterhaltung eines stabilisierenden GTP-caps ermöglicht (Selvaraj et al. 2012; Amayed et al. 2002).

# Diskussion

im gesunden Motoneuron



in Motoneuronen der *pmn*-Maus, einem Model für Motoneurondegeneration



in *pmn* mutierten Motoneuronen nach CNTF Applikation

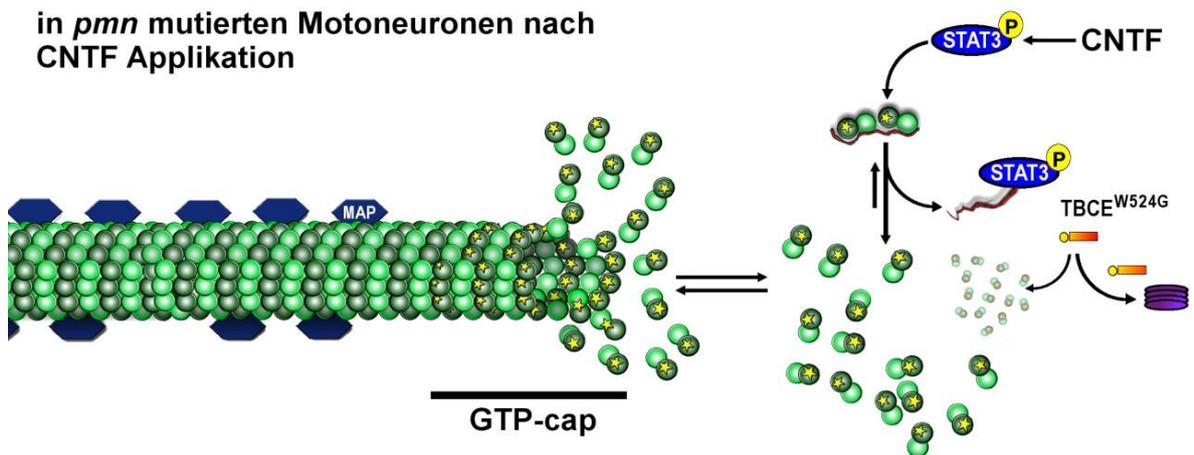


Abbildung 30: In Axonen von gesunden Motoneuronen trägt TBCE<sup>wt</sup> dazu bei, dass ausreichend  $\alpha/\beta$  Heterodimere zur MT Polymerisation gebildet werden. Ausgelöst durch instabileres TBCE (TBCE<sup>W524G</sup>) werden in *pmn* mutierten Motoneuronen weniger polymerisierungskompetente  $\alpha/\beta$  Heterodimere synthetisiert. Das stabilisierende GTP-cap schrumpft und die dynamische Instabilität wird in Richtung Depolymerisation verschoben – es bilden sich kürzere MT. In Axonen *pmn* mutierter Motoneurone führt die

## Diskussion

CNTF induzierte pSTAT3<sup>Y705</sup> Interaktion mit dem MT destabilisierenden Protein Stathmin zur Freisetzung von  $\alpha/\beta$ -Tubulinheterodimeren aus dem T2S-Komplex. Dadurch wird die kritische Heterodimerkonzentration zur MT Polymerisation im Axon von *pnn* mutierten Motoneuronen erreicht. Die MT können ein stabilisierendes GTP-cap ausbilden und stabilisierende PMTs wie Detyrosinierung und Acetylierung können stattfinden. MT assoziierte Proteine (MAP) vermitteln weitere Stabilität. Bei der Bindung von Stathmin liegt pSTAT3<sup>Y705</sup> vermutlich als Monomer und nicht als Dimer vor (Horvath et al. 1995).

### 7.8 Axonaler Mitochondrientransport in *pnn* mutierten Motoneuronen

#### 7.8.1 CNTF und der knock-down von Stathmin beheben das axonale Transportdefizit in *pnn* mutierten Motoneuronen

Störungen im MT abhängigen anterograden und retrograden Transport sind ein gemeinsames und frühes Merkmal vieler neurodegenerativer Erkrankungen im Mensch und Mausmodellen für neurodegenerative Erkrankungen (De Vos et al. 2008). Es galt daher zu prüfen, ob es in *pnn* mutierten Motoraxonen zu Veränderungen im axonalen MT abhängigen Transport kommt und dies Grund für die mit Organellen gefüllten axonalen Schwellungen ist. Durch die Untersuchung der axonalen Mobilität von Mitochondrien konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sich die Anzahl axonaler Mitochondrien in *pnn* mutierten Motoneuronen nicht von der in wildtypischen Kontrollen unterscheidet (Abb.22 C und 23 B). Primäre *pnn* mutierte Motoneurone zeigen eine signifikante Abnahme der anterograden und eine tendenziell verringerte retrograde Transportgeschwindigkeit von axonalen Mitochondrien gegenüber wildtypischen Kontrollen in Gegenwart von BDNF. Dieser Unterschied kommt vermutlich daher zustande, dass Mitochondrien während des axonalen Langstreckentransports am Ende eines MT auf ein anderes wechseln müssen. Da *pnn* mutierte Motoneurone eine geringere Dichte von MT aufweisen (Schaefer et al. 2007), kann vermutet werden, dass der Wechsel von einer MT-Spur auf die nächste relativ verlangsamt abläuft oder evtl. häufiger nötig ist, weil kürzere axonale MT vorliegen (Selvaraj et al. 2012). Dass auch die Transportrate von axonalen Mitochondrien *pnn* mutierter Motoneurone in anterograder und retrograder Richtung in Gegenwart von BDNF signifikant reduziert ist, unterstützt die Hypothese eines reduzierten Transports auf Grund kürzerer MT (Abb. 22 A, B, D und 23 D, E) (Selvaraj et al. 2012). Es ist vorstellbar, dass diese Situation einen Transportstau verschuldet und die Ursache von gehäuften axonalen Schwellungen darstellt wie sie in kultivierten *pnn* mutierten Motoneuronen oder auch in Patienten mit Motoneuronendegeneration gefunden werden. Ein anderer Grund könnten auch PTM wie Acetylierungsmuster entlang von MT sein. Es gibt einige Hinweise, dass die Deacetylierung von MT an der Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt sind, da molekulare Motoren wie Kinesin-1 und Dynein bevorzugt an azetylierte MTs binden und entlang acetylierter MTs mobiler sind (Reed et al., 2006;

## Diskussion

Dompierre et al., 2007; Hammond et al., 2010). Daher könnte es möglich sein, dass axonale Mitochondrien in *pnn* mutierten Motoneuronen nicht schnell genug an Orte innerhalb des Axons gelangen, die einen erhöhten Bedarf an ATP oder der  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicherung haben (Hollenbeck & Saxton 2005b) und dies die pathologischen Veränderung in kultivierten *pnn* mutierten Motoneuronen begünstigt.

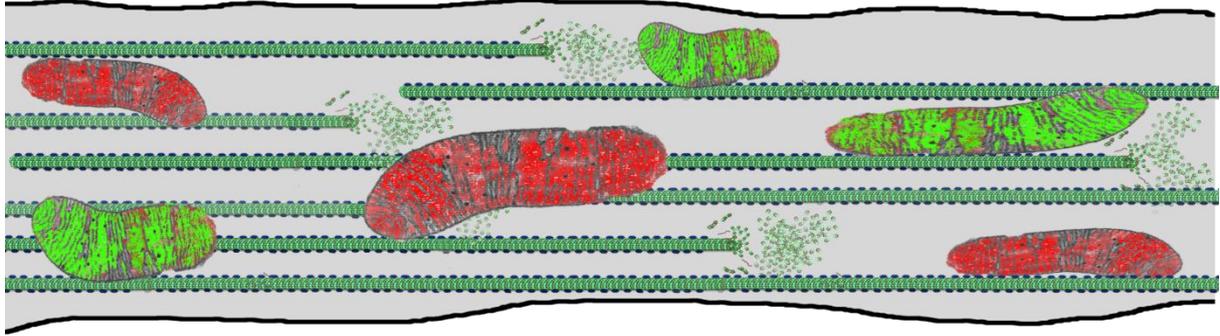
Aufgrund des Verhältnisses von azetylierten gegenüber tyrosinierten MT in *pnn* mutierten Motoneuronen, kann vermutet werden, dass durch die TBCE Mutation in Motoneuronen die GTP-Cap assoziierte Langlebigkeit von MT verkürzt ist, weil die kritische Konzentration polymerisierungskompetenter  $\alpha/\beta$ -Heterodimere für den Prozess des Self-Assembly nicht erreicht wird. Dies hätte zur Folge, dass signifikant mehr MT initiiert werden (viel tyrosiniertes Tubulin) aber auch gleich wieder in den Zustand der Depolymerisation übergehen bevor stabilisierende und transportrelevante PTM stattfinden können (Selvaraj et al. 2012). CNTF und der knock-down von Stathmin in *pnn* mutierten Motoneuronen beheben das anterograde und retrograde Transportdefizit von axonalen Mitochondrien. Dieser Befund steht im Einklang mit dem ersten Teil dieser Arbeit. Dort wurde gezeigt, dass CNTF über  $\text{pSTAT3}^{\text{Y705}}$  die MT destabilisierende Wirkung Stathmin unterdrückt wodurch mehr und längere MT entstehen die zur funktionalen Aufrechterhaltung beitragen und die Axondegeneration von primären *pnn* mutierten Motoneuronen verhindern.

Diese Beobachtungen sind ein weiterer Hinweis darauf, dass ein gestörter axonaler Transport eng mit Motoneuronenerkrankungen in Verbindung steht oder sogar der Auslöser einer solchen Erkrankung sein kann (Hafezparast et al. 2003; Zhao et al. 2001; Reid et al. 2002; LaMonte et al. 2002; Puls et al. 2003).

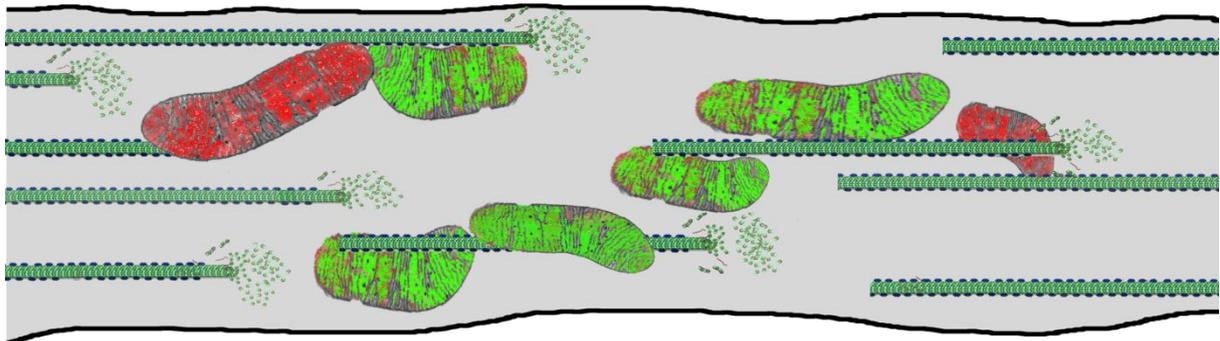
In der *pnn*-Maus sind jedoch nicht mutationsabhängige Defekte von Motor- oder Adapterproteinen verantwortlich für das feststellbare Transportdefizit, sondern vermutlich nur eine Störung der MT-Assemblierung. Diese Hypothese ließe sich einfach durch das live imaging von Mitochondrien in Motoneuronen mit shRNA vermitteltem knock-down von TBCB untersuchen.

## Diskussion

in Axonen von wildtypische Motoneuronen



in Axonen von *pnn* mutierten Motoneuronen  
in Gegenwart von BDNF



in Axonen von *pnn* mutierten Motoneuronen bei Kultivierung in  
Gegenwart von CNTF oder bei knock-down von Stathmin

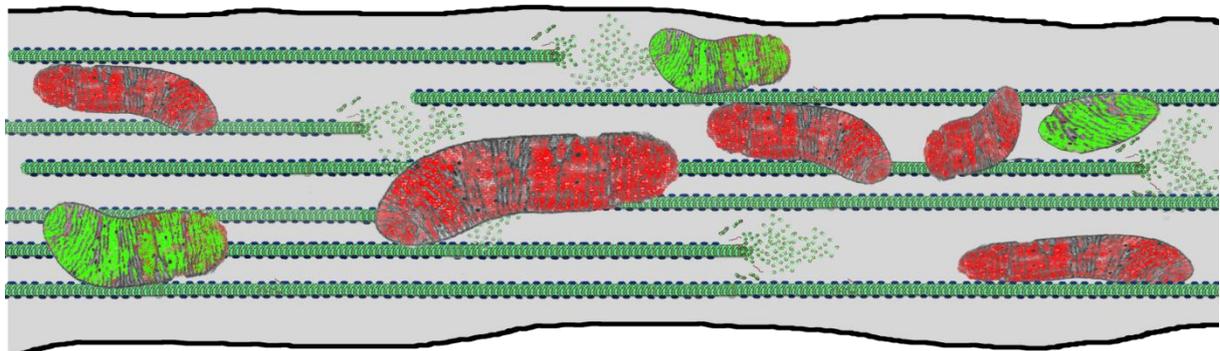


Abbildung 31: In Axonen von wildtypischen Motoneuronen entsteht durch die ungestörte MT-Polymerisation eine Vielzahl parallel verlaufender MT über die Dyneine und Kinesine Mitochondrien (und andere Organellen) retrograd bzw. anterograd transportieren können. Enden MT, sind in unmittelbarer Nähe weitere, über die ein Transport in eine der beiden Richtungen fortgesetzt werden kann. In Axonen von *pnn* mutierten Motoneuronen besteht auf Grund der TBCE-Mutation ein Mangel an polymerisationskompetenten  $\alpha/\beta$ -Tubulinheterodimeren mit dem Resultat einer geringeren MT-Dichte. Der Mitochondrientransport kommt am Ende von MT zum Erliegen. Stationäre MT zeigen ein niedrigeres Membranpotential auf (grünes Mitochondrium) als anterograd oder retrograd transportierte Mitochondrien (rote Mitochondrien). In Gegenwart von CNTF oder durch den knock-down von Stathmin wird die MT-Polymerisation normalisiert und das bidirektionale Transportdefizit behoben.

### 7.8.2 CNTF steigert das Membranpotential von axonalen Mitochondrien in kultivierten Motoneuronen

Mitochondrien sind wichtige Organellen die viele zelluläre Funktionen regulieren wie bspw. Apoptose, intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$  Homöostase und ATP-Synthese. In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass CNTF das Membranpotential von retrograd und anterograd transportierten axonalen Mitochondrien in *pnn* mutierten Motoneurone steigert, während sich das mitochondriale Membranpotential ( $\Psi_{\text{mito}}$ ) von stationären Mitochondrien im Axon *pnn* mutierter Motoneurone bei CNTF-Gabe nicht ändert und vergleichbar ist gegenüber dem Membranpotential stationärer Mitochondrien in Axonen wildtypischer Kontrollen (Abb. 25). Der CNTF abhängige Anstieg von  $\Psi_{\text{mito}}$  ist verbunden mit einer gesteigerten ATP-Synthese (Abb. 26 und 27), die vermutlich mit der Phosphorylierung von STAT3 an Serin 727 (pSTAT3<sup>S727</sup>) zusammenhängt (Abb. 28) (Wegrzyn et al. 2009).

CNTF als auch BDNF induzieren die Serin/Threonin Kinase Raf, über die sowohl der MAP Kinasen als auch Pi3K/Akt Signalweg aktiviert werden können (Frebel & Wiese 2006). In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass STAT3 mit GRIM-19 interagiert, einem Protein der Elektronen-Transportkette in Mitochondrien. Für diese Interaktion wird die Ras abhängige Phosphorylierung von STAT3 an Serin 727 benötigt. Durch die Interaktion von GRIM-19 mit vermutlich monomeren pSTAT<sup>S727</sup> gelangt dieses in die Mitochondrien und steigert die ATP-Synthese (Wegrzyn et al. 2009; Gough et al. 2009).

In den Untersuchungen zur Stabilität axonaler MT reagierten nur *pnn* mutierte Motoneurone auf einen Stathmin knock-down oder die Gabe von CNTF, im Gegensatz zur Untersuchung von  $\Psi_{\text{mito}}$ . Wie gezeigt reagieren sowohl wildtypische als auch *pnn* mutierte Motoneurone auf die akute Gabe von CNTF mit der Steigerung messbarer ATP-Level (Abb. 27 B). Interessanter Weise reagieren wildtypische Motoneurone nur auf die Akute Gabe von CNTF mit einem tendenziellen Anstieg im Membranpotential, während *pnn* mutierte Motoneurone auch ein erhöhtes Membranpotential aufweisen wenn CNTF über die gesamte Kulturdauer appliziert wurde.

Noch überraschender ist das Ergebnis der CNTF induzierten Kolo-kalisation von pSTAT3<sup>S727</sup> mit axonalen Mitochondrien. Hieraus lässt sich eine transiente pSTAT3<sup>S727</sup> abhängige Aktivierung des  $\Psi_{\text{mito}}$  in wildtypischen Motoneuronen ableiten, die vermutlich zur bedarfsübersteigenden ATP-Synthese führt. Durch den über die Ausgangssituation hinausgehende Absenkung von pSTAT<sup>S727</sup> in Mitochondrien könnten wildtypische Motoneuronen versuchen die ATP Level wieder zu normalisieren (Abb. 28 A und C). Eine Gegensätzliche Situation wird nach 5 minütigem BDNF Puls in kortikalen Neuronen

## Diskussion

gefunden. In diesen kommt es zu einer langanhaltenden Phosphorylierung von STAT3 an Serin 727 wohingegen die Tyrosin 705 Phosphorylierung nur transient zu finden ist (Ng et al. 2006a). Dies lässt die vage Vermutung zu, dass BDNF und CNTF über Ras abhängige Kinasen STAT3 an Serin 727 phosphorylieren können, aber nur CNTF parallel dazu eine lang anhaltende Tyrosin 705 Phosphorylierung induziert. Vermutlich wird eine CNTF bedingte erhöhte Stoffwechselrate in *pnn* mutierten Motoneuronen auf Grund der Energie zehrenden MT Polymerisation eher toleriert oder sogar benötigt. Daher kolokalisiert pSTAT3<sup>S727</sup> in Gegenwart von CNTF stärker mit axonalen Mitochondrien in *pnn* mutierten als wildtypischen Motoneuronen (Abb 28 A, B und C).

Nach dieser Interpretation scheint es sich zu lohnen die mitochondriale Fraktionierung nochmals durchzuführen und den CNTF-Puls von einer Stunde auf 15 min zu reduzieren. So wäre es möglich eine regulatorischen Dephosphorylierung von mitochondrialem pSTAT3<sup>S727</sup> zu umgehen.

### **7.9 Versuch einer Synthese von lokaler axonaler Wirkung von STAT3 und der „signalling endosome Theorie“**

Zusammengefasst deuten die Ergebnisse dieser Arbeit auf zwei parallel durch CNTF induzierte Signalwege hin, über die STAT3 abhängig die pathologischen Veränderungen in kultivierten *pnn* mutierten Motoneuronen gelindert werden. Zum einen durch die pSTAT3<sup>Y705</sup> abhängige Inaktivierung von Stathmin, welche zur Stabilisierung axonaler MT führt. Zum anderen über den, von seiner Bedeutung dem ersten scheinbar untergeordneten, Signalweg, der von der Translokation von STAT3<sup>S727</sup> in Mitochondrien abhängt. Wie groß der Einfluss von pSTAT3<sup>S727</sup> auf die *pnn* mutierte Motoneuronen ist, könnte mit einem bereits von mir erzeugten Lentivirus untersucht werden, der für eine STAT3-EYFP Isoform mit einen Austausch von Serin gegen Alanin an Position 727 kodiert. Sollte die dominant negative STAT3<sup>S727A</sup>-EYFP Isoform in STAT3-Defizienten *pnn* mutierten Zellen das Axonwachstum nach CNTF-Gabe ähnlich wie STAT3<sup>Y705F</sup>-EYFP nicht unterstützen, ließe dies vermuten, dass pSTAT3<sup>S727</sup> ein Regulator von pSTAT3<sup>Y705</sup> ist.

Es könnte sein, dass unterschiedliche STAT3-Pools existieren, die sich in ihrer Größe durch die jeweilige Phosphorylierung beeinflussen. Beispielsweise könnte eine primäre JAK abhängige Phosphorylierung von gp130 an Tyrosin 759 Ras aktivieren. Diese Aktivierung könnte unmittelbar zur Zunahme von pSTAT3<sup>S727</sup> führen wodurch die Mengen an unphosphoryliertem STAT3 reduziert werden würde. Durch eine hierarchisch später erfolgenden JAK-abhängige Phosphorylierung der STAT3 Bindungsstellen an gp130 und

## Diskussion

LIFR $\beta$  würde weniger pSTAT3<sup>Y705</sup> gebildet werden. Dies wiederum könnte zur Folge haben, dass die, mit dem retrograden Transport in Verbindung stehende, Dimerisierung von pSTAT3<sup>Y705</sup> unterdrückt wird und es zu einer verstärkten Interaktion von pSTAT3<sup>Y705</sup> mit Stathmin kommt, wodurch der STAT3 abhängige Einfluss auf das MT-Skelett zunimmt und transkriptionale Effekte unterdrückt werden.

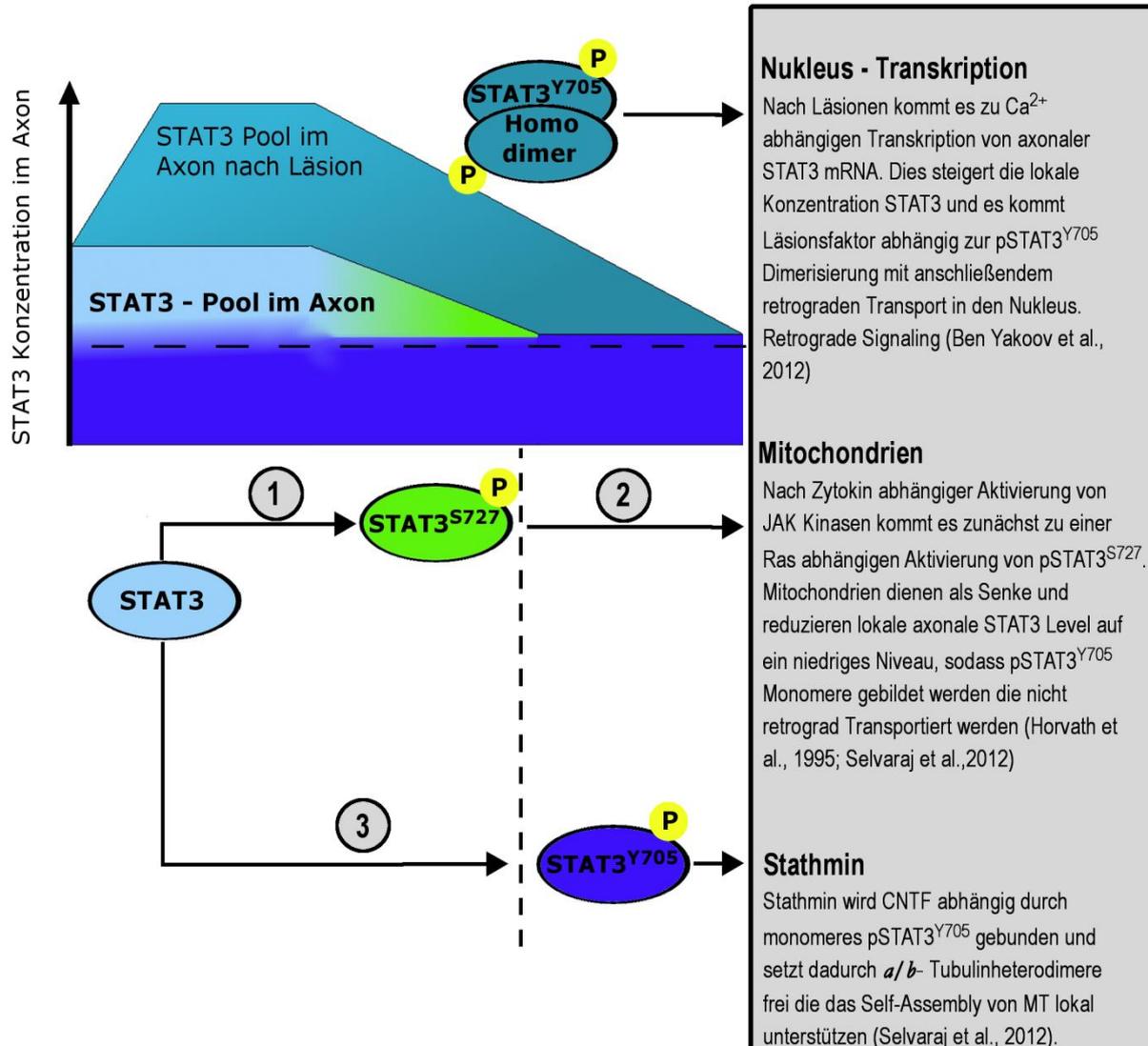


Abbildung 32. Die Zytokin abhängige Phosphorylierung von STAT3 an Serin S727 (pSTAT3<sup>S727</sup>) führt zur Translokation von pSTAT3<sup>S727</sup> in Mitochondrien (1 und 2). Als Konsequenz fällt die Menge von (nicht phosphoryliertem) STAT3 lokal unter einen Schwellenwert. Die anschließende Phosphorylierung von STAT3 an Tyrosin 705 findet zwar noch immer statt, allerdings ist die Dimerisierung von pSTAT<sup>Y705</sup> nicht möglich da nicht ausreichend pSTAT3 lokal gebildet werden. Als monomer wird pSTAT<sup>Y705</sup> nicht mehr Dynein abhängig retrograd transportiert (Hypothese) und kann verstärkt lokal mit Stathmin interagieren, wodurch dessen MT-destabilisierende Wirkung unterdrückt wird. Über die Dauer der Wirkung von Zytokinen wie CNTF kann dadurch innerhalb einer subzellulären Region wie dem Wachstumskegel oder an lateralen axonalen Knospen das Zytoskelett sensibel beeinflusst werden (3). Anders bei Läsionen, die eine Hochregulierung von STAT3 im Axon zur Folge haben. Die regulatorische Funktion der Serin Phosphorylierung von STAT3 reicht nicht aus, pSTAT<sup>Y705</sup> dimerisiert und transloziert retrograd in den Nucleus und induziert die Transkription von Zielgenen.

## Diskussion

Die systemische Behandlung von CNTF führt bei *pnn* Mäusen zu einem verlängerten Überleben und zu verbesserten Motorfunktionen (Sendtner, Schmalbruch, et al. 1992). Im Gegensatz dazu kann der nicht vollständige ubiquitäre Knock-down von Stathmin in SMN<sup>+/-</sup>; SMN2<sup>tg</sup> Tieren zwar das Ausreifen funktioneller neuromuskulärer Synapsen unterstützen und die Motorkoordination verbessern, aber scheitert darin das Überleben von SMA ähnlichen Tieren zu steigern. Die Ursache könnte hier in der gewebespezifischen Verteilung von Stathmin oder in der Expressionssteigerung von verwandten MT destabilisierenden Proteinen wie dem Supercervicalen Ganglion Protein 10 (SCG 10)-like liegen (Lidtko Wolfgang 2002). Für die Therapie von degenerativen Motoneuronenerkrankungen bedeuten die Erkenntnisse dieser Arbeit, dass man durch die lokale Inaktivierung von Stathmin zu einer verbesserten MT-Infrastruktur beitragen kann, die das Abreißen bereits etablierter neuromuskulärer Synapsen verhindern könnte. Die Kontrolle darüber, ob ein JAK/STAT3 abhängiges Therapeutikum einen retrograden Signalweg induziert und Überlebenssignale vermittelt oder lokal auf MT wirkt, könnte dabei durch Mitochondrien gesteuert werden. Denn wie in der vorliegenden Arbeit ansatzweise gezeigt werden konnte, könnten Mitochondrien lokal die Konzentration von STAT3 kontrollieren und darüber entscheiden ob pSTAT3<sup>Y705</sup>-Dimere oder -Monomere entstehen, die retrograd transportiert werden bzw. zur Interaktion mit Stathmin bereitstehen.

## 8. Literaturverzeichnis

- Ackerley, S. et al., 2003. Neurofilament heavy chain side arm phosphorylation regulates axonal transport of neurofilaments. *The Journal of cell biology*, 161(3), pp.489–95.
- Amayed, P., Pantaloni, D. & Carlier, M.-F., 2002. The effect of stathmin phosphorylation on microtubule assembly depends on tubulin critical concentration. *The Journal of biological chemistry*, 277(25), pp.22718–24.
- Arakawa, Y., Sendtner, M. & Thoenen, H., 1990. Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 10(11), pp.3507–3515.
- Axelrod, D. et al., 1976. Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophysical journal*, 16(9), pp.1055–69.
- Baas, P.W., 1989. Changes in microtubule polarity orientation during the development of hippocampal neurons in culture. *The Journal of Cell Biology*, 109(6), pp.3085–3094.
- Baas, P.W. et al., 1988. Polarity orientation of microtubules in hippocampal neurons: uniformity in the axon and nonuniformity in the dendrite. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 85(21), pp.8335–9.
- Bareyre, F.M. et al., 2011. In vivo imaging reveals a phase-specific role of STAT3 during central and peripheral nervous system axon regeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(15), pp.6282–6287.
- Barry, J. et al., 2014. Ankyrin-G directly binds to kinesin-1 to transport voltage-gated Na<sup>+</sup> channels into axons. *Developmental cell*, 28(2), pp.117–31.
- Baumann, O. & Murphy, D.B., 1995. Microtubule-associated movement of mitochondria and small particles in *Acanthamoeba castellanii*. *Cell motility and the cytoskeleton*, 32(4), pp.305–17.
- Bender, F.L.P. et al., 2007. High-efficiency gene transfer into cultured embryonic motoneurons using recombinant lentiviruses. *Histochemistry and cell biology*, 127(4), pp.439–48.
- Ben-Yaakov, K. et al., 2012. Axonal transcription factors signal retrogradely in lesioned peripheral nerve. *The EMBO Journal*, 31(6), pp.1350–1363.
- Beset, V., Scott, R.P. & Ibáñez, C.F., 2000. Signaling complexes and protein-protein interactions involved in the activation of the Ras and phosphatidylinositol 3-kinase pathways by the c-Ret receptor tyrosine kinase. *The Journal of biological chemistry*, 275(50), pp.39159–66.
- Bild, A.H., 2002. Cytoplasmic transport of Stat3 by receptor-mediated endocytosis. *The EMBO Journal*, 21(13), pp.3255–3263.

- Bommel, H. et al., 2002. Missense mutation in the tubulin-specific chaperone E (Tbce) gene in the mouse mutant progressive motor neuronopathy, a model of human motoneuron disease. *The Journal of cell biology*, 159(4), pp.563–9.
- Bonnet, C. et al., 2001. Differential binding regulation of microtubule-associated proteins MAP1A, MAP1B, and MAP2 by tubulin polyglutamylation. *The Journal of biological chemistry*, 276(16), pp.12839–48.
- Bormuth, V. et al., 2009. Protein friction limits diffusive and directed movements of kinesin motors on microtubules. *Science (New York, N.Y.)*, 325(5942), pp.870–3.
- Bossy-Wetzel, E., Schwarzenbacher, R. & Lipton, S.A., 2004. Molecular pathways to neurodegeneration.
- Burghes, A.H.M. & Beattie, C.E., 2009. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nature reviews. Neuroscience*, 10(8), pp.597–609.
- Cafferty, W.B. et al., 2001. Leukemia inhibitory factor determines the growth status of injured adult sensory neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(18), pp.7161–70.
- Cafferty, W.B.J. et al., 2004. Conditioning injury-induced spinal axon regeneration fails in interleukin-6 knock-out mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 24(18), pp.4432–43.
- Caplow, M., Ruhlen, R.L. & Shanks, J., 1994. The free energy for hydrolysis of a microtubule-bound nucleotide triphosphate is near zero: all of the free energy for hydrolysis is stored in the microtubule lattice. *The Journal of cell biology*, 127(3), pp.779–88.
- Carrel, T.L. et al., 2006. Survival motor neuron function in motor axons is independent of functions required for small nuclear ribonucleoprotein biogenesis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(43), pp.11014–22.
- Chapman, R.S. et al., 2000. The role of Stat3 in apoptosis and mammary gland involution. Conditional deletion of Stat3. *Advances in experimental medicine and biology*, 480, pp.129–38.
- Charbaut, E. et al., 2001. Stathmin family proteins display specific molecular and tubulin binding properties. *The Journal of biological chemistry*, 276(19), pp.16146–54.
- Chen, J. et al., 1992. Projection domains of MAP2 and tau determine spacings between microtubules in dendrites and axons. *Nature*, 360(6405), pp.674–7.
- Cleveland, D.W. & Rothstein, J.D., 2001. From Charcot to Lou Gehrig: deciphering selective motor neuron death in ALS. *Nature reviews. Neuroscience*, 2(11), pp.806–19.
- Davis, S. et al., 1993. LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science*, 260(5115), pp.1805–1808.

- DeJesus-Hernandez, M. et al., 2011. Expanded GGGGCC hexanucleotide repeat in noncoding region of C9ORF72 causes chromosome 9p-linked FTD and ALS. *Neuron*, 72(2), pp.245–56.
- Delisle, M.B. & Carpenter, S., 1984. Neurofibrillary axonal swellings and amyotrophic lateral sclerosis. *Journal of the neurological sciences*, 63(2), pp.241–50.
- Dolcet, X. et al., 1999. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase, but not extracellular-regulated kinases, is necessary to mediate brain-derived neurotrophic factor-induced motoneuron survival. *Journal of neurochemistry*, 73(2), pp.521–31.
- Dolcet, X. et al., 2001. Cytokines promote motoneuron survival through the Janus kinase-dependent activation of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *Molecular and cellular neurosciences*, 18(6), pp.619–31.
- Dompierre, J.P. et al., 2007. Histone deacetylase 6 inhibition compensates for the transport deficit in Huntington's disease by increasing tubulin acetylation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(13), pp.3571–83.
- Dunn, S. et al., 2008. Differential trafficking of Kif5c on tyrosinated and detyrosinated microtubules in live cells. *Journal of cell science*, 121(Pt 7), pp.1085–95.
- Emaus, R.K., Grunwald, R. & Lemasters, J.J., 1986. Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochimica et biophysica acta*, 850(3), pp.436–48.
- Ertürk, A. et al., 2007. Disorganized microtubules underlie the formation of retraction bulbs and the failure of axonal regeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 27(34), pp.9169–80.
- Fallini, C. et al., 2011. The survival of motor neuron (SMN) protein interacts with the mRNA-binding protein HuD and regulates localization of poly(A) mRNA in primary motor neuron axons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(10), pp.3914–25.
- Feldkötter, M. et al., 2002. Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy. *American journal of human genetics*, 70(2), pp.358–68.
- Frebel, K. & Wiese, S., 2006. Signalling molecules essential for neuronal survival and differentiation. *Biochemical Society transactions*, 34(Pt 6), pp.1287–90.
- Garcia, M.L. & Cleveland, D.W., 2001. Going new places using an old MAP: tau, microtubules and human neurodegenerative disease. *Current opinion in cell biology*, 13(1), pp.41–8.
- Glinka, M. et al., 2010. The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-R is necessary for axonal beta-actin mRNA translocation in spinal motor neurons. *Human molecular genetics*, 19(10), pp.1951–66.

- Goold, R.G., Owen, R. & Gordon-Weeks, P.R., 1999. Glycogen synthase kinase 3beta phosphorylation of microtubule-associated protein 1B regulates the stability of microtubules in growth cones. *Journal of cell science*, 112 ( Pt 1, pp.3373–84.
- Gough, D.J. et al., 2009. Mitochondrial STAT3 supports Ras-dependent oncogenic transformation. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5935), pp.1713–6.
- Graham, F.L. et al., 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *The Journal of general virology*, 36(1), pp.59–74.
- Greene, L.A. & Tischler, A.S., 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 73(7), pp.2424–8.
- Haase, G. et al., 1998. Adenovirus-mediated transfer of the neurotrophin-3 gene into skeletal muscle of pmn mice: therapeutic effects and mechanisms of action. *Journal of the neurological sciences*, 160 Suppl , pp.S97–105.
- Hafezparast, M. et al., 2003. Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science (New York, N.Y.)*, 300(5620), pp.808–12.
- Hammond, J.W. et al., 2010. Posttranslational modifications of tubulin and the polarized transport of kinesin-1 in neurons. *Molecular biology of the cell*, 21(4), pp.572–83.
- Heinrich, P.C. et al., 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical journal*, 334 ( Pt 2, pp.297–314.
- Heinrich, P.C. et al., 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *The Biochemical journal*, 374(Pt 1), pp.1–20.
- Henderson, C.E. et al., 1994. GDNF: a potent survival factor for motoneurons present in peripheral nerve and muscle. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5187), pp.1062–4.
- Herrmann, A., 2004. STAT3 is enriched in nuclear bodies. *Journal of Cell Science*, 117(2), pp.339–349.
- Hollenbeck, P.J. & Saxton, W.M., 2005a. The axonal transport of mitochondria. *Journal of cell science*, 118(Pt 23), pp.5411–9.
- Hollenbeck, P.J. & Saxton, W.M., 2005b. The axonal transport of mitochondria. *Journal of cell science*, 118(Pt 23), pp.5411–9.
- Horvath, C.M., Wen, Z. & Darnell, J.E., 1995. A STAT protein domain that determines DNA sequence recognition suggests a novel DNA-binding domain. *Genes & development*, 9(8), pp.984–94.
- Howe, C.L., 2005. Modeling the signaling endosome hypothesis: why a drive to the nucleus is better than a (random) walk. *Theoretical biology & medical modelling*, 2, p.43.
- Hsieh-Li, H.M. et al., 2000. A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nature genetics*, 24(1), pp.66–70.

- Hubbert, C. et al., 2002. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, 417(6887), pp.455–8.
- Hubers, L. et al., 2011. HuD interacts with survival motor neuron protein and can rescue spinal muscular atrophy-like neuronal defects. *Human molecular genetics*, 20(3), pp.553–79.
- Hur, E.M. et al., 2011. GSK3 controls axon growth via CLASP-mediated regulation of growth cone microtubules. *Genes and Development*, 25(18), pp.1968–1981.
- Hyman, A.A. et al., 1992. Role of GTP hydrolysis in microtubule dynamics: information from a slowly hydrolyzable analogue, GMPCPP. *Molecular biology of the cell*, 3(10), pp.1155–67.
- ISAACS, A. & LINDENMANN, J., 1957. Virus interference. I. The interferon. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain)*, 147(927), pp.258–67.
- Jablonka, S. et al., 2007. Defective Ca<sup>2+</sup> channel clustering in axon terminals disturbs excitability in motoneurons in spinal muscular atrophy. *The Journal of cell biology*, 179(1), pp.139–49.
- Jablonka, S. et al., 2000. Reduced survival motor neuron (Smn) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III. *Human molecular genetics*, 9(3), pp.341–6.
- Jablonka, S., Wiese, S. & Sendtner, M., 2004. Axonal defects in mouse models of motoneuron disease. *Journal of neurobiology*, 58(2), pp.272–86.
- Jacobson, C., Schnapp, B. & Banker, G.A., 2006. A change in the selective translocation of the Kinesin-1 motor domain marks the initial specification of the axon. *Neuron*, 49(6), pp.797–804.
- Janke, C. & Kneussel, M., 2010. Tubulin post-translational modifications: encoding functions on the neuronal microtubule cytoskeleton. *Trends in neurosciences*, 33(8), pp.362–72.
- Jeanneteau, F. et al., 2010. The MAP kinase phosphatase MKP-1 regulates BDNF-induced axon branching. *Nature neuroscience*, 13(11), pp.1373–9.
- Jedrzejowska, M. et al., 2008. Unaffected patients with a homozygous absence of the SMN1 gene. *European journal of human genetics : EJHG*, 16(8), pp.930–4.
- Kaasik, A. et al., 2007. Mitochondrial swelling impairs the transport of organelles in cerebellar granule neurons. *The Journal of biological chemistry*, 282(45), pp.32821–6.
- Kalil, K. & Dent, E.W., 2005. Touch and go: guidance cues signal to the growth cone cytoskeleton. *Current opinion in neurobiology*, 15(5), pp.521–6.
- Karle, K.N. et al., 2012. Axonal transport deficit in a KIF5A( -/- ) mouse model. *Neurogenetics*, 13(2), pp.169–79.

- Kerschensteiner, M. & Misgeld, T., 2007. [Cellular imaging in the nervous system]. *Deutsche medizinische Wochenschrift*, 132(47), pp.2529–2533.
- Khawaja, S., Gundersen, G.G. & Bulinski, J.C., 1988. Enhanced stability of microtubules enriched in deetyrosinated tubulin is not a direct function of deetyrosination level. *The Journal of cell biology*, 106(1), pp.141–9.
- Kirsch, M., Terheggen, U. & Hofmann, H.-D., 2003. Ciliary neurotrophic factor is an early lesion-induced retrograde signal for axotomized facial motoneurons. *Molecular and cellular neurosciences*, 24(1), pp.130–8.
- Kortazar, D. et al., 2007. Role of cofactors B (TBCB) and E (TBCE) in tubulin heterodimer dissociation. *Experimental cell research*, 313(3), pp.425–36.
- Lagier-Tourenne, C., Polymenidou, M. & Cleveland, D.W., 2010. TDP-43 and FUS/TLS: emerging roles in RNA processing and neurodegeneration. *Human molecular genetics*, 19(R1), pp.R46–64.
- LaMonte, B.H. et al., 2002. Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron*, 34(5), pp.715–27.
- Lefebvre, S. et al., 1995. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell*, 80(1), pp.155–165.
- Lois, C. et al., 2002. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science (New York, N.Y.)*, 295(5556), pp.868–72.
- Lu, M. & Kosik, K.S., 2001. Competition for microtubule-binding with dual expression of tau missense and splice isoforms. *Molecular biology of the cell*, 12(1), pp.171–84.
- Lundin, V.F., Leroux, M.R. & Stirling, P.C., 2010. Quality control of cytoskeletal proteins and human disease. *Trends in biochemical sciences*, 35(5), pp.288–97.
- Mailman, M.D. et al., Molecular analysis of spinal muscular atrophy and modification of the phenotype by SMN2. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*, 4(1), pp.20–6.
- Maniar, T.A. et al., 2012. UNC-33 (CRMP) and ankyrin organize microtubules and localize kinesin to polarize axon-dendrite sorting. *Nature neuroscience*, 15(1), pp.48–56.
- Marklund, U. et al., 1996. Oncoprotein 18 is a phosphorylation-responsive regulator of microtubule dynamics. *The EMBO journal*, 15(19), pp.5290–8.
- Marklund, U. et al., 1994. Serine 16 of oncoprotein 18 is a major cytosolic target for the Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent kinase-Gr. *European journal of biochemistry / FEBS*, 225(1), pp.53–60.
- Marklund, U. et al., 1993. Serine 25 of oncoprotein 18 is a major cytosolic target for the mitogen-activated protein kinase. *The Journal of biological chemistry*, 268(20), pp.15039–47.

- Martin, N. et al., 2002. A missense mutation in *Tbce* causes progressive motor neuronopathy in mice. *Nature genetics*, 32(3), pp.443–7.
- Mattiazzi, M. et al., 2002. Mutated human SOD1 causes dysfunction of oxidative phosphorylation in mitochondria of transgenic mice. *The Journal of biological chemistry*, 277(33), pp.29626–33.
- McCombe, P.A. & Henderson, R.D., 2011. The Role of immune and inflammatory mechanisms in ALS. *Current molecular medicine*, 11(3), pp.246–54.
- Miller, K.E. & Sheetz, M.P., 2004. Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *Journal of cell science*, 117(Pt 13), pp.2791–804.
- Mitchison, T. & Kirschner, M., 1984. Dynamic instability of microtubule growth. *Nature*, 312(5991), pp.237–242.
- Mohr, A. et al., 2012. Dynamics and non-canonical aspects of JAK/STAT signalling. *European Journal of Cell Biology*, 91(6-7), pp.524–532.
- Monani, U.R., 1999. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene *SMN1* from the copy gene *SMN2*. *Human Molecular Genetics*, 8(7), pp.1177–1183.
- Morris, R.L. & Hollenbeck, P.J., 1995. Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *The Journal of cell biology*, 131(5), pp.1315–26.
- Mourelatos, Z. et al., 2001. *SMN* interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins. *The EMBO journal*, 20(19), pp.5443–52.
- Naldini, L. et al., 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science (New York, N.Y.)*, 272(5259), pp.263–7.
- Neumann, M. et al., 2006. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science (New York, N.Y.)*, 314(5796), pp.130–3.
- Ng, D.C.H. et al., 2011. *Opposing actions of extracellular signal-regulated kinase (ERK) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) in regulating microtubule stabilization during cardiac hypertrophy*,
- Ng, D.C.H., Bao, H.L., et al., 2006. Stat3 regulates microtubules by antagonizing the depolymerization activity of stathmin. *Journal of Cell Biology*, 172(2), pp.245–257.
- Ng, D.C.H., Lin, B.H., et al., 2006. Stat3 regulates microtubules by antagonizing the depolymerization activity of stathmin. *The Journal of cell biology*, 172(2), pp.245–57.
- Ng, Y.P., Cheung, Z.H. & Ip, N.Y., 2006. STAT3 as a downstream mediator of Trk signaling and functions. *The Journal of biological chemistry*, 281(23), pp.15636–44.
- Nicolas, C. et al., 2012. The JAK/STAT Pathway Is Involved in Synaptic Plasticity. *Neuron*, 73(2), pp.374–390.

- Ning, K. et al., 2010. PTEN depletion rescues axonal growth defect and improves survival in SMN-deficient motor neurons. *Human molecular genetics*, 19(16), pp.3159–68.
- Nishimune, H. et al., 2000. Reg-2 is a motoneuron neurotrophic factor and a signalling intermediate in the CNTF survival pathway. *Nature cell biology*, 2(12), pp.906–14.
- Nishimura, A.L. et al., 2004. A mutation in the vesicle-trafficking protein VAPB causes late-onset spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. *American journal of human genetics*, 75(5), pp.822–31.
- North, B.J. et al., 2003. The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Molecular cell*, 11(2), pp.437–44.
- Ohkawa, N. et al., 2007. The microtubule destabilizer stathmin mediates the development of dendritic arbors in neuronal cells. *Journal of cell science*, 120(Pt 8), pp.1447–56.
- Ohno, N. et al., 2011. Myelination and axonal electrical activity modulate the distribution and motility of mitochondria at CNS nodes of Ranvier. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 31(20), pp.7249–58.
- Oppenheim, R.W. et al., 2001. Cardiotrophin-1, a muscle-derived cytokine, is required for the survival of subpopulations of developing motoneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 21(4), pp.1283–1291.
- Pagliardini, S., 2000. Subcellular localization and axonal transport of the survival motor neuron (SMN) protein in the developing rat spinal cord. *Human Molecular Genetics*, 9(1), pp.47–56.
- Peris, L. et al., 2009. Motor-dependent microtubule disassembly driven by tubulin tyrosination. *The Journal of cell biology*, 185(7), pp.1159–66.
- Prior, T.W. et al., 2004. Homozygous SMN1 deletions in unaffected family members and modification of the phenotype by SMN2. *American journal of medical genetics. Part A*, 130A(3), pp.307–10.
- Prota, A.E. et al., 2013. Structural basis of tubulin tyrosination by tubulin tyrosine ligase. *The Journal of cell biology*, 200(3), pp.259–70.
- Puls, I. et al., 2003. Mutant dynactin in motor neuron disease. *Nature genetics*, 33(4), pp.455–6.
- Qiu, J. et al., 2005. Conditioning injury-induced spinal axon regeneration requires signal transducer and activator of transcription 3 activation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 25(7), pp.1645–53.
- Rajan, P. & McKay, R.D., 1998. Multiple routes to astrocytic differentiation in the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(10), pp.3620–9.

- Raybin, D. & Flavin, M., 1975. An enzyme tyrosylating alpha-tubulin and its role in microtubule assembly. *Biochemical and biophysical research communications*, 65(3), pp.1088–95.
- Reed, N.A. et al., 2006. Microtubule acetylation promotes kinesin-1 binding and transport. *Current biology : CB*, 16(21), pp.2166–72.
- Reich, N.C. & Liu, L., 2006. Tracking STAT nuclear traffic. *Nature Reviews Immunology*, 6(8), pp.602–612.
- Reid, E. et al., 2002. A kinesin heavy chain (KIF5A) mutation in hereditary spastic paraplegia (SPG10). *American journal of human genetics*, 71(5), pp.1189–94.
- Renton, A.E. et al., 2011. A hexanucleotide repeat expansion in C9ORF72 is the cause of chromosome 9p21-linked ALS-FTD. *Neuron*, 72(2), pp.257–68.
- Rossoll, W., 2003. Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of  $\beta$ -actin mRNA in growth cones of motoneurons. *The Journal of Cell Biology*, 163(4), pp.801–812.
- Rossoll, W., 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? *Human Molecular Genetics*, 11(1), pp.93–105.
- Rui, Y. et al., 2006. Acute impairment of mitochondrial trafficking by beta-amyloid peptides in hippocampal neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 26(41), pp.10480–7.
- Rui, Y. et al., 2010. Inhibition of AMPA receptor trafficking at hippocampal synapses by beta-amyloid oligomers: the mitochondrial contribution. *Molecular brain*, 3, p.10.
- Sagot, Y. et al., 1995. Bcl-2 overexpression prevents motoneuron cell body loss but not axonal degeneration in a mouse model of a neurodegenerative disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 15(11), pp.7727–33.
- Sagot, Y. et al., 1998. Differential Effects of Neurotrophic Factors on Motoneuron Retrograde Labeling in a Murine Model of Motoneuron Disease. *J. Neurosci.*, 18(3), pp.1132–1141.
- Sagot, Y. et al., 1998. Differential effects of neurotrophic factors on motoneuron retrograde labeling in a murine model of motoneuron disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 18(3), pp.1132–41.
- Sagot, Y. et al., 1996. GDNF slows loss of motoneurons but not axonal degeneration or premature death of pmn/pmn mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 16(7), pp.2335–41.
- Samilchuk, E. et al., 1996. Deletion analysis of the SMN and NAIP genes in Kuwaiti patients with spinal muscular atrophy. *Human genetics*, 98(5), pp.524–7.
- Sasaki, S. & Iwata, M., 1996. Impairment of fast axonal transport in the proximal axons of anterior horn neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Neurology*, 47(2), pp.535–40.

- Schaefer, M.K.E. et al., 2007. *Progressive motor neuronopathy: a critical role of the tubulin chaperone TBCE in axonal tubulin routing from the Golgi apparatus.*,
- Schmalbruch, H. et al., 1991. A new mouse mutant with progressive motor neuronopathy. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, 50(3), pp.192–204.
- Schweizer, U. et al., 2002. Conditional gene ablation of Stat3 reveals differential signaling requirements for survival of motoneurons during development and after nerve injury in the adult. *The Journal of cell biology*, 156(2), pp.287–97.
- Selvaraj, B.T. et al., 2012. Local axonal function of STAT3 rescues axon degeneration in the pmn model of motoneuron disease. *Journal of Cell Biology*, 199(3), pp.437–451.
- Sendtner, M. et al., 1994. Actions of CNTF and neurotrophins on degenerating motoneurons: preclinical studies and clinical implications. *Journal of the neurological sciences*, 124 Suppl, pp.77–83.
- Sendtner, M., Holtmann, B., et al., 1992. Brain-derived neurotrophic factor prevents the death of motoneurons in newborn rats after nerve section. *Nature*, 360(6406), pp.757–759.
- Sendtner, M., Schmalbruch, H., et al., 1992. Ciliary neurotrophic factor prevents degeneration of motor neurons in mouse mutant progressive motor neuronopathy. *Nature*, 358(6386), pp.502–4.
- SENDTNER, M. et al., 1991. Effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on motoneuron survival. *Journal of Cell Science*, 1991(Supplement 15), pp.103–109.
- Sendtner, M. et al., 1997a. Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(18), pp.6999–7006.
- Sendtner, M. et al., 1997b. Endogenous ciliary neurotrophic factor is a lesion factor for axotomized motoneurons in adult mice. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(18), pp.6999–7006.
- Sendtner, M., Kreutzberg, G.W. & Thoenen, H., 1990. Ciliary neurotrophic factor prevents the degeneration of motor neurons after axotomy. *Nature*, 345(6274), pp.440–1.
- Shi, P. et al., 2010. Effects of ALS-related SOD1 mutants on dynein- and KIF5-mediated retrograde and anterograde axonal transport. *Biochimica et biophysica acta*, 1802(9), pp.707–16.
- Shi, S.-H. et al., 2004. APC and GSK-3beta are involved in mPar3 targeting to the nascent axon and establishment of neuronal polarity. *Current biology : CB*, 14(22), pp.2025–32.
- Simon, C.M. et al., 2010. Ciliary neurotrophic factor-induced sprouting preserves motor function in a mouse model of mild spinal muscular atrophy. *Human molecular genetics*, 19(6), pp.973–86.

- Singh, V.P. et al., 2009. Comparison of the effectiveness of music and progressive muscle relaxation for anxiety in COPD--A randomized controlled pilot study. *Chronic respiratory disease*, 6(4), pp.209–216.
- Soler, R.M. et al., 1999. Receptors of the glial cell line-derived neurotrophic factor family of neurotrophic factors signal cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase pathway in spinal cord motoneurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 19(21), pp.9160–9.
- Sontag, E. et al., 1999. Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, and microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation and the development of tauopathies. *The Journal of biological chemistry*, 274(36), pp.25490–8.
- Sperber, B.R. et al., 1995. Glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells. *Neuroscience letters*, 197(2), pp.149–53.
- Stahl, N. & Yancopoulos, G.D., 1993. The alphas, betas, and kinases of cytokine receptor complexes. *Cell*, 74(4), pp.587–90.
- Stamer, K. et al., 2002. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, and APP vesicles in neurons and enhances oxidative stress. *The Journal of cell biology*, 156(6), pp.1051–63.
- Stokin, G.B., 2005. Axonopathy and Transport Deficits Early in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Science*, 307(5713), pp.1282–1288.
- Stokin, G.B. & Goldstein, L.S.B., 2006. Axonal Transport and Alzheimer's Disease.
- Stratigopoulos, G. et al., 2010. Association of plastin 3 expression with disease severity in spinal muscular atrophy only in postpubertal females. *Archives of neurology*, 67(10), pp.1252–6.
- Takeda, K. et al., 1998. Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(9), pp.4652–60.
- Takeda, K. et al., 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(8), pp.3801–3804.
- Takeda, K. et al., 1997. Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8), pp.3801–4.
- Tian, G. et al., 1996. Pathway leading to correctly folded beta-tubulin. *Cell*, 86(2), pp.287–96.
- Tian, G. et al., 1999. Tubulin folding cofactors as GTPase-activating proteins. GTP hydrolysis and the assembly of the alpha/beta-tubulin heterodimer. *The Journal of biological chemistry*, 274(34), pp.24054–8.
- Tian, G. et al., 1997. Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors. *Journal of Cell Biology*, 138(4), pp.821–832.

- Tian, G. et al., 1997. Tubulin subunits exist in an activated conformational state generated and maintained by protein cofactors. *The Journal of cell biology*, 138(4), pp.821–32.
- Tian, G., Thomas, S. & Cowan, N.J., 2010. Effect of TBCD and its regulatory interactor Arl2 on tubulin and microtubule integrity. *Cytoskeleton (Hoboken, N.J.)*, 67(11), pp.706–14.
- Trivedi, N. et al., 2005. Glycogen synthase kinase-3 $\beta$  phosphorylation of MAP1B at Ser1260 and Thr1265 is spatially restricted to growing axons. *Journal of cell science*, 118(Pt 5), pp.993–1005.
- Vadlamudi, R.K. et al., 2005. p21-activated kinase 1 regulates microtubule dynamics by phosphorylating tubulin cofactor B. *Molecular and cellular biology*, 25(9), pp.3726–36.
- Verhey, K.J. et al., 2001. Cargo of Kinesin Identified as Jip Scaffolding Proteins and Associated Signaling Molecules. *The Journal of Cell Biology*, 152(5), pp.959–970.
- Verma, N.K. et al., 2009. STAT3-stathmin interactions control microtubule dynamics in migrating T-cells. *The Journal of biological chemistry*, 284(18), pp.12349–62.
- De Vos, K.J. et al., 2007. Familial amyotrophic lateral sclerosis-linked SOD1 mutants perturb fast axonal transport to reduce axonal mitochondria content. *Human molecular genetics*, 16(22), pp.2720–8.
- De Vos, K.J. et al., 2008. Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annual review of neuroscience*, 31, pp.151–73.
- Wagey, R. et al., 2001. Phosphatidylinositol 3-kinase activity in murine motoneuron disease: the progressive motor neuropathy mouse. *Neuroscience*, 103(1), pp.257–266.
- Watabe-Uchida, M. et al., 2006. The Rac activator DOCK7 regulates neuronal polarity through local phosphorylation of stathmin/Op18. *Neuron*, 51(6), pp.727–39.
- Wegrzyn, J. et al., 2009. Function of mitochondrial Stat3 in cellular respiration. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5915), pp.793–7.
- Weidler, M. et al., 2000. Inhibition of interleukin-6 signaling by galiellalactone. *FEBS letters*, 484(1), pp.1–6.
- Wen, H.L. et al., 2013. Decreased stathmin expression ameliorates neuromuscular defects but fails to prolong survival in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Neurobiology of Disease*, 52, pp.94–103.
- Wen, H.-L. et al., 2010. Stathmin, a microtubule-destabilizing protein, is dysregulated in spinal muscular atrophy. *Human molecular genetics*, 19(9), pp.1766–78.
- Wen, Z., Zhong, Z. & Darnell, J.E., 1995. Maximal activation of transcription by stat1 and stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell*, 82(2), pp.241–250.
- Wiese, S. et al., 2001. Specific function of B-Raf in mediating survival of embryonic motoneurons and sensory neurons. *Nature neuroscience*, 4(2), pp.137–42.

- Wilhelmsen, K.C. et al., 2004. 17q-linked frontotemporal dementia-amyotrophic lateral sclerosis without tau mutations with tau and alpha-synuclein inclusions. *Archives of neurology*, 61(3), pp.398–406.
- Wirth, B. et al., 2006. Mildly affected patients with spinal muscular atrophy are partially protected by an increased SMN2 copy number. *Human genetics*, 119(4), pp.422–8.
- Witte, H., Neukirchen, D. & Bradke, F., 2008. Microtubule stabilization specifies initial neuronal polarization. *The Journal of cell biology*, 180(3), pp.619–32.
- Woetmann, A. et al., 1999. Inhibition of protein phosphatase 2A induces serine/threonine phosphorylation, subcellular redistribution, and functional inhibition of STAT3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(19), pp.10620–5.
- Yan, D., Guo, L. & Wang, Y., 2006. Requirement of dendritic Akt degradation by the ubiquitin-proteasome system for neuronal polarity. *The Journal of cell biology*, 174(3), pp.415–24.
- Yokogami, K. et al., 2000. Serine phosphorylation and maximal activation of STAT3 during CNTF signaling is mediated by the rapamycin target mTOR. *Current biology : CB*, 10(1), pp.47–50.
- Yu, W. et al., 2008. The microtubule-severing proteins spastin and katanin participate differently in the formation of axonal branches. *Molecular biology of the cell*, 19(4), pp.1485–98.
- Zhang, H.L. et al., 2003. Active Transport of the Survival Motor Neuron Protein and the Role of Exon-7 in Cytoplasmic Localization. *J. Neurosci.*, 23(16), pp.6627–6637.
- Zhang, Y., 2011. Growth and shortening of microtubules: a two-state model approach. *The Journal of biological chemistry*, 286(45), pp.39439–49.
- Zhao, C. et al., 2001. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell*, 105(5), pp.587–97.
- Zhou, F.-Q. et al., 2004. NGF-induced axon growth is mediated by localized inactivation of GSK-3beta and functions of the microtubule plus end binding protein APC. *Neuron*, 42(6), pp.897–912.
- Zhou, L. & Too, H.-P., 2011. Mitochondrial localized STAT3 is involved in NGF induced neurite outgrowth. *PloS one*, 6(6), p.e21680.
- Züchner, S. et al., 2004. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nature genetics*, 36(5), pp.449–51.

## Anhang

### 9. Erklärung

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

Des Weiteren erkläre ich, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

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

Würzburg, den

Nicolas Frank

## Anhang

### 10. Publikationen

Local axonal function of STAT3 rescues axon degeneration in the pmn model of motoneuron disease.

Selvaraj BT, **Frank N**, Bender FL, Asan E, Sendtner M.

J Cell Biol. 2012

Laminin induced local axonal translation of  $\beta$ -actin mRNA is impaired in SMN-deficient motoneurons.

Rathod R, Havlicek S, **Frank N**, Blum R, Sendtner M.

Histochem Cell Biol. 2012

Novel Role for Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Receptor-1 and Its Ligand VEGF-B in Motor Neuron Degeneration.

Poesen K, Lambrechts D, Van Damme P, Dhondt J, Bender F, **Frank N**, Bogaert E, Claes B, Heylen L, Verheyen A, Raes K, Tjwa M, Eriksson U, Shibuya M, Nuydens R, Van Den Bosch L, Meert T, D'Hooge R, Sendtner M, Robberecht W, Carmeliet P.

J Neurosci. 2008

## Anhang

### 11. Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Lehrer und Doktorvater Prof. Dr. Michael Sendtner der mir nicht nur die Möglichkeit zur Bearbeitung des spannenden Themas meiner Dissertation gab, sondern stets großes Vertrauen in mich hatte und mich in schwierigen Situationen unterstützte. Sein stetes Bemühen um optimale Laborbedingungen ermöglichte die Nutzung verschiedenster moderner Techniken zur Bearbeitung wissenschaftlicher Fragestellungen. Seine wissenschaftliche Anleitung und konstruktive Kritik bei der Begleitung meiner Doktorarbeit war maßgeblich für deren Erfolg.

Weiterhin bedanke ich mich herzlich auch bei Prof. Dr. Erich Buchner, der sich als Zweitgutachter meiner Arbeit zur Verfügung gestellt hat. Lieber Herr Prof. Buchner, Ihre besonne Art hat mir geholfen meine Thesis zu Ende zu bringen.

Dr. Robert Blum möchte ich danken, dass er mir mit seiner Expertise bei der Herstellung von Lentiviren zur Seite stand.

Bedanken müsste ich mich bei einer Vielzahl von ehemaligen Kolleginnen und Kollegen, für viele anregende wissenschaftliche Diskussionen und schöne gemeinsame Erlebnisse. Insbesondere möchte ich aber Dr. Carsten Drepper danken. Carsten, Du hast mich durch Deine großartigen Kenntnissen in der Molekularbiologie das eine oder andere Mal vor technischen Irrwegen bewahrt. Auch während der schlimmsten Phase meines Lebens konnte ich ausnahmslos auf Dich zählen. Für deine Freundschaft danke ich dir von ganzem Herzen.

Des Weiteren möchte ich meinem Mitstreiter Bhuvaneish alias Bhu danken. Gemeinsam haben wir unsere „pmn-Studien“ veröffentlicht. Dieser Erfolg war möglich, da wir nicht nur Kollegen waren. Unser Kontakt reichte über die Mauern des Instituts hinaus. Ich habe es genossen, zu später Stunde mit Dir im Pizza-Hut über kulturelle Unterschiede zwischen Indern und Europäern zu diskutieren oder bei Spätschichten im Labor eine gemeinsame Pause im Burger-King einzulegen. Es war eine großartige Zeit mit dir, die ich nicht missen möchte.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner über alles geliebten Frau bedanken. Du warst immer bemüht mir den Rücken frei zu halten und das trotz Deiner Berufstätigkeit. Wahnsinn! Ich danke Dir für Deine unbeschreibliche Hoffnung und Zuversicht, insbesondere während Lauras schwerer Erkrankung. Ohne Deine Liebe und Partnerschaft hätte ich vieles in meinem Leben nicht erreicht.