

Institut für Neuroanatomie

■ Direktor: Prof. Dr. Claudia Grothe

Tel.: 0511/532-2896 • E-Mail: grothe.claudia@mh-hannover.de • www.mh-hannover.de/neuroanatomie.html

Forschungsprofil

Im Mittelpunkt unseres wissenschaftlichen Interesses steht die physiologische Rolle neurotropher Faktoren während der neuronalen Entwicklung und bei De- und Regenerationsvorgängen im Nervensystem sowie die potentielle Applikation neurotropher Faktoren bei neurodegenerativen Erkrankungen. Besonderes Interesse liegt dabei auf den zellulären und molekularen Interaktionen beim Morbus Parkinson, der Spinalen Muskelatrophie und der peripheren Nervenregeneration. Die verschiedenen Fragestellungen werden *in vitro* und *in vivo* unter Verwendung entsprechender Mausmutanten und geeigneter Tiermodelle bearbeitet. Erkenntnisse aus diesen Studien bilden die Grundlage für die Entwicklung alternativer therapeutischer Strategien. Die Effizienz der Applikation gentechnisch modifizierter Zellen evaluieren wir in entsprechenden Rattenmodellen des Morbus Parkinson und nach peripherer Nervenläsion im Hinblick auf die morphologische und funktionelle Integration der transplantierten Stamm-Zellen (Morbus Parkinson) und Schwann-Zellen (periphere Nerven).

Forschungsprojekte

Dysregulation des Aktin-Cytoskeletts bei der Spinalen Muskelatrophie - einer degenerativen Motoneuronenerkrankung bei Kindern

Die Spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine neurodegenerative Erkrankung der Motoneuronen im Vorderhorn des Rückenmarks. Die SMA führt in der schwersten Ausprägung (SMA Typ I) in der Regel innerhalb der ersten beiden Lebensjahre zum Tod der betroffenen Kinder. Die Patienten weisen eine Deletion - oder in einigen Fällen eine Mutation - des Survival of Motoneuron Gens 1 (SMN1) auf. Das SMN Protein wird ubiquitär exprimiert, es kommt jedoch zu einer selektiven Degeneration der spinalen Motoneurone. SMN ist unter anderem ein Assemblierungsprotein für small nuclear Ribonukleoprotein-Partikel (snRNPs), die eine wichtige Rolle beim Splicing spielen. Diese Funktion von SMN ist biochemisch gut untersucht, allerdings erklärt sie bisher nicht die Ursachen der Spinalen Muskelatrophie. Die Pathogenese der Erkrankung wird daher immer noch kontrovers diskutiert; ein einheitliches Modell, welches die verschiedenen Funktionen und Interaktionen des SMN-Proteins einbezieht, existiert bisher nicht. In den vergangenen Jahren wurden weitere Funktionen des SMN-Proteins beschrieben, so u. a. an der Stabilisierung neuromuskulärer Endplatten und an der Regulation des Aktin-Cytoskeletts.

Die Arbeitsgruppe hat in Vorarbeiten die axonale Funktion des Survival of Motoneuron (SMN) Proteins untersucht und eine neue Verbindung zum Aktin-Cytoskelett entdeckt. Dazu wurde ein Zellkulturmodell (PC12-Zellen) gewählt, das die Analyse der neuronalen Differenzierung unter dem Einfluss von SMN ermöglichte. Zunächst wurde die Expression von SMN und verschiedenen Assoziationspartnern untersucht. Dabei ließ sich ein Expressionsmuster beobachten, welches auf eine unabhängige Regulation von SMN im Vergleich zu snRNP-Proteinen hindeutet. Wir haben dann den Effekt von SMN auf das Neuritenwachstum untersucht. Durch siRNA war es möglich, ein Zellkulturmodell für die Spinale Muskelatrophie zu etablieren. Damit ließ sich zeigen, dass SMN einen positiv regulierenden Einfluss auf das Neuritenwachstum in einem Zell-autonomen Prozess ausübt. Das Fehlen von SMN führt zu kürzeren, eine Überexpression zu längeren Neuriten. Das unter knock-down Bedingungen zu beobachtende verkürzte Neuritenwachstum

kann interessanterweise durch Co-Expression des C-Terminus des SMN-Proteins funktionell wiederhergestellt werden (rescue). Damit lassen sich Splicing-Assemblierung, an der eine zentrale Domäne von SMN beteiligt ist, und Regulation des Neuritenwachstums (C-Terminus) funktionell voneinander trennen. Diese und weitere Daten deuten darauf hin, dass SMN mehrere Funktionen ausüben kann.

Ein wichtiger biochemischer Weg für die Regulation des Aktin-Cytoskeletts stellt der Rho-Kinase (ROCK) Weg dar. Verschiedene Zielproteine stromabwärts von ROCK zeigten in einem Zellkulturmodell mit herunterreguliertem SMN zwar keine Expressionsunterschiede, aber zwischen Kontrollen und SMA-Zellen differentielle Phosphorylierungen.

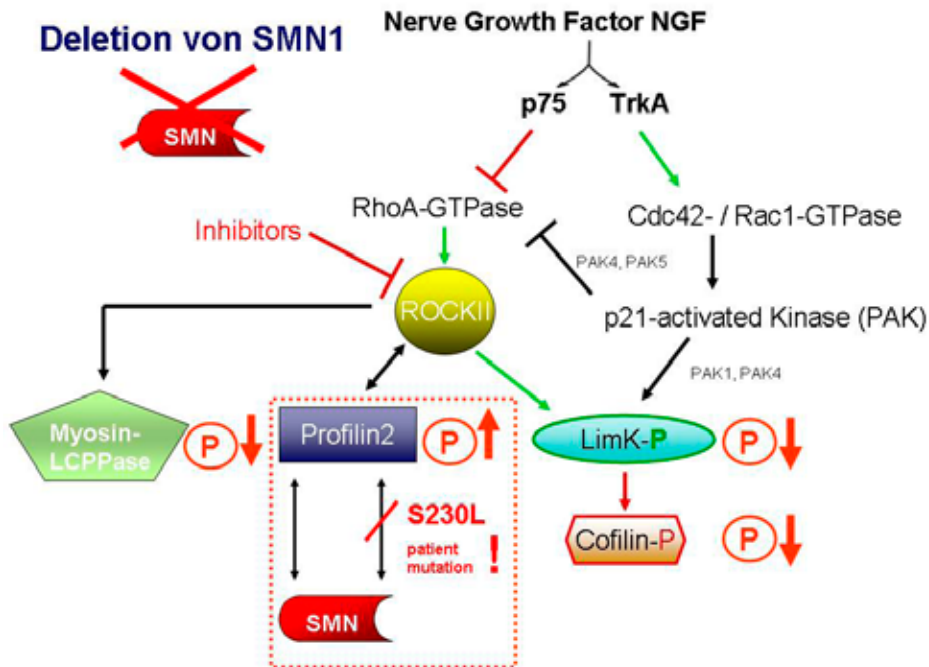


Abb. 1: Der Rho-Kinase (ROCK)-Signalweg. SMN-Verlust führt zu einer Hypophosphorylierung von Cofilin, LIMK und der Myosin-Light-Chain-Phosphatase (Myosin-LCPPase). Profilin verbindet SMN funktionell mit dem ROCK-Signalweg. Die in einer SMA-Patientin gefundene Punktmutation S230L verhindert die Bindung von Profilin an SMN und verursacht damit eine Dysregulation dieses Signalwegs (nach Nölle et al. (2011), Hum. Mol. Gen. 20: 4865-4878).

Stromaufwärts von ROCK konnten in vorangegangenen Analysen keine Unterschiede auf der Ebene der kleinen GTPasen gefunden werden. Es lag daher die Vermutung nahe, daß ROCK eine molekulare Schaltstelle bildet, über die eine SMN-Defizienz einen Effekt auf das Aktin-Cytoskelett ausüben kann. Als molekulare Brücke zwischen SMN und ROCK könnte dabei das Protein Profilin 2 dienen. Dieses Protein war bereits als SMN-Interaktionspartner beschrieben worden, aber auch als ein direkter Bindungspartner von ROCK. Unsere Arbeitsgruppe hat in einem neuartigen zellulären in vivo System nachweisen können, dass Profilin tatsächlich mit SMN interagiert. Die Bindungsstelle auf dem SMN-Protein konnte durch Deletionsanalysen eingrenzt werden. Profilin bindet an Prolin-Reste, so dass gezielte Mutagenesen mehrerer Prolin-Reste vorgenommen wurden. Das SMN-Protein weist im C-terminalen Bereich mehrere Poly-Prolin Sequenzen auf. Eine dieser Sequenzen konnte mit dem neuen Protein-Protein Interaktionsassay als wichtig

für die Profilin-Bindung bestimmt und damit erstmals der Poly-Prolin Region im SMN-Protein eine Funktion zugewiesen werden. Interessanterweise wurde in unmittelbarer Nähe eine Punktmutation eines Serin-Restes bei einer SMA-Patientin Typ II gefunden. Diese Punktmutation und weitere Punktmutationen des SMN-Proteins wurden generiert und im Protein-Interaktionsassay getestet. Dabei zeigte sich, dass nur bei Veränderung des Serin-Restes 230 in einen Leucin-Rest in der Nähe der Poly-Prolin-Sequenz eine Abnahme der Profilin-Bindung gefunden werden konnte. Dies unterstreicht die Bedeutung der Befunde. Hinsichtlich der Verteilung der mutierten Proteine im Zellkern zeigten sich keine Unterschiede zum Wildtyp-Protein, wohl aber hinsichtlich der neuronalen Differenzierung. Die Serin-Mutante wies hier ein deutlich verringertes Neuritenwachstum - welches als morphologisches Kriterium für neuronale Differenzierung herangezogen wurde - auf. Profilin ist selbst ein Substrat von ROCK und wird differentiell phosphoryliert. Vorarbeiten hatten gezeigt, dass es in einem zellulären SMA-Modell zu einer Hyperphosphorylierung kommt. Wir konnten nun im Rückenmark von SMA-Mäusen diesen Effekt ebenfalls deutlich beobachten. Da kein anti-Phospho-Profilin-Antikörper verfügbar war, wurden diese Analysen in einem 2D-Gelsystem durchgeführt. Es ließ sich ebenfalls zeigen, daß die Phosphorylierung von Profilin das Neuritenwachstum beeinflusst. Dazu wurden Mutanten hergestellt und getestet, die eine konstitutive bzw. eine fehlende Phosphorylierung simulierten. Diese Befunde gestatten einen neuen Blick auf die molekulare Pathogenese der Spinalen Muskelatrophie und definieren eine potentielle Zielstruktur für eine therapeutische Intervention. Am Projekt waren insgesamt 20 Wissenschaftlerinnen und Wissenschaftler deutscher Hochschulen beteiligt, darunter die MHH mit den Instituten für Neuroanatomie, Physiologische Chemie, Toxikologie und Neurophysiologie sowie Arbeitsgruppen der Universitäten Göttingen, Würzburg und Köln.

Nölle A., Zeug A., van Bergeijk J., Tönges L., Gerhard R., Brinkmann H., Al Rayes S., Hensel N., Schill Y., Apkhazava D., Jablonka S., Omer J., Srivastav R.K., Baasner A., Lingor P., Wirth B., Ponimaskin E., Niedenthal R., Grothe C., Claus P. (2011): The Spinal Muscular Atrophy disease protein SMN is linked to the Rho-kinase pathway via profilin. *Human Molecular Genetics* 20: 4865-4878.

■ Projektleitung: Claus, Peter (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Institute für Neurophysiologie, Toxikologie und Physiologische Chemie der MHH; Förderung: MWK-Graduiertenförderung durch das ZSN Hannover; Röchling-Stiftung

Weitere Forschungsprojekte

Etablierung Polysialinsäure-basierter Gerüste als Nervenimplantate

■ Projektleitung: Grothe, Claudia (Prof. Dr.); Förderung: DFG-Forschergruppe (2 Projekte: 548/20-3, 548/20-4)

Molekulare Analyse des FGF-2-Systems während der Entwicklung dopaminerger Neurone

■ Projektleitung: Grothe, Claudia (Prof. Dr.); Förderung: DFG-Normalverfahren

Biohybride Nerveninterponate zur Steigerung der peripheren Nervenregeneration

■ Projektleitung: Grothe, Claudia (Prof. Dr.); Haastert-Talini, Kirsten (Prof. Dr.); Förderung: European Commission EU-FP7-HEALTH-2011-278612 (Koordination MHH)

Pathogenese der Spinalen Muskelatrophie, einer neurodegenerativen Motoneuronen-Erkrankung

■ Projektleitung: Claus, Peter (Prof. Dr.); Förderung: MWK-Graduiertenförderung durch das ZSN Hannover

Entwicklung einer Therapie der Spinalen Muskelatrophie durch Inhibition der Rho-Kinase

■ Projektleitung: Claus, Peter (Prof. Dr.); Förderung: Philipp & Freunde - SMA Deutschland e.V.

Bedeutung des neurotrophen Faktors FGF-2 bei der Amyotrophen Lateralsklerose - Untersuchungen an Doppelmausmutanten

■ Projektleitung: Grothe, Claudia (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Petri, Susanne (Prof. Dr.); Förderung: Deutsche Gesellschaft für Muskelkranke e.V. (DGM)

Entwicklung eines „intelligenten“ Nerveninterponates

■ Projektleitung: Haastert-Talini, Kirsten (Prof. Dr.); Förderung: Internationale Stiftung Neurobionik

Evaluation des Effektes eines Peptidfragmentes des C3bot-Proteins auf die Regeneration peripherer Nerven

■ Projektleitung: Haastert-Talini, Kirsten (Prof. Dr.); Kooperationspartner: Just, Ingo (Prof. Dr.); Förderung: Stiftung Sibylle Assmus

Originalpublikationen

Haastert-Talini K, Schmitte R, Korte N, Klode D, Ratzka A, Grothe C. Electrical Stimulation Accelerates Axonal and Functional Peripheral Nerve Regeneration across Long Gaps. *J Neurotrauma* 2011;28(4):661-674

Heurich B, El Idrissi NB, Donev RM, Petri S, Claus P, Neal J, Morgan BP, Ramaglia V. Complement upregulation and activation on motor neurons and neuromuscular junction in the SOD1 G93A mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis. *J Neuroimmunol* 2011;235(1-2):104-109

Huelsenbeck SC, Rohrbeck A, Handreck A, Hellmich G, Kiaei E, Roettinger I, Grothe C, Just I, Haastert-Talini K. C3 Peptide Promotes Axonal Regeneration and Functional Motor Recovery after Peripheral Nerve Injury. *Neurotherapeutics* 2012;9(1):185-198

Jungnickel J, Eckhardt M, Haastert-Talini K, Claus P, Bronzlik P, Lipokatic-Takacs E, Maier H, Gieselmann V, Grothe C. Polysialyltransferase-overexpression in Schwann cells mediates different effects during peripheral nerve regeneration. *Glycobiology* 2012;22(1):107-115

Korte N, Schenk HC, Grothe C, Tipold A, Haastert-Talini K. Evaluation of periodic electrodiagnostic measurements to monitor motor recovery after different peripheral nerve lesions in the rat. *Muscle Nerve* 2011;44(1):63-73

Kreutzer M, Seehusen F, Kreutzer R, Pringproa K, Kummerfeld M, Claus P, Deschl U, Kalkul A, Beineke A, Baumgärtner W, Ulrich R. Axonopathy Is Associated with Complex Axonal Transport Defects in a Model of Multiple Sclerosis. *Brain Pathol* 2011;DOI: 10.1111/j.1750-3639.2011.00541.x

Meixner M, Jungnickel J, Grothe C, Gieselmann V, Eckhardt M. Myelination in the absence of UDP-galactose:ceramide galactosyltransferase and fatty acid 2-hydroxylase. *BMC Neurosci* 2011;12:22

Nölle A, Zeug A, van Bergeijk J, Tönges L, Gerhard R, Brinkmann H, Al Rayes S, Hensel N, Schill Y, Apkhazava D, Jablonka S, Omer J, Srivastav RK, Baasner A, Lingor P, Wirth B, Ponimaskin E, Niedenthal R, Grothe C, Claus P. The Spinal Muscular Atrophy disease protein SMN is linked to the Rho-kinase pathway via profilin. *Hum Mol Genet* 2011;20(24):4865-4878

Ratzka A, Baron O, Grothe C. FGF-2 Deficiency Does Not Influence FGF Ligand and Receptor Expression during Development of the Nigrostriatal System. *PLoS One* 2011;6(8):e23564

Ratzka A, Kalve I, Özer M, Nobre A, Wesemann M, Jungnickel J, Köster-Patzlaff C, Baron O, Grothe C. The co-layer method as an efficient way to genetically modify mesencephalic progenitor cells transplanted into 6-OHDA rat model of Parkinson's disease. *Cell Transplant* 2011;DOI: 10.3727/096368911X586774

Seitz M, Grosheva M, Skouras E, Angelova SK, Ankerne J, Jungnickel J, Grothe C, Klimaschewski L, Hubbers CU, Dunlop SA, Angelov DN. Poor functional recovery and muscle polyinnervation after facial nerve injury in fibroblast growth factor-2(-/-) mice can be improved by manual stimulation of denervated vibrissal muscles. *Neuroscience* 2011;182:241-247

Übersichtsarbeiten

Haastert-Talini K. Gene therapy approaches for neuroregeneration. *Curr Gene Ther* 2011;11(2):74

Buchbeiträge, Monografien

Haastert-Talini K. „Experimental approaches on tissue engineering repair of peripheral nerve gaps“. In: Fonseca DJ, Martins JL[Hrsg.]: *The sciatic nerve: blocks, injuries, and regeneration*. Hauppauge, N.Y.: Nova Science, 2011. S. 209-224

Abstracts

2011 wurden 13 Abstracts publiziert.

Promotionen

Baron, Olga (Dr. rer. nat.): Role of basic fibroblast growth factor (FGF-2) during development of mesencephalic dopaminergic neurons of substantia nigra in mice.

Master

Schill, Yvonne (M.Sc.): Regulation des Myosin-Systems bei der Spinalen Muskelatrophie.

Stipendien

Hensel, Niko (Dipl.-Biochem.): Doktorandenstipendium der Studienstiftung des Deutschen Volkes.

Baron, Olga (Dipl.-Biol.): Reisestipendium der GlaxoSmithKline-Stiftung.

Hensel, Niko (Dipl.-Biochem.): Reisestipendium der Initiative SMA.

Hettwer, Timo (cand. med.): Structmed MHH.

Wissenschaftspreise

Förthmann, Benjamin (Dipl.-Biochem.): Posterpreis der Patientenorganisationen SMA Trust und Jennifer Trust for SMA für "The intranuclear mobility and neuronal differentiation capacity of the Survival of Motoneuron protein is regulated by FGF-2".

Weitere Tätigkeiten in der Forschung

Grothe, Claudia (Prof. Dr.): Mitglied im Kuratorium der Stiftung Sibylle Assmus; gutachterliche Tätigkeiten für die DFG und andere Organisationen der Forschungsförderung; Gutachter für diverse Fachjournale.

Claus, Peter (Prof. Dr.): Gutachter für die DFG und andere Organisationen der Forschungsförderung; gutachterliche Tätigkeiten für diverse Fachjournale.

Haastert-Talini, Kirsten (Prof. Dr.): Gutachterliche Tätigkeiten für Forschungsförderung und diverse Fachjournale.