

# INAUGURAL - DISSERTATION

zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der  
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der  
Ruprecht - Karls - Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Diplom- Biologin t.o. Nadine Conzelmann  
aus Albstadt

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2011



**Untersuchungen zur pharmakologischen Anwendbarkeit  
des Wachstumsfaktors G-CSF in einem Modell für  
hereditäre Neuropathien**

Gutachter: Prof. Dr. Gert Fricker

Prof. Dr. Armin Schneider



Für meine Eltern

# INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGEN .....	1
1 ZUSAMMENFASSUNG .....	4
SUMMARY .....	5
2 EINLEITUNG.....	6
2.1 Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF) .....	6
2.1.1 Struktur von G-CSF .....	6
2.1.2 G-CSF Rezeptor .....	7
2.1.3 Signalwege .....	9
2.1.4 Wirkungsweise .....	11
2.1.5 G-CSF Peptide.....	13
2.2 Mimetische Peptide .....	14
2.3 Split TEV Assay .....	15
2.3.1 TEV-Protease .....	15
2.3.2 Transkriptionsfaktor Gal4-VP16 (GV) .....	17
2.3.3 Luciferasen .....	17
2.3.3.1 Firefly-Luciferase .....	17
2.3.3.2 Renilla Luciferase .....	18
2.3.4 Das grundlegende Prinzip des Split-TEV Assays .....	18
2.4 Charcot-Marie-Tooth Krankheit .....	19
2.4.1 Symptome und Diagnose .....	19
2.4.2 Klassifizierung .....	20
2.4.3 CMT1A .....	21
2.4.4 Behandlung und Therapieansätze.....	22
2.5 Ziele der Doktorarbeit .....	23
3 MATERIAL UND METHODEN.....	25
3.1 Materialien .....	25
3.1.1 Geräte .....	25
3.1.2 Chemikalien .....	26
3.1.3 Puffer und Lösungen .....	28
3.1.4 Medien und Reagenzien .....	29
3.1.4.1 Zellkultur-Medien und –Zusätze.....	29
3.1.4.2 Medien für Bakterien .....	30

3.1.4.3	Prokaryotische Zellen .....	30
3.1.4.4	Eukaryotische Zelllinien .....	30
3.1.5	Vektoren .....	31
3.1.5.1	Klonierungsvektoren .....	31
3.1.5.2	Dest-Vektoren .....	31
3.1.6	Antikörper .....	34
3.1.7	Enzyme .....	34
3.1.8	DNA- und Proteinmarker .....	34
3.1.9	Oligonucleotide .....	35
3.1.10	Tiere .....	37
3.2	Methoden .....	38
3.2.1	Mikrobiologische Techniken .....	38
3.2.1.1	Transformation .....	38
3.2.2	Molekularbiologische Techniken .....	38
3.2.2.1	DNA .....	38
3.2.2.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini-Prep) .....	38
3.2.2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien in großem Maßstab (Maxi-Prep) .....	38
3.2.2.1.3	Isolierung genomischer DNA aus Mausschwänzen .....	39
3.2.2.1.4	DNA-Gelelektrophorese .....	39
3.2.2.1.5	PCR (Polymerasekettenreaktion) .....	39
3.2.2.1.6	Genotypisierung des Stammes B6.D2-Pmp22 <sup>Tr-J</sup> /J .....	40
3.2.2.1.7	Gateway Klonierung .....	41
3.2.2.1.8	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	43
3.2.2.1.9	DNA-Sequenzierung .....	43
3.2.2.2	RNA .....	43
3.2.2.2.1	RNA-Isolierung .....	43
3.2.2.2.2	Herstellung Erststrang cDNA .....	43
3.2.2.2.3	Real-Time PCR (quantitative PCR, qPCR) .....	44
3.2.2.2.4	Reverse Transcription (RT) PCR .....	45
3.2.3	Zellbiologische Techniken .....	45
3.2.3.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	45
3.2.3.2	Ernte der Zellen und Bestimmung der Zellzahl .....	46
3.2.3.3	Herstellung stabiler eukaryotischer Zelllinien .....	46
3.2.3.4	Cytotoxizitätsassay .....	47
3.2.3.5	Stimulationsversuche mit G-CSF .....	47
3.2.3.6	G-CSF abhängiger Viabilitätsassay .....	47
3.2.3.7	Split TEV Assay .....	48
3.2.4	Proteine .....	48
3.2.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	48
3.2.4.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese: SDS-PAGE .....	49
3.2.4.3	Western Blot .....	49
3.2.4.4	Immuncytochemie (ICC) .....	50
3.2.4.5	Peptidbibliothek von humanem G-CSF .....	51
3.2.4.6	Screening von einzelnen G-CSF Peptiden .....	51

3.2.4.7	Screening von Peptidblöcken.....	52
3.2.5	Tierexperimente .....	53
3.2.5.1	Behandlungsprotokoll.....	53
3.2.5.2	Motorische Verhaltenstests.....	53
3.2.5.2.1	Griffstärke Test (Grip Strength test).....	53
3.2.5.2.2	Rotarod .....	54
3.2.5.2.3	Neuroscore.....	55
3.2.5.3	Gewicht .....	56
3.2.6	Statistik.....	57
4	ERGEBNISSE .....	58
4.1	Screening einer Peptidbibliothek des hämatopoetischen Wachstumsfaktors .....	
	G-CSF.....	58
4.1.1	Etablierung eines Split-TEV basierten Assays.....	58
4.1.1.1	Klonierung direkter Interaktionspartner des G-CSF Rezeptors und Generierung verschiedener Split-TEV Varianten.....	58
4.1.1.2	Etablierung und Optimierung des Split-TEV basierten Assays auf transienter Ebene.....	59
4.1.1.3	Etablierung und Optimierung des Split-TEV basierten Assays in stabilen Zelllinien .....	61
4.1.1.4	Klonierung von Scaffold-Proteinen zur weiteren Etablierung und Optimierung des Split-TEV basierten Assays .....	65
4.1.2	Peptidscreening mit der G-CSF abhängigen Zelllinie NFS-60.....	67
4.1.2.1	Entwicklung eines Screening Assays basierend auf der Abhängigkeit von G-CSF .....	67
4.1.2.2	Screening von einzelnen Peptiden .....	68
4.1.2.3	Screening von Peptiden in einem Multiplex-Ansatz .....	72
4.2	Untersuchung zur Wirkung von G-CSF in einem Mausmodell für CMT1A.....	74
4.2.1	Expression des G-CSF-R <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....	74
4.2.2	G-CSF aktiviert anti-apoptotische Signalwege in der Schwanzzelllinie .....	
	RSC-96.....	76
4.2.3	Effekte einer G-CSF Behandlung in Trembler-J Mäusen.....	78
5	DISKUSSION.....	84
5.1	Screening einer Peptidbibliothek des hämatopoetischen Wachstumsfaktors .....	
	G-CSF.....	84
5.2	Untersuchung zur Wirkung von G-CSF in einem Mausmodell für CMT1A.....	86
5.2.1	Effekte von G-CSF in der Schwanzzelllinie RSC96 .....	86
5.2.2	Effekte einer G-CSF Behandlung in Trembler-J Mäusen.....	86
6	SCHLUSSFOLGERUNG.....	89
7	REFERENZEN .....	90
	ANMERKUNG.....	98

EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	99
DANKSAGUNG.....	100

# ABKÜRZUNGEN

ALS	Amyotrophe Lateralsklerose
Akt	Proteinkinase B
ATP	Adenosintriphosphat
AX200	G-CSF ( <i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i> )
bp	<i>basepair</i> , Basenpaare
BC	C-terminale Domäne von CRH
BCA	Bincinchoninsäure
Bcl-xL	<i>B-cell lymphoma-extra large</i>
BN	N-terminale Domäne von CRH
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CMT	Charcot-Marie-Tooth Krankheit
CMV	Cytomegalie Virus
CRH	<i>cytokine receptor homologous</i> Domäne
CTEV	C-terminales Fragment der TEV Protease
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxynukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure Dinatriumsalz
EPO	Erythropoietin
ERK 1/2	<i>extracellular signal-regulated kinase 1/2</i>
FCS	Foetales Kälberserum
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
FRluc	Firefly Luciferase
fullTEV	aktive und vollständige TEV Protease
GAB2	<i>GRB2-associated binding protein 2</i>

G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
G-CSF-R	<i>Granulocyte colony stimulating factor receptor</i>
GV	Gal4-VP16, künstlicher Transkriptionsfaktor
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
Hu	Human
IL6	Interleukin 6
JAK2	Januskinase 2
kDa	Kilodalton
LB	<i>lysogeny broth</i>
Lyn	<i>Lck/ yes- related novel tyrosine kinase</i>
mM	millimolar
M	Molar
MAPK	<i>mitogen-activated proten kinase</i>
MAP2K 1/ 2 /	<i>mitogen-activated proten kinase kinase 1/2</i>
MEK 1/ 2	MAP ERK Kinase
MEM	Minimum Essential Medium Eagle
NCAM	<i>neural cell adhesion molecule</i>
nM	nanomolar
NIa Protease	<i>nuclear inclusion</i> Protease
NT-3	Neurotrophin-3
NTEV	N-terminales Fragment der TEV-Protease
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
pM	picomolar
Pmp22	Peripheres Myelinprotein 22 kDa
PNS	Peripheres Nervensystem
PPI	Protein-Protein Interaktion
PTK	Proteintyrosinkinase
Rb	<i>rabbit</i> , Kaninchen
RNA	Ribonukleinsäure

Rpm	<i>Rounds per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RLU	<i>relative luminescence units</i>
RT	Raumtemperatur
SCI	<i>spinal cord injury</i> , Rückenmarksverletzung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>standard error of mean</i> , Standardfehler
Socs3	<i>suppressor of cytokine signaling 3</i>
STAT 3	<i>signal transducer and activator of transcription 3</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEV	<i>tobacco etch virus</i> , Tabakmosaik-Virus; hier: Protease des Tabakmosaik-Virus
tevS	tev Site, hochspezifische Schnittstelle der TEV Protease
TM-TEV	transmembrane TEV-Protease
Tris	Tris-(hydroxymethyl-) aminoethan
Tr-J	Trembler-J
WT	Wildtyp

# 1 ZUSAMMENFASSUNG

Der Granulozyten Kolonie-stimulierende Faktor (G-CSF) ist allgemein als hämatopoetischer Wachstumsfaktor bekannt. Vor einigen Jahren wurde ihm neben dieser bekannten Rolle ein zusätzliches, neues Wirkungsspektrum als neuronaler Wachstumsfaktor im Zentralen Nervensystem (ZNS) zugeschrieben. Da chronische, neurologische Erkrankungen eine lebenslange, medikamentöse Behandlung erfordern, wirken sich die mäßige Halbwertszeit und die erheblichen Produktionskosten im Fall von G-CSF nachteilig aus. Pharmakologische Weiterentwicklungen von Proteinen stellen agonistische Peptidliganden dar, wie sie für eine Vielzahl von Wachstumsfaktor-Rezeptoren identifiziert wurden. Aus diesem Grund wurde ein Screening für agonistisch wirkende G-CSF-Peptide, abgeleitet von der Sequenz des humanen G-CSF, durchgeführt. Trotz der hohen Sensitivität des zellbasierten Assays konnte keine agonistische Aktivität der 20 mer Peptide allein oder in einem Multiplex-Ansatz detektiert werden. Möglicherweise sind größere, zusammenhängende Teile des Proteins oder dimerisierende Peptide nötig, um eine Aktivierung des Rezeptors zu erreichen.

Neben seinen neuroprotektiven und pro-regenerativen Effekten wurde untersucht, ob diese Wirkung von G-CSF auch auf Schwannzellen und periphere Demyelinisierungen übertragbar ist. Als Modell für periphere Neuropathien wurde die Charcot-Marie-Tooth 1A (CMT1A) Krankheit ausgewählt. Bei dieser Erkrankung handelt es sich um eine der am häufigsten auftretenden hereditären Neuropathien, für die es bis zum heutigen Zeitpunkt keine effektive Behandlung gibt. Der G-CSF Rezeptor wurde von der Schwannzelllinie RSC96 exprimiert und G-CSF aktivierte in der selbigen anti-apoptotische Signalwege. Trembler-J Mäuse, ein Tiermodell für CMT1A, wurden daher mit G-CSF (30 mg/kg/Tag mit Hilfe von osmotischen Pumpen abgegeben) für drei Monate behandelt und unterliefen einer Anzahl von Verhaltenstests. Trotz der Aktivierung anti-apoptotischer Signalwege *in vitro* konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der behandelten und unbehandelten Tiergruppe *in vivo* beobachtet werden. G-CSF veränderte bei Konzentrationen, die in anderen Modellen für neurologische Erkrankungen verwendet wurden, nicht den Krankheitsverlauf der Trembler-J Tiere, weswegen angenommen werden muss, dass G-CSF kein offenkundiger Kandidat für die Behandlung von CMT1A und möglicherweise auch von peripheren Neuropathien ist.

## SUMMARY

Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) is commonly known as hematopoietic growth factor. Some years ago an additional, novel impact as neuronal growth factor in the central nervous system (CNS) was put down to its known role. As chronic diseases require a lifelong, medicinal care, the moderate plasma half-life time and the considerable production costs in the case of G-CSF do affect adversely. Pharmacological further developments of proteins display agonistic peptide ligands like described for a number of growth factor receptors. Because of this reason a screen for peptide agonists derived from the sequence of human G-CSF was conducted. Despite the high sensitivity of the cell based assay no agonistic activity of 20 mer peptides alone or in multiplex approaches could be detected. One concludes that larger coherent parts of the protein or dimerising peptides may be needed to achieve activation of the receptor.

Besides its neuroprotective and pro-regenerative effects it was analysed, if this impact of G-CSF could be conferred on Schwann cells and peripheral demyelinations. As a model for peripheral neuropathies Charcot-Marie-Tooth 1A (CMT1A) disease was chosen. This disease is one of the most common hereditary neuropathies with no effective treatment available yet. The G-CSF receptor was expressed by the RSC96 Schwann cell line, and G-CSF evoked anti-apoptotic pathways in the cell line. Trembler-J mice, an animal model for CMT1A, were therefore treated with G-CSF (30 mg/kg/day delivered by subcutaneous pumps) for three months and followed by a number of behavioural tests. In spite of the activation of anti-apoptotic pathways *in vitro*, no significant differences between treated and untreated animal groups could be observed *in vivo*. One concludes that G-CSF at concentrations that have shown effects in other models of chronic neurological conditions did not alter the disease course of the Trembler-J model, and therefore does not appear as an evident drug candidate for CMT1A and potentially peripheral neuropathies.

## 2 EINLEITUNG

### 2.1 Granulocyte Colony Stimulating Factor (G-CSF)

Der Granulozyten-Kolonie Stimulierende Faktor (G-CSF, *Granulocyte Colony Stimulating Factor*) ist ein pleiotrop wirkendes Peptidhormon und spielte im Rahmen dieser Doktorarbeit eine zentrale Rolle. In den folgenden Kapiteln wird die Struktur von G-CSF, der spezifische Rezeptor, die Signalgebung durch den Rezeptor und die Wirkungsweise von G-CSF näher beschrieben.

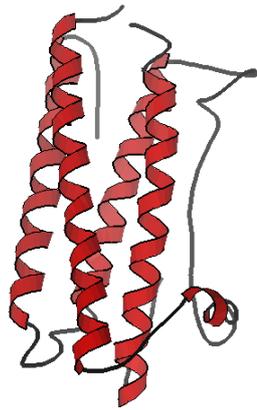
#### 2.1.1 Struktur von G-CSF

Bei G-CSF handelt es sich um ein 19,6 kDa schweres Protein, das Mitglied einer Familie von Hormon-ähnlichen Glykoproteinen ist [1]. Das Protein wurde als Serumfaktor im Zusammenhang mit der Differenzierung der murinen myelomonozytisch leukämischen Zelllinie WEHI-3B entdeckt [2, 3]. Der Wachstumsfaktor wird von einer Vielzahl von unterschiedlichen Geweben exprimiert. Dazu gehören unter anderem Fibroblasten, Endothelzellen, Monozyten, Makrophagen, Knochenmarkzellen und Neuronen [4-7]. Humanes G-CSF (huG-CSF) ist 207 Aminosäuren lang mit einer 29 Aminosäuren langen hydrophoben Signalsequenz (siehe Abbildung 1) [1].

10	20	30	40	50	60
MAGPATQSPM	KLMAIQLLLW	HSALWTVQEA	TPLGPASSLP	QSFLKCLEQ	VRKIQGDGAA
70	80	90	100	110	120
LQEKLVSECA	TYKLCHPEEL	VLLGHSLGIP	WAPLSSCPSQ	ALQLAGCLSQ	LHSGFLYQG
130	140	150	160	170	180
LLQALEGISP	ELGPTLDTLQ	LDVADFATTI	WQMEELGMA	PALQPTQGAM	PAFASAFQRR
190	200				
AGGVLVASHL	QSFLEVSYRV	LRHLAQP			

Abbildung 1 Proteinsequenz von humanem G-CSF (Swiss-Prot: P0991)

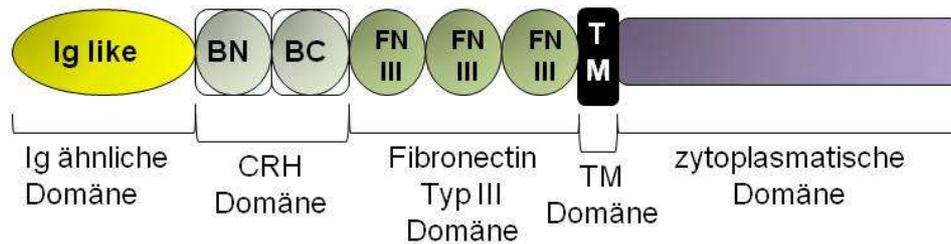
Die Struktur von huG-CSF wurde Anfang der 90er Jahre durch Röntgenstrukturanalyse und NMR Spektroskopie entschlüsselt. Die Faltung des Proteins ähnelte dabei der Faltung anderer humaner Wachstumsfaktoren: G-CSF besteht aus vier gebündelten Helixstrukturen, wobei die Helices A und B parallel zueinander und antiparallel zu den Helices C und D verlaufen (*up-up-down-down* Verknüpfung). Eine zusätzliche kurze Helix verknüpft die beiden Helices A und B miteinander. Untereinander sind die Helices über sogenannte *loops* verbunden [8, 9]. In Abbildung 2 [9] ist die Struktur von huG-CSF in Form eines Bändermodells dargestellt:



**Abbildung 2 Bändermodell von humanem G-CSF.** *Humanes G-CSF besteht aus vier Helices, wobei Helix A und B parallel und Helix C und D antiparallel zu den anderen beiden Helices verlaufen. Untereinander sind die Helices über sogenannte loops verbunden.*

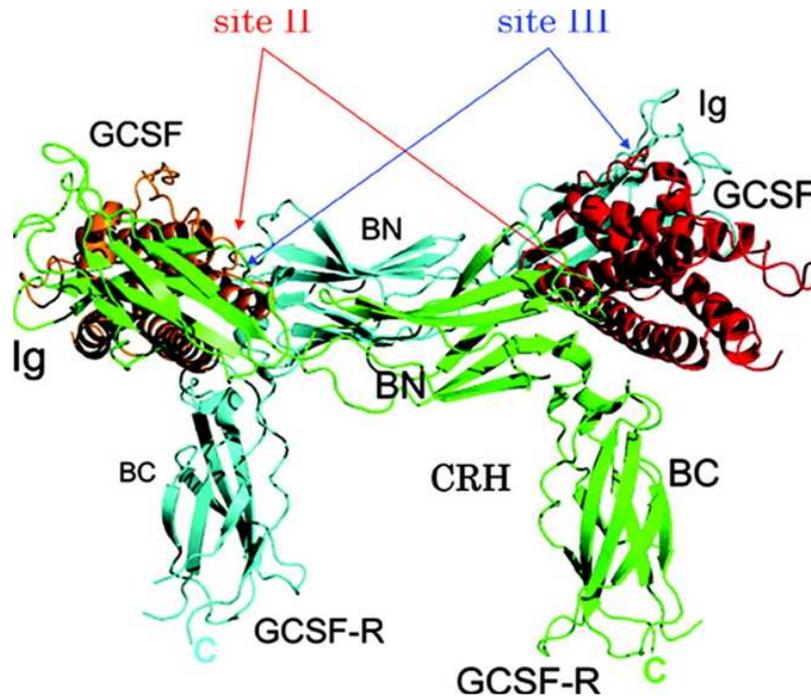
### 2.1.2 G-CSF Rezeptor

Der humane G-CSF Rezeptor (G-CSF-R) gehört zur Klasse I der Zytokinrezeptorfamilie. Er besteht aus 812 Aminosäuren und setzt sich aus einer extrazellulären, einer transmembranen und einer zytoplasmatischen Domäne zusammen. Die extrazelluläre Domäne besteht aus einer Ig-ähnlichen Domäne, einer Zytokinrezeptor-homologen (*cytokine receptor homologous*, CRH) Domäne und drei Fibronectin Typ III ähnlichen Domänen. Die CRH Domäne ist weiter unterteilt in eine cysteinreiche N-terminale (BN) und C-terminale (BC) Domäne (siehe Abbildung 3) [10-12].



**Abbildung 3 Sekundärstruktur des G-CSF-R.** Der G-CSF-R besteht aus einer extrazellulären, transmembranen und zyttoplasmatischen Domäne. Die extrazelluläre Domäne setzt sich aus der Ig ähnlichen Domäne, der CRH Domäne und drei Fibronectin Typ III Domänen zusammen. BN (N-terminale cysteinreiche Domäne) und BC (C-terminale cysteinreiche Domäne) sind die beiden Bestandteile der CRH Domäne.

Die Erkennung des Rezeptors durch G-CSF erfolgt durch die sogenannte größere (*major site, site II*) und kleinere (*minor site, site III*) Bindungsstelle des Rezeptors. Die Bindung von humanem G-CSF (huG-CSF) an den humanen G-CSF-R (huG-CSF-R) erfolgt, indem ein Komplex mit einer 2:2 Stöchiometrie gebildet wird. Dabei überkreuzen sich die beiden Ig ähnlichen Domänen des huG-CSF-R und binden zwei Moleküle huG-CSF [13]. Diese Form der Komplexbildung ist ähnlich der des IL-6:gp130 Komplexes. Die „cross-over“ Struktur der Ig-ähnlichen Domänen ist dabei entscheidend für die Aktivierung des humanen Rezeptors (siehe Abbildung 4) [13].



**Abbildung 4** Übersicht des 2:2 huG-CSF:huG-CSF-R Komplex (Ig-CRH Domäne). Der G-CSF: G-CSF-R Komplex wird durch Überkreuzung beider Ig-ähnlichen Domänen des Rezeptors mit humanem G-CSF gebildet. Die beiden humanen G-CSF Moleküle sind in rot und orange dargestellt, wohingegen die beiden Moleküle des humanen G-CSF-R in grün und türkis dargestellt sind. CRH=cytokine receptor homologous domain, BC=C-terminale Domäne der CRH-Domäne, BN=N-terminale Domäne der CRH-Domäne, site II=major site, site III=minor site [13]

### 2.1.3 Signalwege

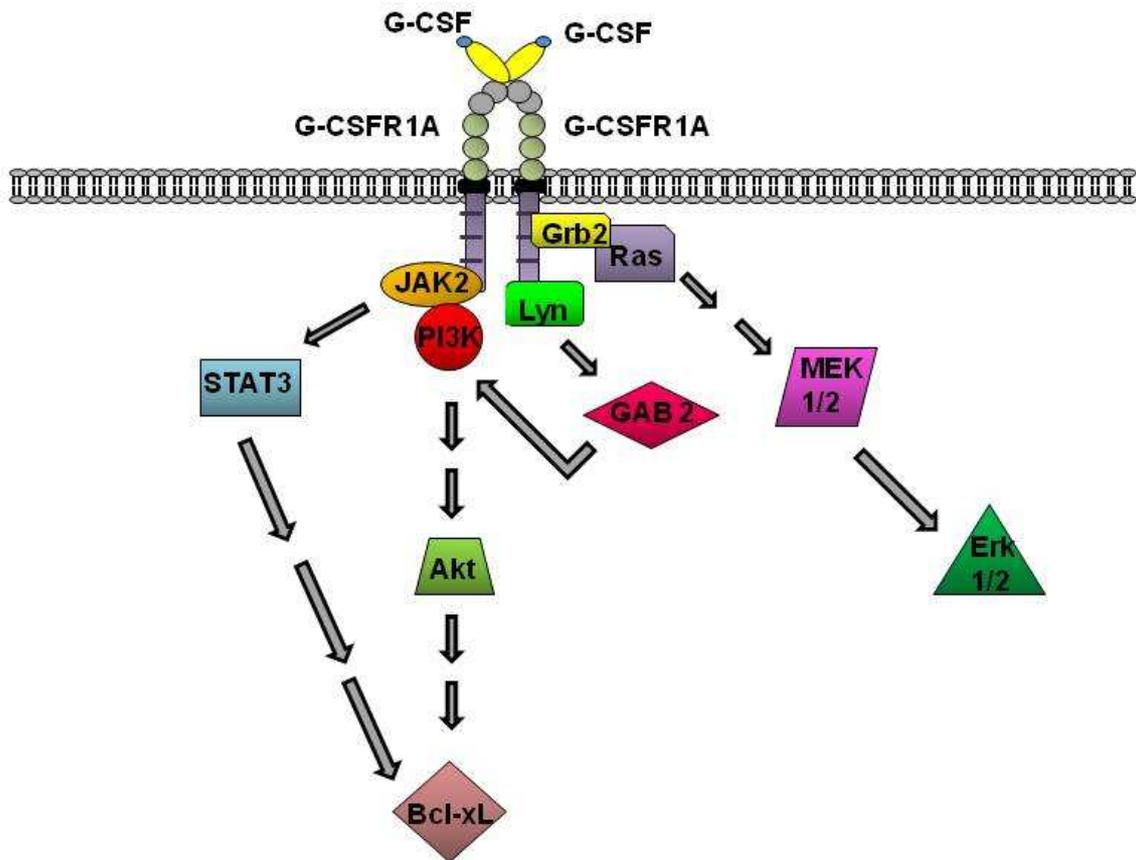
Durch die Bindung von G-CSF an die extrazellulären Ig-ähnlichen und CRH-Domänen des G-CSF-R kommt es zur Homodimerisierung mit einem weiteren G-CSF-R: G-CSF Komplex [13]. Die Tyrosinreste in der zytoplasmatischen Domäne des aktivierten Rezeptors besitzen wie viele Rezeptoren der Familie der Wachstumsfaktoren keine intrinsische enzymatische Funktion und werden von Proteintyrosinkinassen (PTK) phosphoryliert [14, 15]. Nach der Phosphorylierung des G-CSF-R phosphorylieren sich die PTKs selbst und lösen dann zahlreiche Signalkaskaden aus, wie beispielsweise die von STAT1 und 3, PI3K/Akt und Ras/Mek/Erk1/2 (siehe Abbildung 5) [16-19]. Diese Signalwege haben unter anderem Einfluss auf den Zellzyklus, den Metabolismus, die Proliferation, die Differenzierung und das Überleben der Zelle.

Eine dieser PTKs ist JAK2 (Januskinase 2). Diese Kinase interagiert direkt mit dem G-CSF-R, phosphoryliert diesen, und danach sich selbst. Einerseits kann JAK2 den Transkriptionsfaktor STAT3 (*signal transducer and activator of transcription 3*) aktivieren [20, 21], der die Expression anti-apoptotischer Proteine wie beispielsweise Bcl-xL (*B-cell*

*lymphoma-extra large*) reguliert, andererseits kann JAK2 aber auch PI3K (Phosphoinositid 3-Kinase) phosphorylieren und damit auch Akt aktivieren [22, 23].

Ein weiterer direkter Interaktionspartner des G-CSF-R ist die PTK Lyn (*lck/ yes related novel tyrosine kinase*). Sie gehört wie Hck (*Hemopoietic cell kinase*) zu einer Familie von Src Kinasen und phosphoryliert das Protein GAB2 (*GRB2-associated binding protein 2*). GAB2 ist ein Adaptorprotein, das wiederum den PI3K/ Akt Signalweg aktivieren kann [24-26].

Ein weiterer Signalweg, der über den G-CSF-R ausgelöst werden kann, ist der Ras/MEK/ERK1/2 Signalweg. Ras bindet dabei an das Adaptorprotein Grb2, das direkt mit dem Rezeptor interagiert, und wird dadurch auch selber aktiviert. Ras gehört zu einer Proteinunterfamilie von kleinen GTPasen, die die MAP2K1/ 2 (*mitogen-activated protein kinase kinase*), die auch als MEK1/ 2 bezeichnet wird, aktivieren kann. MEK1/2 wiederum kann ERK1/2 (*extracellular signal-regulated kinases*) aktivieren. Die Kinase ist auch als MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) bekannt, kann wiederum Transkriptionsfaktoren aktivieren und hat unter anderem Einfluss auf den Zellzyklus [27-30].

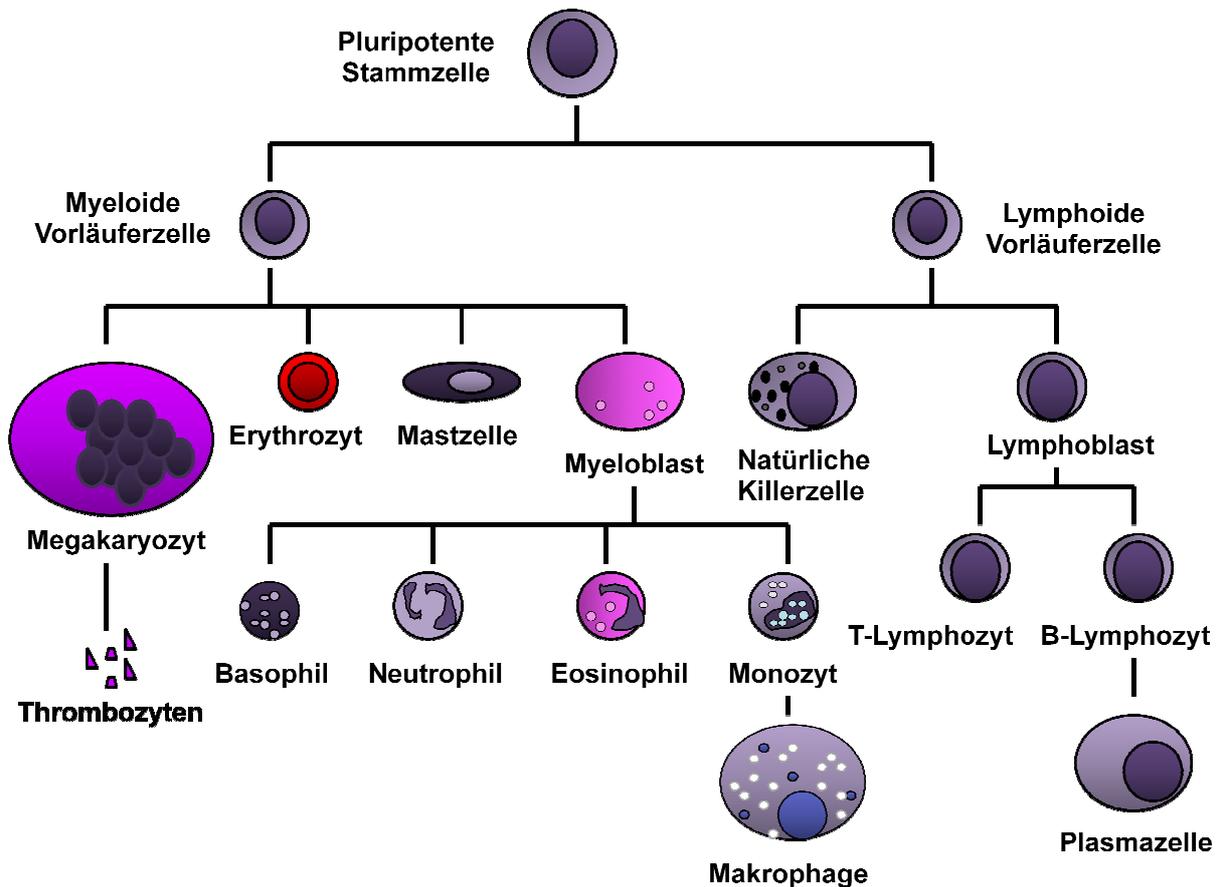


**Abbildung 5 Signalwege von G-CSFR.** Nach Aktivierung des G-CSF-R binden sogenannte PTKs an die zytosolische Domäne des Rezeptors und phosphorylieren die dortigen Tyrosinreste und im Anschluss daran sich selbst. Die PTKs können eine Vielzahl unterschiedlicher Signalwege in der Zelle auslösen, die Einfluss auf den Stoffwechsel, das Überleben, die Proliferation, die Differenzierung und den Zellzyklus hat.

### 2.1.4 Wirkungsweise

G-CSF wurde ursprünglich als hämatopoetischer Wachstumsfaktor beschrieben, der an der Regulierung der hämatopoetischen Zellproliferation und insbesondere an der Differenzierung von Granulozyten beteiligt ist [1]. Bei der Hämatopoese entstehen alle zellulären Bestandteile des Blutes aus einer pluripotenten Stammzelle. Aus ihr gehen zunächst die lymphoiden und myeloiden Vorläuferzellen hervor und ausgehend von diesen bilden sich einerseits die B- und T-Lymphozyten sowie die natürlichen T-Killerzellen und andererseits die sogenannten Granulozyten, Makrophagen, Mastzellen, Erythrozyten und Thrombozyten. Die Granulozyten werden auch als polymorphkernige Leukozyten bezeichnet, die an der Immunabwehr beteiligt sind (siehe Abbildung 6) [31].

Aufgrund seiner Wirkung auf die Granulopoese wird G-CSF in der Klinik eingesetzt, um einer Neutropenie bei Patienten vorzubeugen, die sich einer Chemotherapie unterziehen müssen, oder eine solche zu behandeln [32]. Weitere Anwendungsgebiete von G-CSF sind die Gewinnung von Stammzellen für autologe Transplantationen und die Anwendung als anti-inflammatorischer Immunmodulator bei Infektionen [33, 34].



**Abbildung 6 Hämatopoese.** Alle zellulären Bestandteile des Blutes gehen aus einer pluripotenten Stammzelle hervor. Durch Teilung der pluripotenten Stammzelle entstehen die myeloide und lymphoide Vorläuferzellen. Aus der lymphoiden Vorläuferzelle entstehen dann die B- und T-Lymphozyten, die für die erworbene Immunität verantwortlich sind. Aus der myeloiden Vorläuferzelle gehen die Erythrozyten, der Megakaryozyt und die Leukozyten hervor. Die Leukozyten umfassen die Monozyten und die Basophilen, Neutrophilen und Eosinophilen, die auch Granulozyten genannt werden.

Vor kurzem wurde ein neues Wirkungsspektrum von G-CSF im Zentralen Nervensystem (ZNS) aufgedeckt. Der Wachstumsfaktor wird dort zusammen mit seinem Rezeptor in zahlreichen Gehirnregionen von Nervenzellen exprimiert. G-CSF stimuliert unter anderem die Neurogenese von adulten Stammzellen im Hippocampus, aktiviert anti-apoptotische Signalwege in Nervenzellen und verstärkt den Auswuchs von Neuriten [35, 36]. Die therapeutische Wirksamkeit von G-CSF wurde in zahlreichen Tiermodellen für neurologische Erkrankungen nachgewiesen. In Tiermodellen für den Schlaganfall verkleinerte G-CSF das Infarktvolume, und verbesserte den funktionalen Outcome [37, 38]. Ähnliche Beobachtungen wurden in einem Tiermodell für Verletzungen des Rückenmarks (*spinal cord injury*, SCI) gemacht. Hier verbesserte G-CSF die Konnektivität des geschädigten Rückenmarks und die motorischen Fähigkeiten der Tiere [35]. Bei der Amyotrophen Lateralsklerose (ALS) konnte mit Hilfe von G-CSF das Fortschreiten der Krankheit im Tiermodell verzögert werden, sowie die motorischen Fähigkeiten verbessert und die Anzahl an Motorneuronen erhöht werden [39, 40]. Momentan wird die Wirksamkeit von G-CSF in einer Vielzahl von klinischen Studien am Menschen, wie beispielsweise für Schlaganfall, untersucht [41].

### **2.1.5 G-CSF Peptide**

Angesichts der pleiotropen Wirkungsweise, der Notwendigkeit der parenteralen Applikation und der relativ kurzen Plasmahalbwertszeit von ungefähr vier Stunden [42] sind alternative Agonisten des G-CSF-Rs attraktiv. Im Jahr 1998 gelang es Tian et al. das kleine Molekül SB 247464 mit Hilfe eines zellbasierten Screenings im Hochdurchsatzverfahren als Ligand des murinen G-CSF-R zu identifizieren. Das Molekül induzierte ähnlich wie das G-CSF Molekül den JAK/ STAT Signalweg. Leider zeigte die synthetische Substanz eine niedrigere Potenz im Vergleich zu murinem G-CSF. Darüber hinaus bindet SB 247464 ausschließlich an den murinen und nicht den humanen G-CSFR [43].

## 2.2 Mimetische Peptide

Die Verlängerung der Plasmahalbwertszeit, die verbesserte Bindungskapazität und die Reduzierung der Herstellungskosten sind die wesentlichen Gründe, weswegen mimetische Peptide für die Pharmaindustrie pharmakologisch interessant sind. Peptide werden entweder mithilfe des *phage displays* gescreent oder werden direkt von der Aminosäuresequenz des Ausgangsproteins abgeleitet und im Anschluss daran in einem zellbasierten Hochdurchsatzverfahren getestet. Neben den geringeren Herstellungskosten können mit Hilfe von mimetischen Peptiden beispielsweise eine verminderte Immunogenität, eine höhere Selektivität und/ oder eine verbesserte Darreichungsform durch orale Applikation anstelle von Injektionen erzielt werden [44].

Das Protein NCAM (*neural cell adhesion molecule*), von dessen Sequenz eine Reihe von Peptiden abgeleitet wurde, ist ein Beispiel für die Generierung pharmakologisch verbesserter Nachfolgersubstanzen. NCAM ist ein Glykoprotein der Ig Superfamilie und wirkt agonistisch auf den FGF (*fibroblast growth factor*) Rezeptor [45-47]. Das Molekül ist an der Bildung neuronaler Verbindungen während der Entwicklung beteiligt und moduliert die synaptische Plastizität [48-50].

Beispiele für von NCAM abgeleitete Peptide sind C3, das durch kombinatorische Chemie vom Ig1 Modul des Proteins hergestellt wurde [51], das BCL Motiv, das vom zweiten NCAM Fibronectin Typ III Modul abgeleitet wurde [52], und P2, eine zwölf Aminosäuren lange Sequenz, die dem FG *loop* des zweiten Ig Moduls von NCAM entstammt [53]. Alle diese Peptide sind wirksame mimetische Peptide und stellen aus diesem Grund vorteilhafte pharmakologische Weiterentwicklungen dar.

Ein weiteres Beispiel ist der EPO Rezeptor (EPO-R), der dem G-CSF-R vom Aufbau her sehr ähnlich ist. Ausgehend von seinem Ligand EPO wurden Peptide direkt von dessen Sequenz abgeleitet [54] oder komplett neu synthetisiert [55, 56]. Eines dieser agonistischen Peptide hat sogar den Sprung in die klinische Entwicklung geschafft [57]. Bei diesem Peptid handelt es sich um EMP-1, ein zyklisches Peptid bestehend aus 20 Aminosäuren, das mithilfe des *phage displays* entdeckt wurde. EMP-1 kann ebenso wie EPO im mikromolaren Bereich als Dimer an die extrazelluläre Domäne des EPO-R binden und diesen durch Dimerisierung aktivieren. Desweiteren wies das Peptid in zwei Tiermodellen für Erythropoese Aktivität auf [56, 58]. In einem weiteren Entwicklungsschritt wurde EMP-1 durch chemische Modifikation mit PEG kovalent verknüpft, so dass das Dipeptid Hematide<sup>TM</sup> entstand [56]. Hematide<sup>TM</sup> besitzt eine

längere Halbwertszeit als EPO und erhöhte die Hämoglobinwerte [59]. Eine Studie zu diesem Peptid wurde Ende 2010 beendet [60].

## 2.3 Split TEV Assay

Der sogenannte Split-TEV Assay beruht auf dem Prinzip der Komplementierung eines N-terminalen Fragments mit einem C-terminalen Fragment der NIa Protease (*nuclear inclusion a protease*) des Tabakmosaik-Virus (*tobacco etch virus*, TEV). Die Bezeichnung Split-TEV bezieht sich dabei auf die beiden inaktiven N- und C-terminalen Fragmente der TEV-Protease, die nach ihrer Komplementierung durch räumliche Annäherung wieder Proteaseaktivität aufweisen.

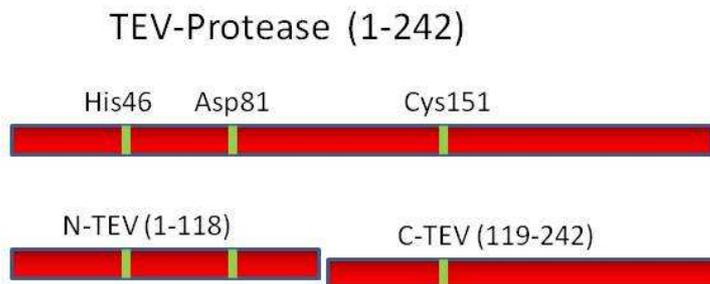
Mit Hilfe dieses Assays können sowohl phosphorylationsabhängige als auch transiente Protein-Protein-Interaktionen (PPI) in lebenden Zellen näher untersucht werden, indem putative Interaktionspartner mit TEV-Fragmenten fusioniert werden. Die PPIs können an der Zellmembran oder im Zytosol von immortalisierten und primären Zelllinien gemessen werden. Aufgrund seiner hohen Sensitivität und Spezifität kann der Split-TEV basierte Assay in einem Hochdurchsatzverfahren angewendet werden, um beispielsweise pharmakologisch aktive Substanzen zu testen [61, 62].

### 2.3.1 TEV-Protease

Die 49kD schwere NIa-Protease des Tabakmosaik-Virus gehört zu den am besten charakterisierten viralen Proteasen und wird im Zusammenhang mit dem Split-TEV basierten Assay als TEV Protease oder kurz TEV bezeichnet [63]. Ihre hauptsächliche molekularbiologische Anwendung besteht in der Abspaltung von sogenannten Tags aufgereinigter Proteine, um störende Einflüsse bei Strukturanalysen oder Aktivitätsmessungen zu beseitigen [64]. Diese Cysteinprotease ist Trypsin ähnlich [64, 65].

Wehr et al. identifizierten in einem Screening verschiedener N-terminaler (N-TEV) und C-terminaler (C-TEV) Fragmente der TEV-Protease, die an dimerisierende Proteine gebunden waren, ein Fragmentpaar, das durch Transkomplementierung eine Wiederherstellung seiner Proteaseaktivität von 43 % im Vergleich zum intakten Protein aufwies [61]. Bei dem identifizierten Fragmentpaar handelte es sich um den N-terminalen Teil der TEV Protease (N-TEV 1-118) bestehend aus 119 Aminosäuren inklusive der zwei Aminosäuren H46 und D81 der katalytischen Triade und dem C-terminalen Fragment (C-TEV 119-242), das 124

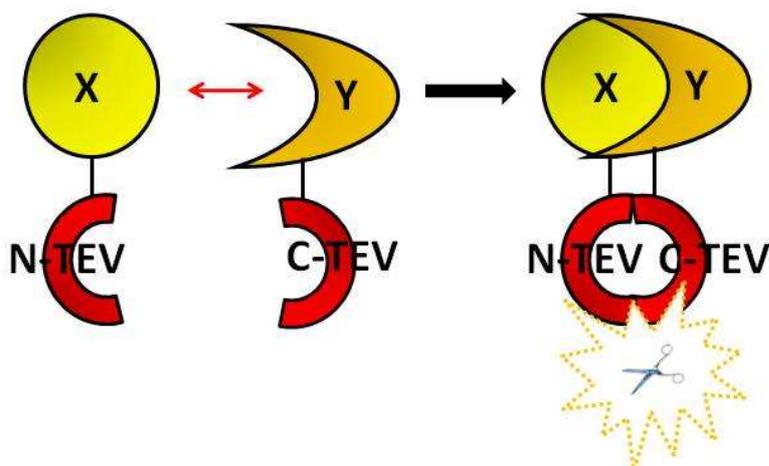
Aminosäuren lang ist und die dritte Aminosäure C151 der katalytischen Triade beinhaltet (siehe Abbildung 7).



h

**Abbildung 7 Schematische Darstellung der TEV-Protease und ihres komplementären, inaktiven Paares N-TEV (1-118)/ C-TEV (119-242).** Die 242 mer lange TEV Protease besitzt eine katalytische Triade bestehend aus Histidin, Aspartat und Cystein, die hier in grün dargestellt sind. Die transkomplementierenden Proteasenfragmente N-TEV und C-TEV sind 119 bzw. 124 mer lang und besitzen alleine keine Proteaseaktivität.

Beide Fragmente können C-terminal an putative Interaktionspartner fusioniert werden (siehe Abbildung 8). Sie wirken nicht toxisch, behindern die Proteinfaltung wahrscheinlich nicht, und scheinen die intrazellulären Prozesse nicht zu beeinflussen [61].



**Abbildung 8 Schematische Darstellung des grundlegenden Prinzips des Split-TEV Systems.** Durch die Interaktion der beiden Fusionsproteine X und Y kommt es zur räumlichen Annäherung der beiden inaktiven Fragmente N-TEV und C-TEV, wodurch ihre Proteaseaktivität wiederhergestellt wird.

Die TEV Protease erkennt mit hoher Spezifität die Proteinsequenz ENLYFQG/S, wobei die Spaltung zwischen den Aminosäuren Glutamin und Glycin/ Serin erfolgt [66]. Diese Aminosäureabfolge wird im Rahmen des Split-TEV basierten Assays als tevS (TEV-Site) bezeichnet, und als hochspezifische Schnittstelle der TEV-Protease verwendet [61]. Die Aminosäureabfolge ENLYFQG/L wird als tevSmut (mutated TEV-Site) bezeichnet, wobei es zu einem Austausch von Serin gegen Leucin kommt.

### 2.3.2 Transkriptionsfaktor Gal4-VP16 (GV)

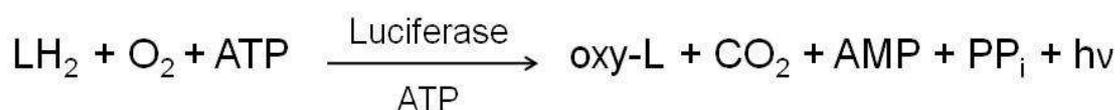
Bei Gal4-VP16 (GV) handelt es sich um einen artifiziellen Transkriptionsfaktor, der aus der GAL4 DNA-bindenden Domäne der Hefe und der stark sauren VP16 Transaktivierungsdomäne des *Herpes simplex* Virus besteht. Mit Hilfe einer derartigen Fusion kann die DNA Bindungsspezifität beibehalten, und die Genexpression verstärkt werden [67].

### 2.3.3 Luciferasen

Biolumineszenz ist ein natürlich auftretendes Phänomen und wird durch sogenannte Luciferasen hervorgerufen. Die Luciferasen Gene wurden ausgehend von Bakterien, Käfern wie dem Glühwürmchen oder der Seefeder gewonnen und synthetisiert [68, 69]. Sowohl die Firefly- als auch die Renilla-Luciferase werden im Rahmen des Split-TEV basierten Assays eingesetzt. Ihre Funktionsweise wird in den nächsten zwei Abschnitten näher erläutert.

#### 2.3.3.1 Firefly-Luciferase

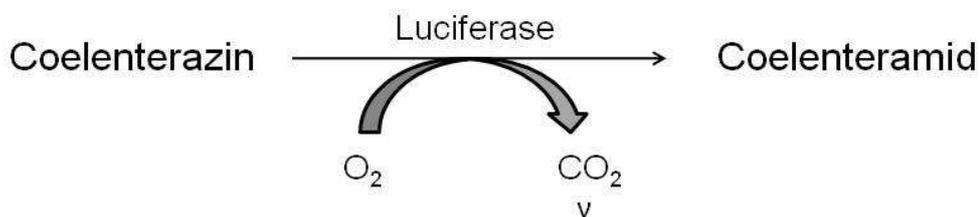
Das monomere, 61 kDa schwere Enzym *Firefly* Luciferase ist eines der am häufigsten verwendeten biolumineszenten Reporter. Sie katalysiert die Oxidation von Luciferin unter Hilfe von ATP und Sauerstoff über ihr reaktives Intermediat zu Oxyluciferin und CO<sub>2</sub>. Dabei gibt das Oxyluciferin Licht mit einer Wellenlänge von 550-570 nm ab.



Ihre Sensitivität und Einfachheit machen die native *Firefly* Luciferase zu einem beliebten Reporter. Sie wird nicht posttranslational modifiziert und besitzt eine kurze Halbwertszeit von ungefähr drei Stunden [70-72].

### 2.3.3.2 Renilla Luciferase

Bei der Renilla Luciferase handelt es sich um ein monomeres 36 kDa schweres Enzym, das die Reaktion von Coelenterazin zu Coelenteramid katalysiert und dabei Licht mit einer Wellenlänge von 480 nm emittiert.



Als Reporter liefert die Renilla Luciferase ähnliche Vorteile wie die Firefly Luciferase. Das frühere Problem der Autolumineszenz wurde mittlerweile verbessert, indem das Substrat Coelenterazin modifiziert wurde [73-75].

### 2.3.4 Das grundlegende Prinzip des Split-TEV Assays

Das grundlegende Prinzip des Split-TEV basierten Assays besteht in der räumlichen Annäherung zweier putativer Interaktionspartner, die jeweils mit einem N-TEV- bzw. C-TEV-Fragment fusioniert sind. Der Transkriptionsfaktor GV ist dabei über die hochspezifische Erkennungssequenz der TEV-Protease, die sogenannte TEV-Site (tevS; ENLYFQG/S), mit dem N-terminalen Fragment der TEV-Protease (N-TEV) verbunden.

Durch die räumliche Annäherung kommt es zur Komplementierung beider TEV-Fragmente und damit zur Wiederherstellung der proteolytischen Aktivität der TEV-Protease. Der Transkriptionsfaktor GV wird daraufhin abgespalten und transloziert in den Zellkern. Dort induziert er die Reporterexpression via der Gal4 responsiven Elemente (G5-Elemente) [61].

## 2.4 Charcot-Marie-Tooth Krankheit

Die Charcot-Marie-Tooth (CMT) Krankheit gehört zu den häufigsten Erberkrankungen des peripheren Nervensystems (PNS) mit einer Prävalenz von 36:100 000 [76]. Seit der Erstbeschreibung Ende des 19. Jahrhunderts durch Jean-Martin Charcot, Pierre Marie und Howard Tooth wurden fast 40 verschiedene genetische Mutationen dieses Krankheitsbilds beschrieben [77]. In den folgenden Abschnitten wird näher auf diese Erkrankung mit ihren verschiedenen Subtypen, der Symptomatik, den gegenwärtigen Behandlungsmöglichkeiten und dem im Rahmen dieser Doktorarbeit verwendeten Tiermodell eingegangen.

### 2.4.1 Symptome und Diagnose

Obwohl die genetischen Ursachen dieser Erkrankung vielfältig sind, ist ihr Erscheinungsbild dennoch recht homogen. Allen Subtypen der CMT Erkrankung ist ein langsames Fortschreiten der Muskelatrophie ausgehend von den distalen Extremitäten gemein. Diese Atrophie kann unterschiedlich stark ausgeprägt sein, wobei die Bandbreite von einem abnormalen Gangbild (Storchengang) bis hin zu einer Abhängigkeit von einem Rollstuhl reicht. Das Greifen von Gegenständen fällt zunehmend schwerer. Im Laufe der Erkrankung kommt es zu Deformierungen der Hände und Füße (Krallenhand, *Pes cavus* = Hohlfuß, Hammerzeh) und die Patienten verlieren sukzessive die Sensibilität in den Extremitäten, was auch zu neuropathischen Schmerzen führen kann. Die Symptome können bereits im Kindesalter oder auch erst ab dem 20. Lebensjahr auftreten, wobei der Verlauf auch innerhalb einer genetisch belasteten Familie von mild bis schwer verlaufen kann. Insgesamt verläuft die Erkrankung jedoch recht langsam über Jahrzehnte, so dass viele Patienten erst im höheren Lebensalter auf den Rollstuhl angewiesen sind [78].

Durch eine Nervenbiopsie und Nervenleitgeschwindigkeitsmessungen kann genauer zwischen den beiden Haupttypen der CMT Erkrankung unterschieden werden. Beim axonalen Typ liegt die durchschnittliche Nervenleitgeschwindigkeit (NLG) bei  $>38$  m/s, da die Myelinschicht bei diesem Erkrankungstyp nicht betroffen ist und damit die saltatorische Erregungsleitung erst in einem sehr späten Stadium in Mitleidenschaft gezogen wird. Die durchschnittliche NLG liegt bei einem gesunden Menschen bei etwa 50 m/s. Bei dem demyelinisierenden Typ werden NLGs von  $< 38$  m/s gemessen, da primär die Schwannzellen und damit die Myelinisierung der Axone betroffen sind. Um die genauen genetischen Ursachen und damit

den spezifischen Subtyp der Erkrankung festzustellen, können die Patienten auch molekulardiagnostisch untersucht werden. Allerdings geschieht das in den wenigsten Fällen [79].

## 2.4.2 Klassifizierung

Die Charcot-Marie-Tooth (CMT) Erkrankung wird auch als hereditäre motorisch und sensorische Neuropathie (HMSN) bezeichnet. Sie gehört zu den am weitest verbreiteten neurogenetischen Erkrankungen des peripheren Nervensystems (PNS) und wird meist autosomal dominant vererbt. Daher ist eine Häufung der Erkrankung innerhalb von Familien sehr verbreitet. Mutationen treten in Genen auf, die für Axone oder die für Schwannzellen codieren, deswegen wird zwischen dem axonalen und dem demyelinisierenden Typen der Erkrankung unterschieden.

Der Subtyp CMT1 wird vorwiegend autosomal dominant vererbt und gehört dem demyelinisierenden Typ an. Das gleiche gilt für den Subtyp CMT4, der jedoch im Gegensatz zu CMT1 autosomal rezessiv vererbt wird. CMT2, der axonale Typ, kann sowohl autosomal rezessiv als auch autosomal dominant vererbt werden. CMT3 wird auch als Déjèrine-Sottas Krankheit bezeichnet, die eine besonders schwere Form mit einem frühen Krankheitsbeginn des demyelinisierenden Typs darstellt. Eine Sonderstellung nimmt der Subtyp CMTX ein. Er wird X-chromosomal vererbt und weist Merkmale des demyelinisierenden und des axonalen Typs auf. Die Klassifizierung der Subtypen CMT5 und CMT6 gestaltet sich schwieriger, da bei CMT5 auch die Pyramidenbahnen und bei CMT6 der optische Nerv in Mitleidenschaft gezogen sind [80, 81].

Eine weitere Unterteilung der Subtypen wird durch die genetischen Ursachen vorgenommen, wobei die häufigste Mutation die Verdopplung eines 1,5 Mb großen Teils des Peripheren Myelinprotein 22 (Pmp22) auf Chromosom 17 ist. Etwa 40-50% aller Fälle werden durch die Überexpression des Pmp22 Gens in CMT1A verursacht. Etwa 1% der CMT1A Fälle werden durch eine Punktmutation in Pmp22 hervorgerufen [82, 83]. CMT1B wird durch eine Punktmutation in Myelinprotein zero (MPZ) ausgelöst und macht etwa bis zu 5% der CMT Erkrankungen aus [84]. Etwa 10% der Patienten leiden an CMTX. Dieser Subtyp ist durch eine Mutation im Gen *gap junction B1* (GJB1) verursacht [85]. CMT2 weist eine Vielzahl unterschiedlicher Genmutationen auf, wobei die autosomal rezessiven Formen einen schwereren Verlauf mit einem früheren Krankheitsbeginn zeigen [86].

### 2.4.3 CMT1A

Der Subtyp CMT1A gehört zu der am häufigsten auftretenden Form der neurogenetischen Erkrankung CMT und wird durch eine 1,5 Mb Duplikation im kurzen Arm des Chromosoms 17 hervorgerufen, wodurch es zu einer Überexpression des Proteins Pmp22 kommt [82].

Pmp22 macht ungefähr 2-5 % der gesamten Myelinproteine des PNS aus, reguliert vermutlich die Myelinbildung und dessen Aufrechterhaltung und wird als 22 kDa schweres Glykoprotein hauptsächlich von Schwannzellen exprimiert [87, 88].

Während der Großteil von etwa 80 % des neu synthetisierten und möglicherweise fehlgefalteten Pmp22 rasch im Proteasom abgebaut wird, kommt es bei CMT1A zu einer Überexpression des Proteins und dadurch zu einer Blockierung des Proteasoms und zur Akkumulierung der Proteine im perinukleären Zytoplasma (Aggresom) [89]. Die Bildung dieser Aggresome führt wahrscheinlich zur Apoptose der Schwannzelle durch intrinsischen Zellstress, und damit zur Demyelinisierung des Axons. Die genauen Mechanismen der Dysmyelinisierung und Demyelinisierung sind nur teilweise verstanden und hängen vermutlich mit der gestörten Stabilität der Proteininteraktion unter den Myelinproteinen, mit der fehlerhaften Wechselwirkung der Schwannzellen untereinander, sowie mit verschiedenen intrazellulären Signalwege zusammen [81, 90, 91]. Möglicherweise spielt auch die Expression des *monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1/ CCL2) als Regulator der Makrophagen des Nervs eine wichtige Rolle. MCP-1 wurde in Zusammenhang mit der neuronalen Schädigung einschließlich der Axonopathie und der Demyelinisierung beobachtet [92].

Trembler-J Mäuse besitzen wie 1 % der CMT1A Fälle eine Punktmutation in Pmp22 und sollten im Rahmen dieser Doktorarbeit als Tiermodell verwendet werden. Aufgrund der Punktmutation an Nukleotidposition 47 kommt es zu einem Basenaustausch von T gegen C und dadurch zu einem Aminosäuretausch von Leucin gegen Prolin [93, 94]. Da homozygote Tiere bereits im Alter von 18 Tagen sterben, werden für Studien heterozygote Tiere verwendet. Die Neuropathologie dieser Tiere weist neben dem auffallenden Tremor dünn myelinisierte bis demyelinisierte Axone und eine erhöhte Anzahl an Schwannzellen mit abnormaler Morphologie auf [88, 95, 96]. Trembler-J Mäuse zeigen ein abnormales Gangbild mit abgespreizten Hinterläufen und eine gestörte Koordination wie Tests auf dem Rotarod bewiesen [88, 97].

#### 2.4.4 Behandlung und Therapieansätze

Für CMT Patienten stehen bis heute nur eine begrenzte Auswahl an Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung, um die Symptome der Erkrankung und die dabei auftretenden Schmerzen zu lindern. Regelmäßige Physiotherapie mit einem moderaten Training der Muskulatur [98] und Balanceübungen [99] können sehr effektiv für die Patienten sein, indem sie das Gangbild und die unteren Extremitäten stärken. Exzessives Training sollte allerdings vermieden werden [100]. Orthopädische Hilfsmittel werden eingesetzt, um den Fuß und das Fußgelenk zu stabilisieren und verhindern somit ein Umknicken und andere mögliche Verletzungen [101]. Wenn es zu besonders schweren Einschränkungen und Deformierungen beispielsweise im Fußbereich (Hohlfuß, Hammerzeh) kommt, werden operative Eingriffe vorgenommen [102]. Viele Patienten leiden auch an neuropathischen und nicht-neuropathischen Schmerzen und erhalten dagegen Medikamente zur Linderung [101, 103]. Allerdings sind bis zum heutigen Zeitpunkt keine spezifischen medikamentösen Behandlungen gegen die Ursachen der Erkrankung verfügbar.

Mit zunehmendem Verständnis für die Ursachen und Mechanismen der Erkrankung mit ihren verschiedenen Subtypen gibt es einige Therapieansätze. Eines dieser potentiellen Medikamente ist Vitamin C, das signifikante Effekte in einem Tiermodell für CMT1A zeigte, indem es die Expression des mutierten Pmp22 reduzierte. Dadurch kam es zu einer verbesserten Beweglichkeit und zur Remyelinisierung des Ischiasnervs [104]. Es konnte aber keine Wirksamkeit in einer kürzlich durchgeführten klinischen Studie gezeigt werden, was möglicherweise an der zu geringen Patientenzahl liegen könnte [105].

Eine weitere Substanz, die die Regenerierung der Nerven und die Sensibilität in einem Tiermodell für CMT1A verbesserte, ist der Wachstumsfaktor Neurotrophin-3 (NT-3). NT-3 ist ein wichtiger Bestandteil des autokrinen *survival loops* der Schwannzelle, unterstützt die Differenzierung von Neuronen, und moduliert die Plastizität des Nervensystems [106, 107]. Mit seiner kurzen Plasmahalbwertszeit ist NT-3 kein ideales Therapeutikum [107]. Mit der Weiterentwicklung therapeutischer, agonistischer Antikörper, die gegen den neurotrophen Rezeptor gerichtet sind, kann dieses Problem möglicherweise umgangen werden. Die beiden agonistischen Antikörper gegen TrkB und TrkC verbesserten die motorische Funktion sowie die elektrophysiologischen und morphologischen Messwerte in Trembler-J Mäusen, einem Tiermodell für CMT1A [108, 109].

Mutierte Proteine wie das Myelinprotein zero (MPZ) in CMT1B und das Periphere Myelinprotein 22 (Pmp22) in CMT1A werden nicht vollständig über das Proteasom abgebaut und akkumulieren daher innerhalb des endoplasmatischen Reticulums (ER) der Schwannzelle,

wodurch sie Apoptose auslösen. Curcumin, eine Substanz, die in Curry enthalten ist, bewirkte in Tiermodellen für CMT1A und CMT1B eine signifikante Abnahme apoptotischer Schwannzellen, was in einer erhöhten Anzahl und Größe myelinisierter Axone des Ischiasnervs und damit zu einer verbesserten motorischen Beweglichkeit resultierte. Curcumin stellt daher eine weitere Substanz dar, die zur Behandlung in CMT1A und CMT1B klinisch geprüft werden könnte [97, 110].

## 2.5 Ziele der Doktorarbeit

Der hämatopoetische Wachstumsfaktor G-CSF besitzt neben neuroprotektiven Effekten [5] weitere Eigenschaften, wie beispielweise die Proliferation und Differenzierung der myeloiden Linie und die Aktivierung von anti-apoptotischen Signalwegen [38]. Die relativ kurze Plasmahalbwertszeit von etwa 4 Stunden [42] und die Erhöhung der Zahl der Leukozyten [1] sind nicht zu vernachlässigende Nachteile des sehr gut verträglichen Wachstumsfaktors. Aufgrund der relativen pharmakologischen Nachteile des gegenwärtig verwendeten G-CSF, insbesondere in Hinblick auf die Behandlung chronischer Erkrankungen, stellen agonistisch wirkende, kürzere Peptide, wie beispielsweise Peptide für den EPO-Rezeptor [54], eine Weiterentwicklung des pharmakologisch wirksamen G-CSF Proteins dar.

Aus diesem Grund war eine Zielsetzung dieser Doktorarbeit agonistisch wirkende Peptidfragmente des pleiotropen Wachstumsfaktors G-CSF mithilfe zweier alternativer Screeningmethoden zu identifizieren. Die Verbesserung seiner pharmakologischen Eigenschaften würde zu einem großen Fortschritt in der Behandlung chronischer, neurologischer Erkrankungen darstellen. Das Screening sollte dabei zum einen mit einem zellbasierten Assay mit Hilfe der G-CSF abhängigen Zelllinie NFS-60 durchgeführt werden, zum anderen sollte der komplexere Split-TEV Assay zum Einsatz kommen. Mit Hilfe des sogenannten Split TEV basierten Assays können sowohl phosphorylationsabhängige als auch transiente Protein-Protein-Interaktionen (PPI) sowohl in immortalisierten als auch in primären Zelllinien gemessen werden. Aufgrund seiner hohen Sensitivität und Spezifität kann der Readout des Split-TEV basierten Assays in einem Hochdurchsatzverfahren angewendet werden, um pharmakologisch aktive Substanzen wie beispielsweise G-CSF Peptidfragmente zu testen [61, 62].

In einem zweiten Teil dieser Doktorarbeit sollten die möglichen therapeutischen Effekte des Wachstumsfaktors G-CSF in der hereditären Erkrankung CMT als Modell für periphere Neuropathien näher untersucht werden. Die CMT Erkrankung stellt eine der am häufigsten

auftretenden Erberkrankungen des PNS dar. Trotz des zunehmenden Verständnisses für die Ursachen und die komplexen Vorgänge, die diese Krankheit letztendlich auslösen, sind ihre Behandlungsmöglichkeiten sehr eingeschränkt. Eine medikamentöse, zielgerichtete Behandlung ist bis zum heutigen Zeitpunkt nicht erhältlich. Da G-CSF bereits in Erkrankungen wie ALS [39], Morbus Parkinson[111] und Verletzungen des Rückenmarks [35] neuroprotektive Effekte gezeigt hat, sollte nun die mögliche Wirkung von G-CSF in Schwanzzellen und in demyelinisierten Neuronen des PNS aufgezeigt werden. Zu diesem Zweck sollte der Wachstumsfaktor in einer Zellkultur von immortalisierten Schwanzzellen und in einem Tiermodell für CMT1A, stellvertretend für den am häufigsten auftretenden Subtyp dieser Erkrankung, getestet werden.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1 Materialien

#### 3.1.1 Geräte

Agarose Gelelektrophorese Kammer	Thermo Scientific, Rockford, IL, USA
Beckman DU <sup>®</sup> 640 Spectrophotometer	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Biofuge fresco	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Dual Intensity Ultraviolet Transilluminator	UVP, Upland, CA, USA
FluoStar	BMG Labtech GmbH, Offenburg, Deutschland
GeneAmp <sup>®</sup> PCR System 9700	Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA
Gene Pulser <sup>®</sup> II	Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Grip Strength Meter	FMI Instruments, Seeheim-Ober Beerbach, Deutschland
iBlot <sup>™</sup> Dry Blotting System	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
IKAMA <sup>(R)</sup> RH Magnetrührer	IKA Werke GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland
Leica EG 1150H Einbettungsstation	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Leica HI 1210 Wasserbad	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Leica RM 2255 Microtom	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Leica TP 1020 Automatische Gewebeinfiltration	Leica Biosystems, Nussloch, Deutschland
Light Cycler 480	Roche Applied Science, Mannheim, Deutschland
Liquidator <sup>96</sup>	Steinbrenner Laborsysteme GmbH, Wiesenbach, Deutschland
Maus Rota-Rod	Ugo Basile Srl, Comerio VA, Italien
Mithras LB 940	Berthold Technologies GmbH & Co KG, Bad Wildbad, Deutschland
Multiprobe II EX Robotic Handling System	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Multitron 2 Schüttler	Infors HAT, Bottmingen, Schweiz
Neubauer Zählkammer	Laboroptik GmbH, Bad Homburg,

Netzgerät	Deutschland Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ, USA
Nucleofactor™ II	Lonza AG, Köln, Deutschland
Olympus CK2	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
Olympus IX 81	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
pH-Elektrode Polymax 1040	Schott Instruments, Mainz, Deutschland Heidolph, Instruments GmbH & Co KG, Schwabach, Deutschland
Schüttler GFL 3005	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
SDS-PAGE-Gelelektrophoresekammer SE250- 10A-75	Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Ultra Turrax IKA T10 basic	IKA Werke GmbH & Co KG, Staufen, Deutschland
Varifuge 3 OR	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Vortexer Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Waage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Wasserbad	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Deutschland
ZUA-82-GME Gasmisch Einheit	FMI Instruments, Seeheim-Ober Beerbach, Deutschland

### 3.1.2 Chemikalien

ATP	P.J.K GmbH, Kleinblittersdorf, Deutschland
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Rockford, IL, USA
Beetle Juice (Puffer mit darin enthaltenem Substrat der <i>Firefly</i> Luciferase)	P.J.K GmbH, Kleinblittersdorf, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland

Cell Titer Blue Cell Viability Assay	Promega, Mannheim, Deutschland
Coelenterazin	P.J.K GmbH, Kleinblittersdorf, Deutschland
Coenzym A	P.J.K GmbH, Kleinblittersdorf, Deutschland
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
DAPI <i>Nucleic Acid Stain</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
D-Luciferin	P.J.K GmbH, Kleinblittersdorf, Deutschland
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
DTT (Dithiothreitol)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Fluka, Neu-Ulm, Deutschland
Isofluran	Abbott GmbH & Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
LightCycler <sup>®</sup> FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
β-Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland
MultiTox-Glo Multiplex Cytotoxicity Assay	Promega, Mannheim, Deutschland
5 x Passive Lysis Buffer	Promega, Mannheim, Deutschland
DirectPCR Lysis Reagent	Viagen Biotech Inc., Los Angeles, CA, USA
Renilla Juice	P.J.K GmbH, Kleinblittersdorf, Deutschland
RNAsin	Promega, Mannheim, Deutschland
Roti <sup>®</sup> -Histofix	Carl Roth GmbH & Co KG, Karlsruhe, Deutschland
SuperScript III Reverse Transcriptase (SSIII)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce, Rockford, IL, USA
Trypanblau	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Ultra Pure <sup>™</sup> Agarose	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ultra Pure DNase/ RNase free distilled H <sub>2</sub> O	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 3.1.3 Puffer und Lösungen

<u>Beetle-Juice<sup>®</sup> Puffer</u>	20 mM Tricine, 1,07 mM (MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> *Mg(OH) <sub>2</sub> * H <sub>2</sub> O, 2,67 mM MgSO <sub>4</sub> , 0,1 mM EDTA, 33,3 mM DTT, 270 M Coenzym A, 470 µM D- Luciferin (free acid), 530 µM ATP pH 7,8, Lagerung bei -70°C
<u>Blockpuffer für Western Blots:</u>	PBST + 5 % Magermilchpulver
<u>Complete (Proteinase-Inhibitor)</u>	7 fach konzentriert (in 2 ml dH <sub>2</sub> O gelöst)
<u>10 x DNA-Ladepuffer</u>	250 µg/ml Xylencanolblau, 50 mM EDTA, 80 % Glycerin auf 50 ml ddH <sub>2</sub> O
<u>G-CSF Puffer</u>	10 mM Essigsäure, 250 mM Sorbitol, 0,004 % Tween 80
<u>100 mM Glycin</u>	In 1 x PBS gelöst und sterilfiltriert
<u>Lysispuffer</u>	150 mM NaCl, 50 mM TrisHCl, 2 mM EDTA, 1 % NP-40 pH 7.4
<u>4 % PFA (Parafomaldehyd)</u>	4 % PFA in ddH <sub>2</sub> O gelöst
<u>PBS (Phosphate buffered saline)</u>	8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> auf 1 l ddH <sub>2</sub> O pH 7,4
<u>PBST (Phosphate buffered saline + 0,2 % Tween 20):</u>	8,0 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 0,24 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2 ml Tween 20 auf 1 l ddH <sub>2</sub> O pH 7.4
<u>PhosSTOP (Phosphatase Inhibitor)</u>	10 fach konzentriert (in 2 ml dH <sub>2</sub> O gelöst)
<u>Proteinase K (10 mg/ ml)</u>	In 10 mM Tris, 15 mM NaCl bei 37°C vorverdauen → bei -20°C wegfrieren
<u>Renilla Juice Puffer</u>	1,1 M NaCl, 2,2 mM Na-EDTA, 0,22 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 5,1), 0,44 mg/ml BSA, 1,3 mM NaN <sub>3</sub> , 1,43 mM Coelenterazin (in EtOH gelöst) pH 5,0
<u>10 % SDS</u>	In ddH <sub>2</sub> O gelöst
<u>10 x SDS-PAGE-Laufpuffer :</u>	121 g Tris, 283 g HEPES, 10 g SDS auf 1 l ddH <sub>2</sub> O pH 8,3
<u>4 x SDS-Auftragepuffer (Laemmli-Puffer): (reduzierend)</u>	250 mM Tris HCl, pH 6,8, 40 % Glycerin, 8 % SDS, 0,004 % Bromphenolblau,

<u>1 x TAE (Tris-Acetat-EDTA), pH 8 :</u>	20 % Mercaptoethanol auf 100 ml mit ddH <sub>2</sub> O 40 mM Tris Acetat, 1 mM Eisessig, 1 mM EDTA
<u>1 M Tris pH 6,8</u>	In ddH <sub>2</sub> O gelöst
<u>10 mM Tris pH 8,3</u>	In ddH <sub>2</sub> O gelöst
<u>1 M Tris/HCL pH 7,6</u>	In ddH <sub>2</sub> O gelöst, pH wird mit konzentrierter HCl eingestellt
<u>0,1 % Triton X 100</u>	In ddH <sub>2</sub> O gelöst

### 3.1.4 Medien und Reagenzien

#### 3.1.4.1 Zellkultur-Medien und –Zusätze

AX200	Dr. Reddy's Laboratories, Hyderabad, Indien
DMEM	PAA The Cell Culture Company, Pasching, Österreich
FCS ( <i>Fetal Calf Serum</i> )	PAA The Cell Culture Company, Pasching, Österreich
G418	PAA The Cell Culture Company, Pasching, Österreich; (HEK293 Medium + 1 mg/ml G418)
Glutamin	PAA The Cell Culture Company, Pasching, Österreich
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
MEM	PAA The Cell Culture Company, Pasching, Österreich
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
OptiMEM	Gibco, Darmstadt, Deutschland
Penicillin/ Streptomycin (P/ S)	PAA The Cell Culture Company, Pasching, Österreich
Puromycin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland; (HEK293 Medium + 400 ng/ml Puromycin)
RPMI 1640	PAA The Cell Culture Company, Pasching, Österreich
Staurosporin	Calbiochem, Darmstadt, Deutschland
Trypsin – EDTA Solution	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

### 3.1.4.2 Medien für Bakterien

LB-Medium	20 g LB Broth Base auf 1 l ddH <sub>2</sub> O pH 7,0 autoklavieren, Antibiotikum 1:1000 verdünnen
LB/Ampicillin Platte	1 l LB-Medium, 15 g Agar-Agar, Zugabe von 1 ml Ampicillin (100 mg/ml) nach dem Autoklavieren
LB/Gentamycin Platten	1 l LB-Medium, 15 g Agar-Agar, Zugabe von 1 ml Gentamycin (100 mg/ml) nach dem Autoklavieren
LB/Kanamycin Platten	1 l LB-Medium, 15 g Agar-Agar, Zugabe von 1 ml Kanamycin (100 mg/ml) nach dem Autoklavieren
LB/Zeocin Platten	1 l LB-Medium, 15 g Agar-Agar, Zugabe von 300 µl Zeocin (100 mg/ml) nach dem Autoklavieren

### 3.1.4.3 Prokaryotische Zellen

Bakterienstamm	Genotyp	Hersteller
<i>E. coli</i> DH10B	<i>F</i> - <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i> ) $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ <i>M15</i> $\Delta$ <i>lacX74</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara leu</i> ) 7697 <i>galU</i> <i>galK</i> <i>rpsL</i> <i>nupG</i> $\lambda$ -	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

### 3.1.4.4 Eukaryotische Zelllinien

Zelllinie	Ursprung	Kultivierungsmedium
RSC96	spontan immortalisierte Schwanzzelllinie aus der Ratte	D-MEM + 10 % FCS + 1 % P/S
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen	MEM + 10 % FCS + 1 % P/S
NFS-60	murine myoblastische Zelllinie	RPMI 1640+ 10 % FCS + 1 % P/S + 200 mM Glutamin + 10 µM $\beta$ -Mercaptoethanol + 2 ng/ml G-CSF

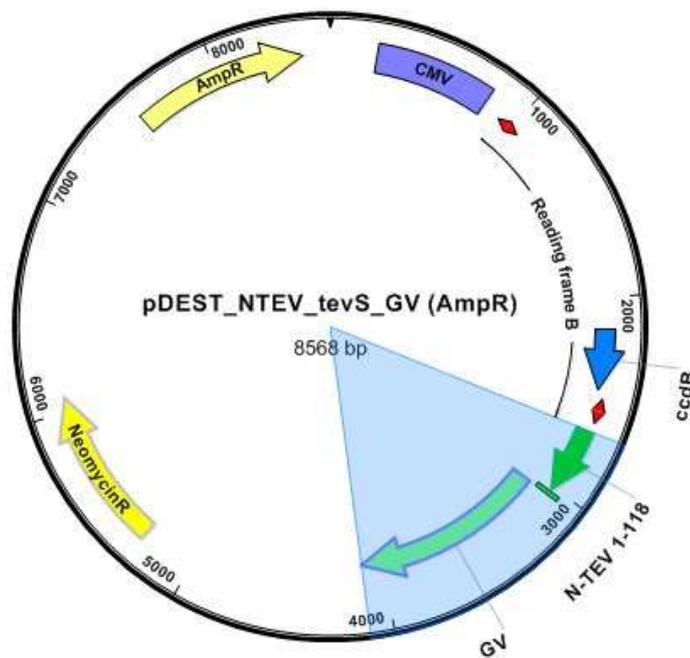
### 3.1.5 Vektoren

#### 3.1.5.1 Klonierungsvektoren

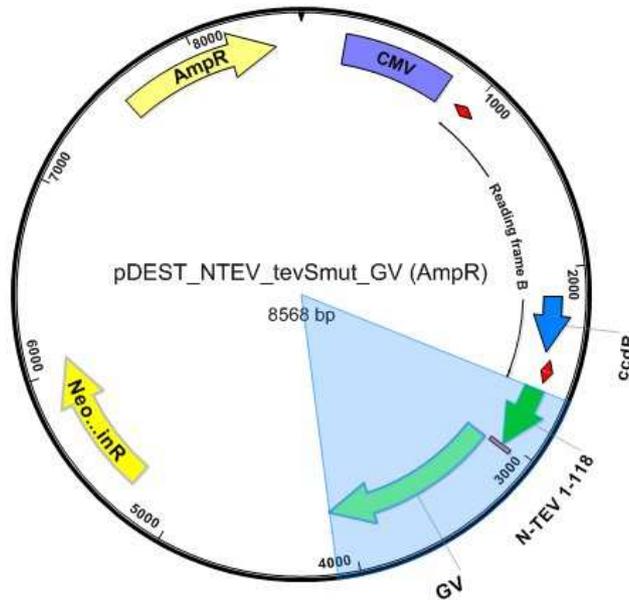
- **pDONR<sup>TM</sup> 207:** Gateway System BP-Reaktion, Gentamycin Resistenz (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- **pDONR<sup>TM</sup> 221:** Gateway System BP-Reaktion, Kanamycin Resistenz (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

#### 3.1.5.2 Dest-Vektoren

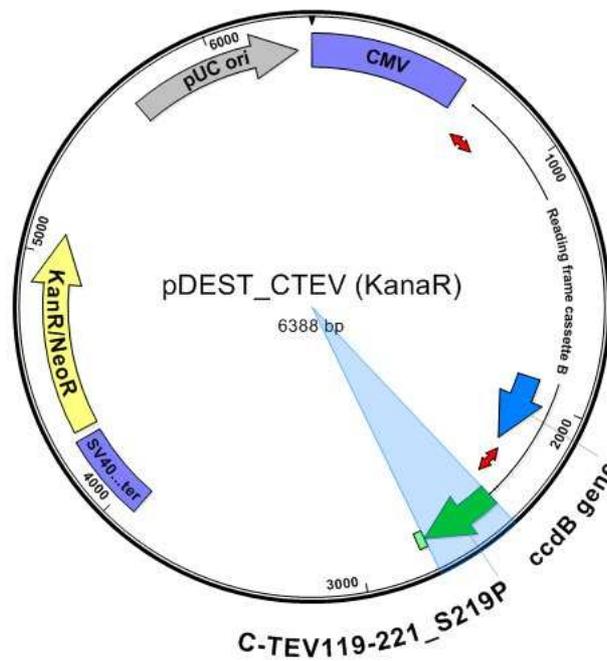
- **pDest\_NTEV\_tevS\_GV:** Gateway System, LR-Reaktion, Ampicillin und Neomycin Resistenz (SYGNIS Bioscience GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland)



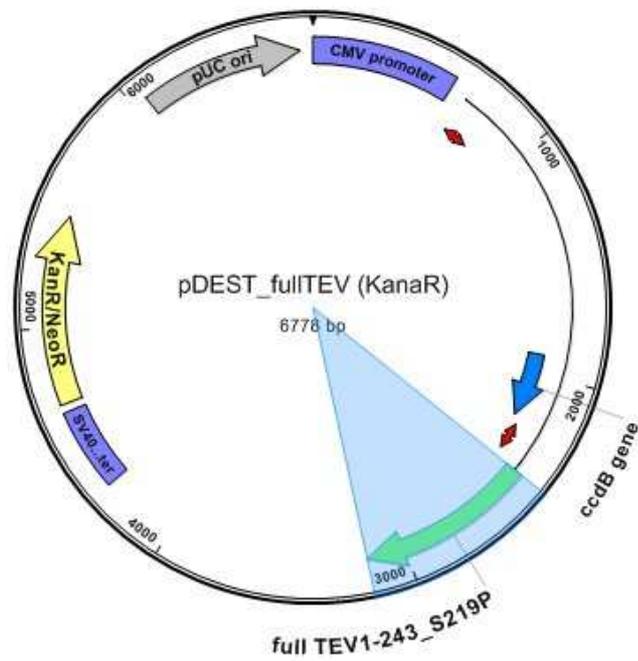
- pDest\_NTEV\_tevSmut\_GV: Gateway System, LR-Reaktion, Ampicillin und Neomycin Resistenz (SYGNIS Bioscience GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland)



- pDest\_CTEV: Gateway System, LR-Reaktion, Kanamycin und Neomycin Resistenz (SYGNIS Bioscience GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland)



- pDest\_fullTEV: Gateway System, LR-Reaktion, Kanamycin und Neomycin Resistenz (SYGNIS Bioscience GmbH & Co. KG, Heidelberg, Deutschland)



### 3.1.6 Antikörper

Name	Ursprung	Hersteller
Actin MAB 1501	Maus	Millipore, Billerica, USA
Bcl-xL # 2762	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
G-CSF receptor antiserum, sc-694	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA
Phospho-Akt #4060	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
anti-rabbit-FITC	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
anti-rabbit-HRP	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland
Anti-mouse-HRP	Ziege	Dianova, Hamburg, Deutschland

### 3.1.7 Enzyme

Alle Enzyme, die in dieser Arbeit verwendet wurden, wurden entweder von der Firma Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland), von der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) oder von der Firma New England Biolabs (Ipswich, MA, USA) bezogen und bei -20°C gelagert.

### 3.1.8 DNA- und Proteinmarker

SeeBlue <sup>DNA</sup> Pre-Stained	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
GeneRuler <sup>TM</sup> 1 kb DNA ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
GeneRuler <sup>TM</sup> 100 bp Plus DNA ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

### 3.1.9 Oligonucleotide

(von der Firma Biomers, Ulm, Deutschland)

Primer	Spezies	Anneal T [°C]	Größe [bp]	Zyklen	Sequenz
Cyclophilin cyc5	mm	60	~300	45	5'-ACC CCA CCG TGT TCT TCG AG-3'
Cyclophilin acyc300					5'-CAT TTG CCA TGG ACA AGA TG-3'
G-CSF-R- frag32s	rat	66	233	50	5'-CCA TTG TCC ATC TTG GGG ATC-3'
G-CSF-R- frag265as					5'-CCT GGA AGC TGT TGT TCC ATG-3'
G-CSFR-2582s	mm	64	235	45	5'-TGT GCC CCA ACC TCC AAA CCA-3'
G-CSFR-2817as					5'-GCTAGG GGC CAG AGA CAG AGA CAC-3'
huGCSFR_B1	human	60	~2500	*	5'-GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TCT acc ATG GCA AGG CTG GGA AAC TGC AG-3'
huGCSFR_S_B2					5'-GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC GAA GCT CCC CAG CGC CTC CA-3'
huJAK2_B1	human	56	~3400	*	5'-GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TCT acc ATG GGA ATG GCC TGC CTT ACG ATG A-3'
huJAK2_B2					5'-GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TCA TCC AGC CAT GTT ATC CCT TAT TTG ATC-3'
huJAK2_S_B2					5'-GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TCC AGC

					<i>CAT GTT ATC CCT TAT TTG ATC CA-3'</i>
muPmp22_for2	mm	64	300	35	<i>5'-CAG GCA CCG CTC CTC TGA TCC C-3'</i>
muPmp22_rev2					<i>5'-CTG AAA AGA AGT GGG TGG CAA AGA AGT GCA-3'</i>
Socs3_h_B1	human	58	678	*	<i>5'-GGGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TCT acc ATG GTC ACC CAC AGC AAG TTT CCC-3'</i>
Socs3_h_B2					<i>5'-GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTA AAG CGG GGC ATC GTA CTG GTC-3'</i>
Socs3_h_S_B2					<i>5'-GGGG AC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC AAG CGG GGC ATC GTA CTG GTC C-3'</i>

\* PCR auf cDNA Libraries bzw. auf ENTRY-Klon zur Herstellung von Klonen ohne Stopcodon

### 3.1.10 Tiere

Mäuse	
B6.D2-Pmp22 <sup>Tr-J</sup> /J (Trembler-J, Tr-J)	Ursprünglich gekauft bei <i>The Jackson Laboratory</i> ; eigene Weiterzucht durch Verpaarung eines heterozygoten Weibchens x Wildtyp Männchens; spontane Punktmutation in Pmp22 führt zum Aminosäureaustausch von Prolin gegen Leucin
C57/BL6	Inzuchtstamm; Kontrolltiere; Wildtypiere der eigenen B6.D2-Pmp22 <sup>Tr-J</sup> /J Zucht

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Mikrobiologische Techniken

#### 3.2.1.1 Transformation

Für die Transformation des Rekombinationsansatzes wurden je ein Aliquot von 2,5 µl kompetente DH10B Zellen in 22,5 µl 15 % Glycerin auf Eis aufgetaut und dann vorsichtig zusammen mit 2 µl des BP-Ansatzes in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette mit 1 mm Elektrodenabstand (PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen, Deutschland) pipettiert. Die Zellen wurden elektroporiert (1,8 kV, 200 Ω, 25 µF), danach rasch in 1 ml LB-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C bei 350 rpm geschüttelt.

### 3.2.2 Molekularbiologische Techniken

#### 3.2.2.1 DNA

##### 3.2.2.1.1 *Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien (Mini-Prep)*

Um die Plasmid-DNA aus Bakterien mittels Schnellverfahrens (Mini Prep) zu isolieren, wurden zunächst Kolonien von den LB/ Gent- bzw. LB/ Kan-Agarplatten gepickt und über Nacht bei 37°C in jeweils 3 ml sterilem LB/ Gent- bzw. LB/ Kan-Medium bei 160 rpm geschüttelt. Für die Mini-Prep wurde das QIAprep<sup>®</sup> Spin Miniprep Kit von QIAGEN (Hilden, Deutschland) verwendet. Die Isolierung erfolgte nach Anweisung des Herstellers.

##### 3.2.2.1.2 *Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien in großem Maßstab (Maxi-Prep)*

Zur Isolierung der Plasmid-DNA aus positiven Klonen wurden 100ml steriles LB/ Kan-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C bei 160 rpm kultiviert. Die Plasmid-Isolierung im großen Maßstab erfolgte mit dem NucleoBond<sup>®</sup> Xtra Midi EF/ Maxi EF Kit von Machery-Nagel (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers. Die Konzentration der erhaltenen DNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von  $\lambda=260$  nm nach der Formel

$$c = 50 \mu\text{g/ml} \times \text{OD}_{260\text{nm}} \times V$$

(c = Konzentration in  $\mu\text{g/ml}$ , OD = gemessener OD-Wert, V = Verdünnungsfaktor)

bestimmt und auf  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  mit 1xTAE eingestellt.

### **3.2.2.1.3 Isolierung genomischer DNA aus Mausschwänzen**

Für die Genotypisierung der Mauslinie B6.D2-Pmp22<sup>Tr-J</sup>/J wurden die Schwanzspitzen (etwa 3-6 mm lang) der vier Wochen alten Mäuse mit jeweils  $200 \mu\text{l}$  *direct PCR lysis buffer* und  $40 \mu\text{l}$  einer  $10 \text{ mg/ml}$  Proteinase K-Stammlösung für 3 h bei  $56^\circ\text{C}$  verdaut. Nach Inaktivierung der Proteinase K durch Aufkochen der Proben für 45 min bei  $85^\circ\text{C}$ , wurden diese kurz abzentrifugiert und ihr Überstand in ein neues Eppendorf Tube überführt.

### **3.2.2.1.4 DNA-Gelelektrophorese**

Zur Kontrolle der einzelnen Klonierungsschritte, der PCR bzw. der Restriktionsanalyse erfolgte die Auftrennung der DNA-Fragmente nach der Größe mittels Agarosegelelektrophorese. Je nach prozentualem Anteil an Agarose im Gel wurde Agarose in 1 x TAE-Puffer eingewogen und das Agarosegel durch Erhitzen hergestellt. Nach dem Abkühlen der Agarose wurden je  $6 \mu\text{l}$  Ethidiumbromid zu je 100 ml Agarose gegeben und das Gel in die entsprechenden Gelschlitten gegossen. Die aufzutragenden Ansätze wurden mit 10 x DNA-Auftragspuffer versetzt und die Geltaschen des polymerisierten Gels befüllt. Die Gelelektrophorese wurde in 1 x TAE-Laufpuffer bei ca. 90 V je nach Grad der Auftrennung 20-60 min durchgeführt. Die DNA-Fragmente konnten nach der Auftrennung durch das interkalierende Ethidiumbromid mittels eines UV-Transilluminators sichtbar gemacht werden.

### **3.2.2.1.5 PCR (Polymerasekettenreaktion)**

Mit Hilfe der PCR (Polymerasekettenreaktion, *Polymerase Chain Reaction*) können DNA Fragmente *in vitro* enzymatisch vervielfältigt werden [112], indem spezifische Oligonukleotidprimer an die aufgetrennten, komplementären Stränge des zu vervielfältigenden DNA Fragments binden (Denaturierung und Annealing). Die Elongation findet mit der hitzestabilen DNA Polymerase (*Taq*-Polymerase) statt. Durch die Wiederholung von Denaturierung, Annealing und Elongation kann so eine exponentielle Vervielfältigung des DNA Fragments erreicht werden.

### Allgemeiner PCR-Ansatz (25 µl)

2,5 µl	10 x PCR Puffer
1 µl	MgCl <sub>2</sub>
0,5 µl	10 mM dNTP
0,5 µl	10 µM Primer 1
0,5 µl	10 µM Primer 2
0,2 µl	Polymerase
1-2 µl	genomische DNA/ cDNA
x µl	ddH <sub>2</sub> O

### Allgemeines PCR-Programm

94°C	3 min
<hr/>	
94°C	30 s
> 56°C	30 s
72°C	x s (1kb/ 1 min)
<hr/>	
72°C	7 min

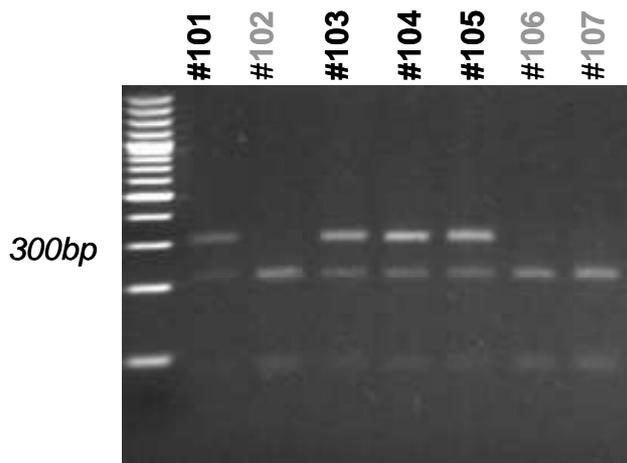
Die Annealing-Temperatur richtete sich nach den jeweiligen Oligonucleotiden, die unter 3.1.9. aufgeführt ist. Die Dauer der Elongation entsprach der Länge des zu amplifizierenden Fragments. Nach Ablauf der PCR wurden die PCR-Produkte mit Hilfe der DNA-Gelelektrophorese (siehe 3.7.1.2.4.) aufgetrennt.

#### **3.2.2.1.6 Genotypisierung des Stammes B6.D2-Pmp22<sup>Tr-J/J</sup>**

Die transgene Mauslinie Trembler-J (B6.D2-Pmp22<sup>Tr-J/J</sup>) enthält eine Punktmutation im peripheren Myelinprotein 22 (Pmp22). Durch einen Nukleotidaustausch von T zu C an Position 47 des *open reading frames* kommt es zu einem Aminosäureaustausch von Leucin gegen Prolin. Zur Überprüfung dieser Punktmutation wurde zunächst eine PCR mit 1,5 µl isolierter genomischer DNA (siehe 3.2.2.1.3.) mit den Primern Pmp22\_for2 und Pmp22\_rev2 (siehe 3.1.9.) durchgeführt, die ein PCR-Fragment mit einer Länge von 300 bp lieferte.

Im Anschluss an die PCR wurden die PCR Proben mit dem QIAGEN Purification Kit nach Anweisung des Herstellers aufgereinigt und in 20 µl TE eluiert. Danach wurden 5 µl des

Eluats mit dem Enzym BfaI für 3 h bei 37°C verdaut, da Wildtyptiere im Gegensatz zu Trembler-J Tieren an Position 47 des *open reading frames* eine Schnittstelle für das Enzym BfaI besitzen. Nach dem Verdau wurden die Ansätze mithilfe einer Agarosegelelektrophorese (siehe Abbildung 9) aufgetrennt. Die erwarteten Fragmente für Wildtyptiere beliefen sich auf eine Größe von 211 und 89 bp. Die heterozygoten Trembler-J Tiere wiesen sowohl eine Bande in der Höhe von 300 bp auf, die dem mutierten Allel entsprach als auch zwei Banden in der Höhe von 211 und 89 bp, die dem Wildtypallel entsprach.



**Abbildung 9 Genotypisierungsbeispiel.** Auf dem Gelbild sind exemplarisch die mit BfaI verdauten PCR-Produkte der Tiere #101- #107 zu sehen, wobei die Tiere #102, #106 und #107 Wildtypen sind. Sie besitzen im Gegensatz zu den anderen Tieren noch auf beiden Allelen die BfaI Schnittstelle. Die heterozygoten Trembler-J Tiere besitzen nur noch auf einem Allel eine Schnittstelle für BfaI.

### 3.2.2.1.7 Gateway Klonierung

Alle im Rahmen dieser Arbeit hergestellten Klone wurden mit Hilfe des Gateway Systems von Invitrogen nach Anweisung des Herstellers kloniert. Mit Hilfe der Gateway Technologie wird eine schnelle, gerichtete Klonierung von Genen und Genfragmenten unabhängig von Restriktionsschnittstellen ermöglicht. Diese Technologie macht sich das Lambda Rekombinationssystem zunutze, indem sie den Transfer von DNA-Sequenzen, die von att-Bereichen flankiert werden, zwischen Vektoren vereinfacht.

In einem ersten Schritt wurden die spezifischen DNA-Fragmente bzw. Gene mittels der B1- und B2-Oligonucleotide (siehe 3.1.9.) amplifiziert. Die attB-PCR-Produkte wurden im Anschluss daran in einen sogenannten ENTRY-Klon integriert. Ausgehend von diesem ENTRY-Klon konnte das DNA-Fragment wahlweise in verschiedene DEST-Vektoren eingebracht werden.

#### 3.2.2.1.7.1 Erzeugung eines ENTRY Klons

Die attB-PCR-Produkte wurden in einer ersten Rekombinationsreaktion, der sogenannten BP-Reaktion, in den ENTRY-Klon integriert.

##### Reaktionsansatz BP-Rekombination:

2 µl	attB-PCR-Produkt (50 ng/ml)
1 µl	BP Reaktionspuffer
1 µl	pDONR <sup>TM</sup> 207 (200 ng/ml)
1 µl	BP-Clonase Enzyme Mix

Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Die erhaltenen Plasmide wurden dann wie unter 3.2.1.1. beschrieben transformiert und auf Gentamycin enthaltenden Selektionsagarplatten ausgestrichen.

#### 3.2.2.1.7.2 Erzeugung eines Expressionsvektors

Die gewonnenen ENTRY Klone wurden in einer zweiten Rekombinationsreaktion, der sogenannten LR-Reaktion, in Expressionvektoren mit C-terminalen Fusionsproteinen (siehe 3.1.5.2.) überführt (Excision).

##### Reaktionsansatz LR-Rekombination:

1 µl	pDest Vektor (100 ng/ml)
1 µl	pENTRY Klon (100 ng/ml)
0,5 µl	LR-Clonase III

Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur über Nacht inkubiert. Die erhaltenen Expressionsplasmide wurden dann wie unter 3.2.1.1. beschrieben transformiert und auf Selektionsagarplatten mit entsprechender Resistenz ausgestrichen.

### **3.2.2.1.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kits der Firma QIAGEN (Hilden, Deutschland) nach Anweisungen des Herstellers.

### **3.2.2.1.9 DNA-Sequenzierung**

Die DNA-Sequenzanalyse wurde nach der Dideoxyterminationsmethode nach Sanger durchgeführt [113]. Die Sequenzierungen wurden von der Firma GATC in Konstanz vorgenommen.

## **3.2.2.2 RNA**

### **3.2.2.2.1 RNA-Isolierung**

Die RNA-Isolierung aus der Zelllinie RSC96 erfolgte mithilfe des RNeasy<sup>®</sup> Mini Kits der Firma QIAgen (Hamburg, Deutschland), indem die konfluenten 6 cm Zellkulturschalen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) mit je 600 µl RLT Puffer (inklusive 60 µl β-Mercaptoethanol) geerntet und lysiert wurden. Der Rest des Protokolls erfolgte nach Anweisung des Herstellers.

Für die RNA-Isolierung aus einem einzelnen Ischiasnerv einer Maus wurde der präparierte Nerv sofort auf Trockeneis gelegt, um den RNA-Abbau durch RNasen zu verhindern. Danach wurde das Gewebe mit dem Ultra Turrax in 350 µl RLT Puffer (inklusive 35 µl β-Mercaptoethanol) für 30 s zerkleinert und homogenisiert. Die weiteren Schritte erfolgten nach Anweisung des Herstellers.

### **3.2.2.2.2 Herstellung Erststrang cDNA**

Die Konzentration der aus RSC96 Zellen isolierten RNA wurde zunächst photometrisch bei einer Extinktion von 260 nm vermessen. Daraufhin wurden bis zu 2 µg RNA mit 2 µl Oligo(dT)-Primern (10 pmol/ µl) und DNase und RNase freies H<sub>2</sub>O in einem Volumen von 10 µl auf Eis zusammen pipettiert und danach für 2 min bei 70°C inkubiert. Der Mix wurde im Anschluss daran wieder auf Eis gestellt und nacheinander 4 µl 5 x First Strand buffer, 2 µl 0,1M DTT, 1 µl 10mM dNTP, 1 µl RNAsin (RNase Inhibitor), 1 µl DNase und RNase freies H<sub>2</sub>O und 1 µl Super Script 3 (reverse Transkriptase) in einem Endvolumen von 20 µl bei

50°C für 60 min in cDNA umgeschrieben. Die Proben wurden bei -25°C für ihre weitere Verwendung aufbewahrt.

Da die gewonnene RNA-Konzentration aus einem Ischiasnerv zu gering war, konnte sie leider nicht photometrisch vermessen werden. Aus diesem Grund wurden 4,5 µl des Eluats für die Synthese verwendet und 0,5 µl Oligo (dT)-Primern (10 pmol/ µl) hinzu pipettiert. Im Anschluss daran wurde wie weiter oben beschrieben verfahren.

### **3.2.2.2.3 Real-Time PCR (quantitative PCR, qPCR)**

Die Real-Time PCR beruht auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und bietet zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen am Ende bzw. während eines PCR-Zyklus durchgeführt. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, da der Fluoreszenzfarbstoff z.B. SYBR<sup>®</sup> Green I in die DNA interkaliert und somit eine Quantifizierung ermöglicht. Der C<sub>T</sub>-Wert (Threshold Cycle = "Schwellenwert-Zyklus") bezeichnet den Beginn des exponentiellen Kurvenverlaufs.

Für die relative Quantifizierung wird ein Referenz-Gen (*house keeping gene*) wie beispielsweise Cyclophilin mitgemessen, um einen relativen Mengenvergleich durchzuführen zu können, indem der C<sub>T</sub>-Wert der gemessenen Probe durch den C<sub>T</sub>-Wert des Referenz Gens geteilt wird.

Für die Real-Time PCR wurde der LightCycler<sup>®</sup> FastStart DNA Master SYBR Green I, die unter 3.1.9. aufgeführten Oligonucleotide G-CSFR-2582s, G-CSFR-2817as, Cyclophilin cyc5 und Cyclophilin acyc300, die aus einem einzelnen Ischiasnerv hergestellte cDNA (siehe 3.2.2.2.2.), und als Negativkontrolle RNase und DNase freies H<sub>2</sub>O verwendet. Der PCR-Ansatz sah dabei wie folgt aus:

4 µl	Mastermix*
1 µl	10 µM Primer 1
1 µl	10 µM Primer 2
12 µl	Ultra Pure DNase/ RNase freies H <sub>2</sub> O

(\*14 µl aus LightCycler<sup>®</sup> FastStart Enzyme + 64 µl LightCycler<sup>®</sup> FastStart Reaction Mix SYBR Green I)

In eine weiße 96-*well*-Platte wurden jeweils 18 µl des PCR Ansatzes vorgelegt. Daraufhin wurden jeweils 2 µl cDNA in drei Verdünnungen (unverdünnt, 1:3, 1:9) hinzupipettiert. Als Negativkontrolle wurde DNase/ RNase freies H<sub>2</sub>O verwendet. Die Platte wurde versiegelt und die PCR-Reaktion gestartet. Die Annealing-Temperaturen und die Zyklenzahl für die jeweiligen Oligonukleotide können der Tabelle 3.1.9. entnommen werden. Die Auswertung erfolgte anhand der ermittelten C<sub>T</sub>-Werte in EXCEL 2003.

#### **3.2.2.2.4 Reverse Transcription (RT) PCR**

Mit Hilfe der sogenannten RT PCR kann die Genexpression von verschiedenen Genen nachgewiesen werden, indem die umgeschriebene cDNA durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) vervielfältigt wird.

Die RNA-Isolierung aus RSC96 Zellen und die Umschreibung in cDNA erfolgte wie unter 3.2.2.2.1. und 3.2.2.2.2. beschrieben. Für die RT-PCR auf den G-CSF-R der Ratte wurden die Primer G-CSF-R-frag32s und G-CSF-R-frag265as, die unter 3.1.9. aufgelistet sind, verwendet. Die Größe des erwarteten Fragments betrug 233bp. Die Negativkontrolle der RT-PCR enthielt keine DNA. Im Anschluss an die PCR wurden die PCR-Proben mit Hilfe der Agarosegel-elektrophorese, wie unter 3.2.2.1.4. beschrieben, aufgetragen und aufgetrennt.

### **3.2.3 Zellbiologische Techniken**

#### **3.2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen**

Alle verwendeten Zelllinien wurden unter Standardbedingungen im Inkubator bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> und wassergesättigter Luft in Zellkulturmedium mit 10 % hitzeinaktiviertem FCS (Hitzeinaktivierung bei 56°C für 30 min) in 10 cm Schalen (Greiner, Frickenhausen, Germany) gehalten. Angaben über das passende Zellkulturmedium für die verwendeten Zelllinien und die Zusätze sind unter 3.1.4.1. zu finden.

Die Zelllinie RSC96 wurde je nach Zelldichte alle 2-3 Tage passagiert. Dabei wurde zuerst das Medium abgesaugt, die adhärennten Zellen mit sterilen 1 x PBS gewaschen und anschließend die Zellen in 2 ml Trypsin/EDTA bei 37°C im Inkubator inkubiert, bis sie sich vom Boden der Schale lösten. Die abgelösten Zellen wurden in 8 ml Zellkulturmedium überführt. Durch das im Medium enthaltene FCS wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellsuspension wurde danach bei 800 g für 5 min bei RT abzentrifugiert und das Pellet in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden für die weitere Kultivierung im

Verhältnis 1:10 bis 1:20 in 15 ml frischem Medium verdünnt. Da es sich bei der Zelllinie NFS-60 um Suspensionszellen handelte, wurden die Zellen mitsamt ihrem Kultivierungsmedium bei 800 g für 5 min bei RT abzentrifugiert und danach wie die Zelllinie RSC96 behandelt.

### 3.2.3.2 Ernte der Zellen und Bestimmung der Zellzahl

Die Zellen wurden wie unter 3.2.3.1 beschrieben geerntet und abzentrifugiert. Nach Resuspension des Pellets wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dafür wurde die Zellsuspension 1:10 mit Trypanblau verdünnt und in die Zählkammer gegeben. Trypanblau ist ein saurer Farbstoff, dessen Anion an zelluläre Proteine toter Zellen, deren Plasmamembran permeabel geworden ist, bindet. Unter dem Mikroskop konnten dadurch die lebenden, farblosen Zellen in den vier Großquadranten gezählt und daraus der Mittelwert gebildet werden. Das Volumen über einem Großquadrat beträgt  $1 \times 10^{-4} \text{ cm}^3$ , sodass sich die Zellzahl pro Millimeter Zellsuspension folgendermaßen berechnen lässt:

$$c [\text{Zellen/ml}] = (V \times N/Q \times 10^4/\text{ml})$$

(c = Konzentration, N = Anzahl der gezählten Zellen, Q = Anzahl der ausgezählten Quadrate (hier = 4), V = Verdünnungsfaktor)

Die für das jeweilige Experiment benötigte Zellzahl wurde im entsprechenden Volumen an Zellkulturmedium resuspendiert und ausplattiert.

### 3.2.3.3 Herstellung stabiler eukaryotischer Zelllinien

Zur Erzeugung stabiler Zelllinien, also der permanenten Integration von eingebrachter DNA in chromosomale DNA, wurden  $3 \times 10^6$  HEK293 Zellen/ 300  $\mu\text{l}$  zusammen mit dem linearisierten Plasmid bzw. der Transfektionskontrolle pUT\_EGF111 mit Hilfe des Nucleofactor<sup>TM</sup> II Systems von Lonza elektroporiert (U=250 V, C=950  $\mu\text{F}$ , R= $\infty$ ) und anschließend in ihrem Kulturmedium auf 15 cm Platten ausgesät. Am folgenden Tag wurde dem Kulturmedium das entsprechende Selektionsantibiotikum zugefügt, dessen optimale Konzentration mit einer sogenannten *Killing Curve* zuvor ermittelt worden war. Die Transfektionseffizienz wurde mit Hilfe der Kontrolle ermittelt. Die Selektion erstreckte sich über 10-14 Tage, wobei das Selektionsmedium alle drei Tage erneuert wurde. Nach dieser

Zeit hatten sich einzelne Kolonien gebildet, die mit Hilfe einer Spitze einer Mikropipette isoliert und in ein *Well* einer 96-well-Platte überführt und kultiviert wurde. Die nachfolgende Kultivierung der Zellklone erfolgte in Kulturmedium, das das Selektionsantibiotikum enthielt. Die Analyse der selektionierten Klone erfolgte durch die Messung der Aktivität des Reporters der Firefly Luciferase.

#### **3.2.3.4 Cytotoxizitätsassay**

Am Vorabend wurden  $2 \times 10^4$  RSC96 Zellen/ well in einer 96-Well Zellkultur-Flachboden-Mikrotiter-Platte (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland) in je 100  $\mu$ l Kulturmedium ausgesät und bei 37°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Kulturmedium vollständig abgenommen und eine Verdünnung von Staurosporin hergestellt, die jeweils in acht Replikaten auf die Zellen gegeben wurde. Danach wurden entweder 50 ng/ml humanes, rekombinantes G-CSF oder der korrespondierende G-CSF Puffer in der gleichen Verdünnung den Zellen hinzugefügt und für 48 h bei 37°C inkubiert. Die Viabilität wurde mit Hilfe des Cell Titer-Blue® Cell Viability Assay (Promega, Mannheim, Deutschland) bei 570 nm im Fluostar gemessen und danach in EXCEL ausgewertet.

#### **3.2.3.5 Stimulationsversuche mit G-CSF**

Am Vorabend wurden  $0,7 \times 10^4$  RSC96 Zellen/ well in einer 6-Well Platte (Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland) in je 3 ml Kulturmedium ausgesät und bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden verschiedene Verdünnungen von humanem, rekombinanten G-CSF hergestellt und diese für 24 h bei 37°C auf den Zellen inkubiert. Danach wurden die Zellen mit eiskaltem 1xPBS gewaschen und dann mit je 200  $\mu$ l eiskaltem Lysispuffer + 1xComplete + 1 x „Phosphostop“ (Roche, Mannheim, Deutschland)/ well für 2 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden im Anschluss daran abgeschabt, in ein frische Eppendorf Tubes überführt und weitere 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellysate mehrmals durch eine Spritze mit 17 gauge gezogen und bei 13000 rpm für 5 min bei 4°C abzentrifugiert. Die Überstände wurde in neue Eppendorf Tubes überführt und bis zur Analyse bei -20°C weggefroren.

#### **3.2.3.6 G-CSF abhängiger Viabilitätsassay**

Die G-CSF abhängige Suspensionszelllinie NFS-60 wurde vor Beginn des Assays zweimal mit Kulturmedium ohne G-CSF (Assaymedium) gewaschen. Danach wurden die Zellen in

einer Zelldichte von  $2 \times 10^4$ /well in eine schwarze 96-well- Flachboden-Mikrotiter-Platte mit durchsichtigem Boden (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) in 50  $\mu$ l Kulturmedium ohne G-CSF ausgesät. Auf einer 96-well Rundbodenplatte wurde eine Verdünnungsreihe mit humanem, rekombinanten G-CSF (AX200) angesetzt, wovon jeweils 50  $\mu$ l zu den Zellen gegeben wurden. Die Zellen wurden für 48 h bei 37°C inkubiert. Für die Detektion der Viabilität wurde der MultiTox-Fluor Multiplexicity Assay von Promega nach Anweisungen des Herstellers angewendet. Die Fluoreszenz wurde im FLUOstar bei 390 nm/ 520 nm gemessen.

### **3.2.3.7 Split TEV Assay**

$2 \times 10^4$  HEK293 Zellen/ well wurden 6 h vor Assaybeginn in eine schwarze 96-well Flachbodenplatte (Bio-one, Greiner, Frickenhausen) in ihrem Kulturmedium ausgesät und bei 37°C inkubiert. Etwa eine Stunde vor Assaybeginn wurde der Transfektionsansatz zusammen mit dem Renilla-Mix angesetzt. Dabei wurden pro Ansatz 10 ng Renilla und je 10 ng DNA verwendet. Die verschiedenen DNAs wurde zusammen mit dem Renilla Mix in je 15  $\mu$ l OptiMEM/ Ansatz und 0,2  $\mu$ l Lipofectamine™ 2000 in je 15  $\mu$ l OptiMEM/ Ansatz pipettiert und für 5 min bei RT inkubiert. Danach wurde der Lipofectamin/ OptiMEM Mix mit dem DNA/ OptiMEM Mix vereint und 20 min bei RT inkubiert. Das Kulturmedium der Zellen wurde komplett abgenommen und 30  $\mu$ l Transfektionsansatz/ well hinzupipettiert und für 2 h bei 37°C inkubiert. Nach 2 h wurden 60  $\mu$ l Kulturmedium mit 5 %HS hinzugefügt und die Platte für weitere 20 h bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Hälfte der Ansätze mit je 50 ng/ ml G-CSF/ well für 48 h bei 37°C stimuliert und im Anschluss daran mit je 30  $\mu$ l Passive Lysis Buffer/ well für 30min auf dem Schüttler lysiert. Die Fluoreszenzmessung erfolgte im Mithras LB 940.

Als Reporter wurden die Firefly Luciferase, und zur Normalisierung und Transfektionskontrolle die Renilla Luciferase verwendet. Die normalisierten Messwerte werden in RLUs (relative luminescence units) dargestellt.

## **3.2.4 Proteine**

### **3.2.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration der Zellüberstände aus 3.2.3.5. erfolgte colormetrisch mit einem BCA Protein-Detektions-Kit der Firma Thermo Scientific. Dabei wird eine Farbreaktion durch Bicinchinon-Säure bei 37°C ausgelöst. Die Farbreaktion

resultiert aus der Reduktion von Kupferionen, die einen Komplex mit den Peptidbindungen der Proteine bilden. Die reduzierten Kupferionen reagieren ihrerseits mit der Bicinchinon-Säure. Es kommt zu einem violetten Farbumschlag. Die Berechnung des Proteingehaltes erfolgte mit Hilfe einer Eichreihe aus Rinderserum Albumin (BSA). Dabei wurden zuerst je 25 µl der Verdünnungen des Albuminstandards in Eppendorf Tubes pipettiert sowie die je 1:25 verdünnten Proben. Danach wurden je 500 µl des Gemisches aus der BCA™ Reagent A-Lösung und der 1:50 darin verdünnten BCA™ Reagent B –Lösung hinzupipettiert und bei 37°C für 30 min inkubiert. Die Proben wurden in einem Photometer bei einer Extinktion von 565 nm gemessen. Die weitere Auswertung der ermittelten Konzentrationswerte erfolgte durch EXCEL, wobei die Verdünnungen der gemessenen Proben berücksichtigt wurden. Um im Western Blot gut detektierbare Banden zu erhalten, wurde bei Proteinlysaten 100 µg Protein eingesetzt.

#### **3.2.4.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese: SDS-PAGE**

Die SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ist ein Verfahren, um Proteine anhand ihres Molekulargewichts in einem elektrischen Feld aufzutrennen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld ist von deren Größe, Form und Ladung abhängig. Durch Inkubation der Proteine in Lämmli-Puffer, der das Detergenz SDS und Thiole, die die Disulfidbrücken innerhalb der Proteine zerstören, enthält, werden diese Proteine vollständig bei 95°C innerhalb von 5 min denaturiert und in ihre Monomere zerlegt. SDS verleiht Proteinen eine stark negative Ladung, indem es an entfaltete hydrophobe Peptidketten der Proteine bindet. Somit kann man Informationen über das Molekulargewicht von Proteinmonomeren erhalten [114]. Für die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese wurden fertige 12 % Proteingele (*Precise Protein Gels*) der Firma Thermo Scientific verwendet. Die Proben wurden volumenangepasst mit reduzierendem 5 x SDS-Ladepuffer versetzt und 5 min bei 95 °C aufgeköcht, abzentrifugiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 1 x SDS-Laufpuffer bei einem konstanten Stromfluss von 25 mA für ungefähr 1 h 30 min durchgeführt.

#### **3.2.4.3 Western Blot**

Nach der Gelelektrophorese wurden die im Gel aufgetrennten Proteine durch das iBlot® Dry Blotting System (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) in einer horizontalen Elektroblokkammer auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Anstelle von Filterpapieren oder Puffertanks

enthalten der obere und der untere Teil der Aufschichtung die notwendigen Puffer sowie die integrierte Kupferkathode und -anode. Der untere Teil der Aufschichtung enthält zusätzlich die 0,2 µm dicke Nitrocellulosemembran.

Der Blotvorgang erfolgte mit dem Programm P3 innerhalb von 7 min. Nach dem Blotten wurde die Membran für 60 min in 1 x PBST + 5 % Magermilchpulver geblockt, um unspezifische Interaktionen zwischen Antikörper und Protein zu verhindern. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper, der ebenfalls in 1 x PBST mit 5 % Magermilchpulver gelöst war, inkubiert. Zur Detektion der jeweiligen Proteine wurde die Membran mit einem primären Antikörper (Phospho-Akt #4060, Bcl-xL # 2762) bei 4°C über Nacht inkubiert. Als Ladekontrolle diente Actin (Actin MAB 1501). Nach der Inkubation über Nacht wurde die Membran am darauffolgenden Tag dreimal je 5 min in 1 x PBST gewaschen. Als Sekundärantikörper dienten entsprechende HRP-konjugierte IgGs aus der Ziege (Dianova, Hamburg, Deutschland, 1:4 000 in 1 x TBST). Die Membran wurde 60 min bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert und anschließend dreimal je 5 min in 1 x PBST gewaschen. Zur Detektion wurde SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (ECL = enhanced *chemiluminescence*) von Pierce laut Anweisung des Herstellers verwendet, indem die Membran mit einer äquivalenten Menge beider Detektionslösungen für 2 bis 5 Minuten inkubiert wurde. Der Röntgenfilm (CL-XPosure<sup>TM</sup> Film, Thermo Scientific, Rockford, USA) wurde daraufhin bis zur gewünschten Intensität des Signals auf die Membran gelegt und anschließend in einer Fotoentwicklungsmaschine entwickelt.

#### **3.2.4.4 Immuncytochemie (ICC)**

RSC96 Zellen wurden mit einer Dichte von  $8 \times 10^4$  / well auf Deckgläschen in einer 24-well Platte ausplattiert. Nach 16 h wurden die Zellen mit 37°C warmen 1 x PBS gewaschen und mit 4 % Paraformaldehyd (PFA) für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem 1 x PBS gewaschen und mit 50 mM Glycin in PBS für 10 min auf Eis inkubiert. Die Permeabilisierung erfolgte nach einem erneuten Waschschrift mit 0,2 % TritonX-100 in PBS für 5 min auf Eis. Vor dem Blockingschritt wurden die Zellen mit TBS gewaschen und dann für eine Stunde mit Blockingpuffer (1 % BSA in TBS) auf dem Taumler inkubiert. Der gegen den G-CSF-R gerichtete Primärantikörper Sc-694 von Santa Cruz wurde 1:100 in 1 % BSA/ TBS verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit Waschpuffer (0,1 % BSA/ TBS) gewaschen und im Anschluss daran mit dem spezifischen Sekundärantikörper anti-Kaninchen-FITC (1:200 in 0,1 % BSA/

TBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Kernfärbung wurden die Zellen für 10 min bei Raumtemperatur mit 1: 10000 in TBS verdünntem DAPI inkubiert und danach kurz mit 10 mM Tris/ HCl gewaschen bevor die Zellen mit Aqua Poly Mount eingebettet wurden.

#### **3.2.4.5 Peptidbibliothek von humanem G-CSF**

Für die Erstellung der Peptidbibliothek wurde die Proteinsequenz von humanen G-CSF (NCBI:NP\_000750) verwendet. Die ersten 29 Aminosäuren der Sequenz wurden bei der Erstellung der Bibliothek nicht mit einbezogen, da sie der Signalpeptidsequenz des Proteins entsprechen. Die Länge der einzelnen Peptide wurde auf 20 Aminosäuren festgelegt, wobei sich die Peptide um jeweils 18 Aminosäuren überlappten. Bei einer Aminosäurenlänge von insgesamt 178 Aminosäuren ergaben sich daraus 80 Peptide. Die Bibliothek wurde mithilfe des Programms „Pepscreen Library Design Tool“ der Firma Sima-Aldrich, einem Programm zur Erstellung von Peptidbibliotheken, entworfen. Die Peptide wurden synthetisiert und durch HPLC und Massenspektroskopie von der Herstellerfirma Genscript analysiert, wobei ein Minimum von 30 % intaktem Protein gewährleistet wurde. Aufgrund der hohen Hydrophobizitätswerte wurden alle Peptide in DMSO gelöst und in mehreren Aliquots sofort bei -80°C weggefroren, um mögliche Oxidationen der Peptide durch das Lösungsmittel zu verhindern. Die Konzentration der Peptide wurde auf 2mM eingestellt, um DMSO ausreichend im Kulturmedium zu verdünnen und somit mögliche unerwünschte Nebeneffekte beim Assay vermeiden zu können.

#### **3.2.4.6 Screening von einzelnen G-CSF Peptiden**

Vor Beginn des Versuchs wurden die NFS-60 Zellen, wie schon unter 3.2.3.6. beschrieben, zweimal mit Assaymedium gewaschen. Danach wurden  $2 \times 10^4$  NFS-60/well in eine schwarze 96-well-Flachboden-Mikrotiter-Platte mit durchsichtigem Boden (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) in je 50 µl Assaymedium ausplattiert und bei 37°C inkubiert.

Parallel dazu wurden zehn 96-well Rundbodenplatten mit je acht Peptiden aufsteigender Nummerierung, zwei Negativkontrollen (G-CSF Puffer) und zwei Positivkontrollen zu je acht Replikaten vorbereitet. Das diagonale Pipettierschema ist Abbildung 10 zu entnehmen: Die beiden Positivkontrollen waren zuvor mit Hilfe der Titrationskurve von G-CSF ermittelt worden. Die erste Positivkontrolle (rot) spiegelte eine 100 %ige Viabilität der NFS-60 Zellen wider. Die zweite Positivkontrolle (orange) zeigte trotz ihrer geringen Molarität stets eine

signifikante Viabilität gegenüber den Negativkontrollen (weiß). Alle Proben einer Platte wurden in jeweils 8 Wiederholungen in diagonaler Anordnung auf die 96-well Platte aufgebracht. Mithilfe dieses Schemas sollten eventuelle Randwelleffekte vermieden werden bzw. die gleichen Bedingungen für die jeweils 8 Replikate auf der Platte herrschen. Das Pipettieren erfolgte automatisch mit Hilfe des MultiProbeII EX von Packard.

	1.Ko									2.Ko	
		1.Ko									2.Ko
2.Ko			1.Ko								
	2.Ko			1.Ko							
		2.Ko			1.Ko						
			2.Ko			1.Ko					
				2.Ko						2.Ko	
		1.Ko						1.Ko			

**Abbildung 10 Pipettierschema des G-CSF Peptidscreenings.** Die Peptide, zwei Negativkontrollen (weiß) und die beiden Positivkontrollen (rot, orange) wurden in jeweils 8 Wiederholungen in diagonaler Anordnung auf eine 96-well Platte aufgebracht, um mögliche Positionseffekte zu vermeiden.

Nach Fertigstellung der Platten wurden je 50  $\mu$ l/ well mit dem Liquidator<sup>96</sup> auf die schwarze 96-well Flachboden-Mikrotiter-Platte mit mit den NFS-60 Zellen tranferiert. Das Endvolumen der zehn fertig beschickten Platten betrug 100  $\mu$ l. Die Platten wurden für 48 h bei 37°C inkubiert. Die Viabilitätsmessung wurde mit dem MultiTox-Fluor Multiplexicity Assay von Promega nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt, wobei die Messung der Fluoreszenz bei 390 nm/ 520 nm im FLUOstar erfolgte.

Das Screening der Peptide wurde bei einer Molarität von 1  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M durchgeführt, wodurch die finale DMSO Konzentration 0,2 % bzw. 2 % betrug. Alle Kontrollen wurden demzufolge mit DMSO angeglichen. Für das 10  $\mu$ M Screening wurde die zweite Positivkontrolle aufgrund der angestiegenen DMSO Konzentration von 2 % erhöht.

### 3.2.4.7 Screening von Peptidblöcken

In einem Multiplex-Ansatz mit bis zu 20 verschiedenen Peptiden pro well sollten mögliche nötige kooperative Effekte unterschiedlicher Proteinepitope getestet werden. Für diesen Zweck wurden die 80 Peptide der Bibliothek in 8 Gruppen zu je 10 Peptiden mit aufsteigender Nummerierung eingeteilt. Ein Peptidblock mit je 10 Peptiden wurde jeweils mit den verbliebenen 7 Peptidblöcken getestet, so dass alle erdenklichen Kombinationen zur Testung ausgeschöpft werden konnten. Die Versuchsdurchführung entsprach dabei dem unter

3.2.4.6. aufgeführten Vorgehen. Die finale DMSO Konzentration betrug, wie bei 10 µM Screening, 2 %, wodurch die zweite Positivkontrolle erhöht werden musste.

### **3.2.5 Tierexperimente**

Für die Tierstudie wurden Trembler-J Mäuse mit C57/BL6 Hintergrund, die eine spontane Punktmutation innerhalb des Pmp22 Genes besitzen, verwendet (B6.D2-Pmp22<sup>Tr-J</sup>/J Stamm; Jackson Laboratory, Bar Harbour, ME, USA). Aufgrund der Mutation an Nukleotidposition 47 kommt es zu einem Aminosäureaustausch von Leucin gegen Prolin. Die Erhaltungszucht der heterozygoten Linie erfolgte durch Verpaarung transgener Weibchen mit Wildtypmännchen. Für alle Experimente wurden transgene Männchen und Weibchen im gleichen Alter verwendet, die gleichmäßig in Behandlungs- und Kontrollgruppe eingeteilt wurden. Alle Tierexperimente wurden vom Regierungspräsidium in Karlsruhe genehmigt.

#### **3.2.5.1 Behandlungsprotokoll**

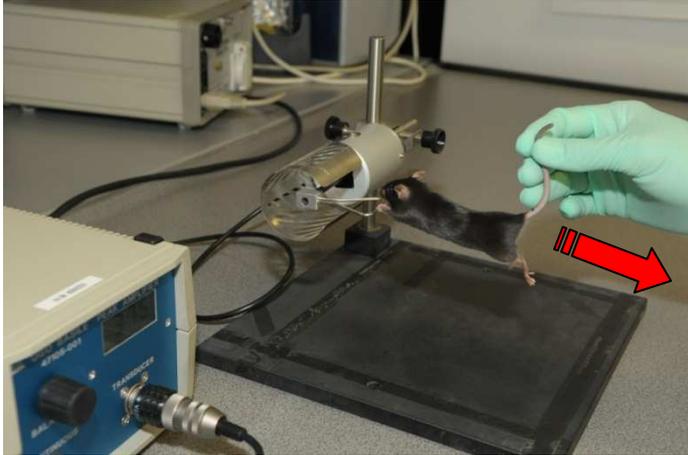
Humanes, rekombinantes G-CSF (AX200, Dr. Reddy's Laboratories, Hyderabad, Indien; 30 mg/kg/day) wurde kontinuierlich mit Hilfe einer osmotischen Minipumpe (Alzet minipump, Modell 2002 und 2004; ALZET Osmotic Pumps, Cupertino, CA, USA) abgegeben, die den Tieren subkutan implantiert worden war. Das hierfür verwendete Lösungsmittel bzw. das Vehikel setzte sich aus 250 mM Sorbitol, 0,004 % Tween-80 und 10 mM Natriumacetatpuffer (pH 4) zusammen. Behandlungsbeginn der Mäuse war im Alter von 6 Wochen, die Behandlungsdauer betrug insgesamt 12 Wochen. Zu Beginn wurde das Minipump Modell 2002 aufgrund der geringen Größe der Tiere verwendet und wurde alle zwei Wochen gewechselt. Im Alter von zehn Wochen wurde das Minipump Modell 2004 implantiert und alle vier Wochen ausgetauscht.

#### **3.2.5.2 Motorische Verhaltenstests**

##### **3.2.5.2.1 Griffstärke Test (Grip Strength test)**

Mithilfe des *Grip Strength* Tests kann die muskuläre Kraft der Vorderläufe eines Tieres und somit sein Krankheitsverlauf verfolgt werden. Die muskuläre Kraft wurde wöchentlich mit Hilfe eines sogenannten *Grip Strength* Meters gemessen. Dieses Gerät besteht aus einer beweglichen, trapezförmigen Stange (Krafttransducer), die mit einem Verstärker verbunden

ist. Der Krafttransducer zeigt die maximale Griffstärke des Tieres im Moment des Loslassens an. Die Messwerte werden in mN wiedergegeben. Der Mittelwert von drei Messungen wurde notiert. Eine Woche vor Beginn der Studie wurde mit den Tieren einmalig trainiert.



**Abbildung 11 Grip Strength Test.** Mithilfe des Grip Strength Tests kann die motorische Kraft des Tieres über die „Griffstärke“ der Vorderläufe gemessen werden, indem das Tier sanft an seiner Schwanzspitze nach hinten gezogen wird.

#### 3.2.5.2.2 Rotarod

Mithilfe des Rotarods, einer Drehstab-Apparatur, können Koordinationsstörungen sowie die gesamtmotorische Leistung von Tieren festgestellt werden. Die Tiere wurden einmal wöchentlich getestet, indem sie auf einen sich um seine Längsachse drehenden zylindrischen Stab gesetzt wurden, der sich innerhalb von 470 s von 3 UPM bis 30 UPM beschleunigte. Die Zeit wurde automatisch festgehalten, sobald ein Tier heruntergefallen war. Der Mittelwert von drei Messungen wurde notiert. Eine Woche vor Beginn der Studie wurde mit den Tieren einmalig trainiert.



**Abbildung 12 Maus Rotarod.** Beim Rotarod handelt es sich um einen sukzessiv schneller um die Längsachse rotierenden Stab, mit dem die motorischen Fähigkeiten sowie die Ausdauer der Tiere bestimmt werden können.

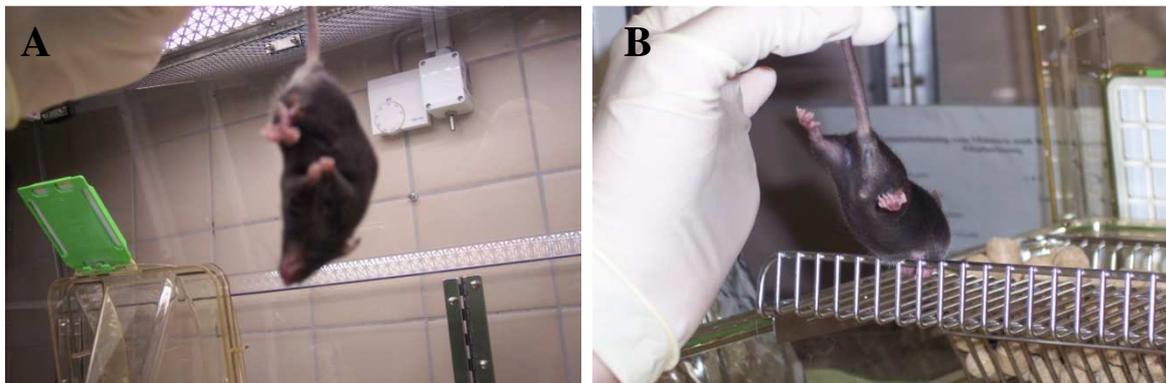
### 3.2.5.2.3 Neuroscore

Beim Neuroscore handelt es sich um eine Bewertungsskala, die den zeitlichen Krankheitsverlauf dokumentieren soll. Für die Untersuchung des Stammes B6.D2-Pmp22<sup>Tr-J</sup>/J wurde der Neuroscore eigenständig durch vorherige, intensive Beobachtung der Tiere entwickelt, wobei die Parameter Fußstellung der beiden Hinterläufe, Gangbild, Tremor und das typische Klammern der Hinterläufe (*hindlimb clasp*) mit einbezogen wurden.

Fußstellung (linker Hinterlauf; rechter Hinterlauf) zur Körperachse	0 = wie Wildtyp 1 = Hinterläufe zeigen < 90° vom Körper weg 2 = Hinterläufe zeigen 90° vom Körper weg
Gangbild	0 = wie Wildtyp: gleichmäßiger Gang auf Zehen 1 = gleichmäßiger Gang auf gesamtem Fuß, Hinterleib leicht abgesenkt

	2 = ungleichmäßiger Gang auf gesamtem Fuß, Hinterleib leicht abgesenkt, reversible Spastiken
Tremor (aktiv)	0 = kein Tremor 1 = leichter Tremor 2 = starker Tremor
Klammern der Hinterläufe	0 = kein Klammern der Hinterläufe 1 = verdrehte Hinterläufe um 180° und Ansetzen zum Klammern 2 = Klammern der Hinterläufe, mitunter Einbezug der Vorderläufe

Die maximale Punktzahl betrug 10, wobei ein höherer Punktwert für ein schlechteres Abschneiden beim Test steht. Der Test wurde einmal wöchentlich durchgeführt.



**Abbildung 13 Neuroscore.** Beide Bilder zeigen Mäuse des Stammes B6.D2-Pmp22<sup>Tr-J</sup>/J. In Bild A ist das typische hindlimb claspung zu erkennen, wohingegen in Bild B ein deutliches Verdrehen der Hinterläufe um 180° erkennbar ist.

### 3.2.5.3 Gewicht

Die Tiere wurden einmal wöchentlich morgens gewogen, um ein Verfälschen der Messergebnisse durch das natürliche Variieren des Gewichts innerhalb eines Tages zu verhindern.

### **3.2.6 Statistik**

Alle Tierexperimente wurden verblindet durchgeführt. Sowohl die Einteilung der Gruppen als auch die Vergabe der Medikamente fand mit Hilfe eines Computer gestützten Randomisierungssystems statt. Die Verblindung wurde erst nach Beendigung der Studie aufgehoben. Alle Messergebnisse wurden in EXCEL 2003 mit Hilfe des t-Tests ausgewertet. Ein p-Wert  $< 0,05$  wurde als signifikant betrachtet. Alle Daten werden als Mittelwerte  $\pm$  SEM dargestellt.

## **4 ERGEBNISSE**

### **4.1 Screening einer Peptidbibliothek des hämatopoetischen Wachstumsfaktors G-CSF**

Um agonistisch wirkende Peptide des Wachstumsfaktors G-CSF (*granulocyte colony stimulating factor*) identifizieren zu können, wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit zwei voneinander unabhängige Methoden angewandt (siehe Anmerkung auf S.98).

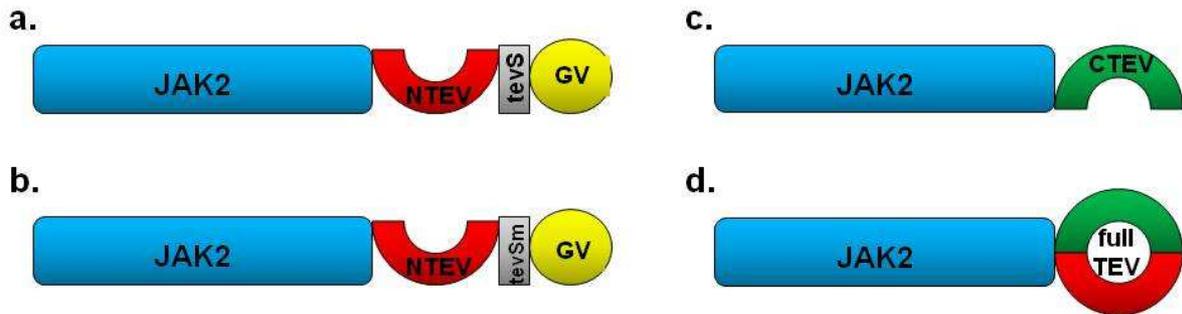
Eine der verwendeten Methoden war der sogenannte Split-TEV Assay mit dessen Hilfe das Screening im 96-well Format durchgeführt werden sollte. Der Split TEV Assay stellt ein neuartiges Messverfahren in lebenden Zellen dar und kann neben der Untersuchung von PPIs auch zur Untersuchung von pharmakologischen Substanzen verwendet werden [61]. Als eine alternative und einfachere Methode wurde die G-CSF abhängige Zelllinie NFS-60 [115] herangezogen, um ein Zelltyp-abhängiges Screeningtool für die Peptidbibliothek neben dem Split-TEV basierten Assay zur Verfügung zu stellen.

#### **4.1.1 Etablierung eines Split-TEV basierten Assays**

##### **4.1.1.1 Klonierung direkter Interaktionspartner des G-CSF Rezeptors und Generierung verschiedener Split-TEV Varianten**

In einem ersten Schritt zur Etablierung eines Split-TEV basierten Assays wurden der humane G-CSF Rezeptor (huG-CSF-R) und seine direkten Interaktionspartner humanes Socs3 (*Suppressor of cytokine signaling 3*) und humanes JAK2 (*Januskinase 2*) als sogenannte ENTRY-Klone kloniert. ENTRY-Klone dienen als Bibliotheksklone des GATEWAY Systems von Invitrogen und sind nicht exprimierbar.

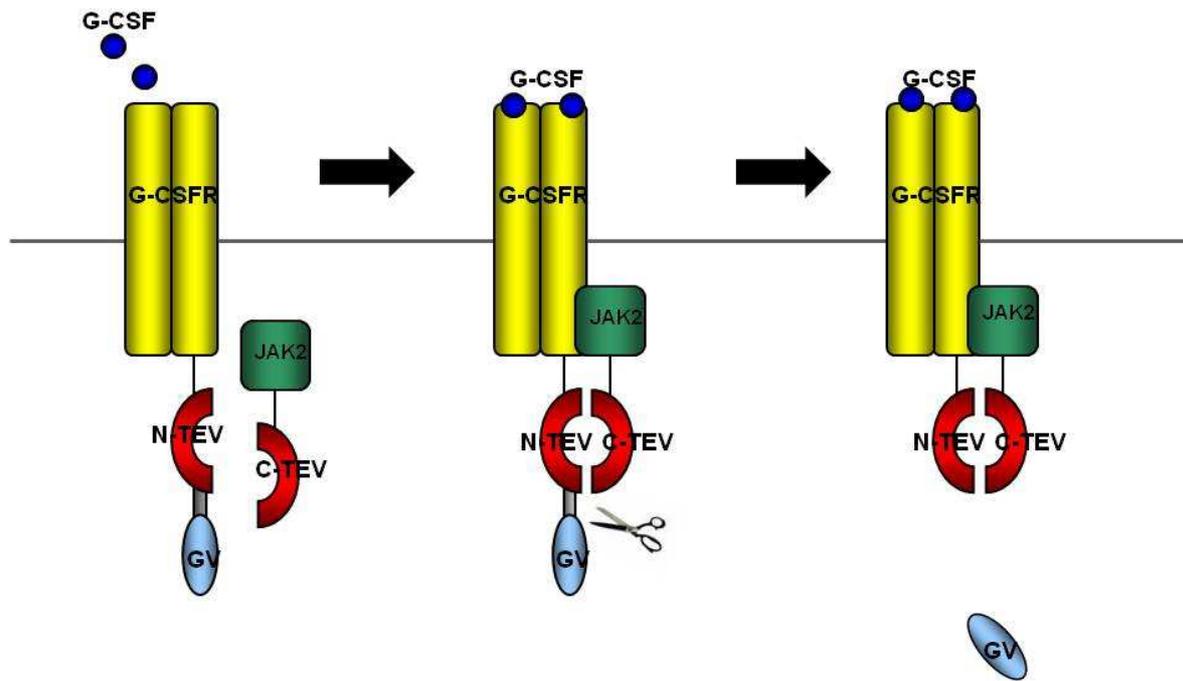
Ausgehend von diesen drei ENTRY-Klonen konnten im Anschluss verschiedene Split-TEV Varianten durch Rekombination, der sogenannten LR-Reaktion, generiert werden. In Abbildung 14 ist als Beispiel für diese Interaktionspartner eine schematische Darstellung der humane JAK2 in all ihren Split-TEV Varianten dargestellt.



**Abbildung 14** Schematische Darstellung der verschiedenen Split-TEV Varianten der JAK2. Abbildung 14 a und b zeigen die JAK2 (Januskinase 2) mit dem N-terminalen Teil der TEV-Protease, der kurzen *tevSite* bzw. der mutierten *tevSite* als Linker, sowie dem Transkriptionsfaktor GV. In Abbildung 14 c ist die Variante mit dem C-terminalen Teil der TEV-Protease dargestellt und Abbildung 14 d zeigt die JAK2 mit der vollständigen TEV-Protease.

#### 4.1.1.2 Etablierung und Optimierung des Split-TEV basierten Assays auf transienter Ebene

In anfänglichen Kontrollexperimenten wurden die einzelnen, komplementären Split-TEV-Komponenten und die spezifischen Reporter der Firefly-Luciferase und der Renilla-Luciferase in verschiedenen Zellsystemen, wie beispielsweise HEK293, SH-SY5Y und PC12, transfiziert. Wie der schematischen Abbildung 15 als Beispiel für solch ein Kontrollexperiment zu entnehmen ist, kann nach der Expression der Plasmide der G-CSF Rezeptor zugefügtes G-CSF binden. Nach dessen Dimerisierung rekrutiert er den direkten Interaktionspartner JAK2 [116]. Durch ihre räumliche Annäherung wird die proteolytische Aktivität der TEV-Protease wieder hergestellt und der Transkriptionsfaktor GV wird abgespalten. Dieser transloziert in den Zellkern und bindet dort an das G5-Element des Firefly- bzw. Renilla-Reporters und aktiviert deren Transkription [61].



**Abbildung 15** Schematische Darstellung eines Split-TEV Assays am Beispiel des huG-CSF-Rezeptors, der durch Bindung von G-CSF aktiviert wird und als Folge davon dimerisiert und huJAK2 rekrutiert. Dadurch kommt es zur Wiederherstellung der Proteaseaktivität der TEV. Durch anschließende proteolytische Freisetzung des spezifischen Transkriptionsfaktors kann dieser in den Kern translozieren und den transkriptionsgekoppelten Reporter aktivieren.

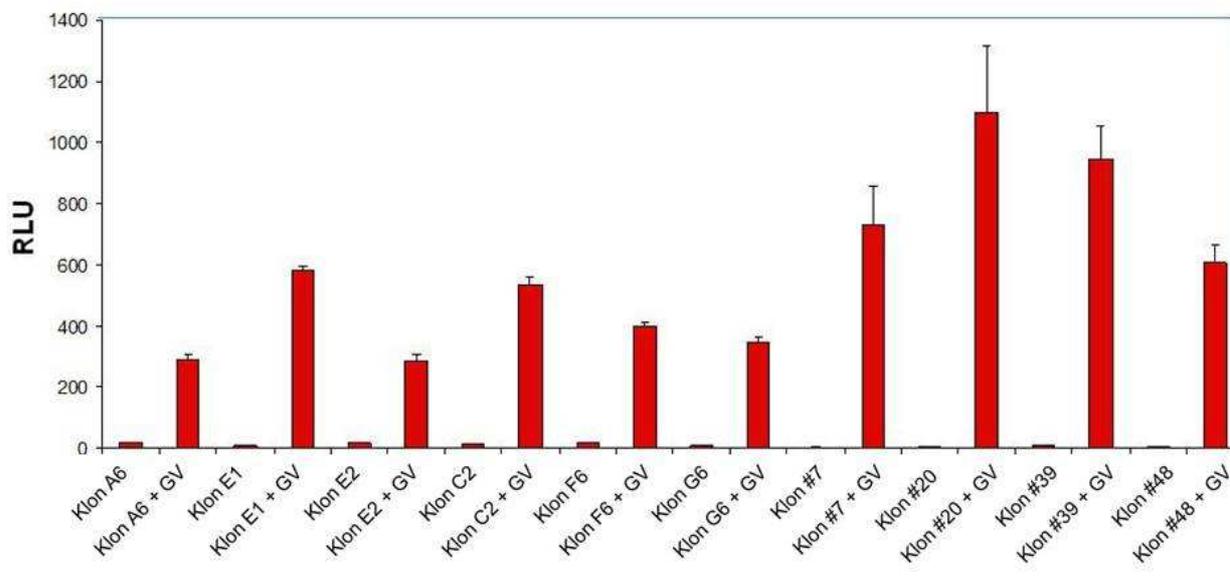
Aufgrund der schlechten Expression des Fusionskonstrukts des humanen G-CSF-Rezeptors konnte zunächst kein robustes Signal des Luciferase-Reporters gemessen werden. Aus diesem Grund wurde zur Optimierung der Expression des Rezeptors die Leadersequenz des ursprünglichen Expressionsvektors gegen die Leadersequenz des pHOOK Vektors ausgetauscht (pEXPR\_HOOK-GCSFR $\Delta$ ). Anschließend wurden die Experimente mit dem verbesserten Rezeptorkonstrukt auf transienter Basis wiederholt. Bei dieser zweiten Generation von Expressionskonstrukten war eine schwache TEV-abhängige Aktivierung des Reporters messbar. Diese Aktivierung geschah jedoch nur unter Verwendung einer vollständigen TEV-Protease, weswegen ein Screening der G-CSF Peptide im größeren Maßstab unter diesen Bedingungen noch nicht möglich war.

#### **4.1.1.3 Etablierung und Optimierung des Split-TEV basierten Assays in stabilen Zelllinien**

Aufgrund der ungenügenden Aktivierung des TEV-abhängigen Reporters in den vorangegangenen Versuchen wurde mit der Herstellung einer stabilen Zelllinie begonnen, da diese ein robusteres zelluläres Signal erzeugen kann, das für das Screening einer G-CSF Peptidbibliothek nötig ist.

Für dieses Vorhaben wurde die Zelllinie HEK293 zusammen mit dem linearisierten Plasmid der Firefly Luciferase (FR-luc) elektroporiert und im Anschluss daran mit Puromycin selektioniert. In einem Primärscreen selektionierter HEK293 Zellen fielen 48 Klone auf. Zehn von diesen HEK293\_FR-luc\_puro Klonen wurden daraufhin näher charakterisiert, indem sie entweder mit dem Transkriptionsfaktor GV oder mit der Negativkontrolle, dem Leervektor pcDNA3, transfiziert wurden. Die Herstellung und der Primärscreen dieser stabilen Klone erfolgten durch Dr. Tobias Fischer im Rahmen des BMBF Projektes Braunschweig/Göttingen/ Hannover (siehe Anmerkung auf S. 98).

In Abbildung 16 sind die Ergebnisse dieser zehn Klone aufgeführt. Bei der Negativkontrolle war durchweg eine sehr geringe Expression des Reportergens nachweisbar. Im Gegensatz dazu zeigte der Klon #20 eine bis zu 1000 fache Expression seines Reporters nach Zugabe des Transkriptionsfaktors. Es handelte sich daher bei den dargestellten Messwerten um eine spezifische Induktion des Reportergens durch seinen Transkriptionsfaktor GV. Aufgrund der hohen Expression der Firefly-Luciferase wurde der Klon #20 für eine Weiterentwicklung der stabilen Zelllinie verwendet.

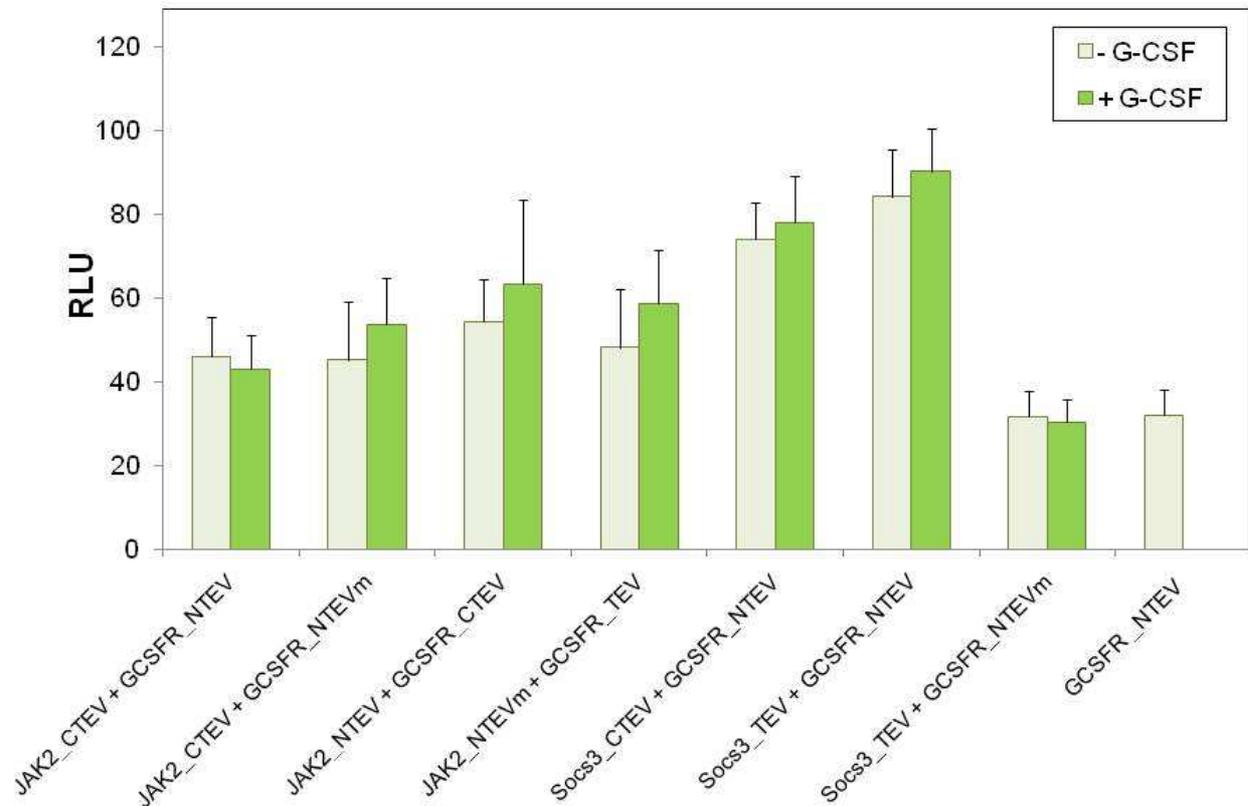


**Abbildung 16** *Testung der stabilen GV sensitiven HEK293 Klone.* Von den 48 HEK293 Zellklonen eines Primärscreens wurden zehn näher charakterisiert. Diese zehn Klone zeigten alle eine GV-abhängige Aktivität, wobei der Klon #20 eine 1000fache Expression der Firefly-Luciferase aufwies und daher als „working clone“ weiterverwendet wurde. GV=Gal4-VP16, RLU= relative luminescence units

Um den Klon HEK293\_FR-luc\_puro #20 näher zu charakterisieren, wurde er in einem anschließenden Split-TEV basierten Assay getestet. Für diesen Zweck wurde der GV-sensitive Klon neben der Renilla Luciferase mit dem modifizierte G-CSF-R (HOOK-GCSFR1AΔ) in verschiedenen Split-TEV Varianten und mit den dazu komplementären Split-TEV Interaktionspartnern transient transfiziert. 16 Stunden nach der Transfektion wurde ein Teil der Zellen dann für 48 h mit G-CSF behandelt, um eine G-CSF abhängige Rezeptoraktivierung mit nachgeschalteter Reporteraktivität zu zeigen. Die Renilla-Luciferase diente als Normalisierung und als Transfektionskontrolle. Als Negativkontrolle diente der modifizierte G-CSF-R mit N-terminaler, inaktiver TEV-Protease zusammen mit G-CSF (HOOK-G-CSFR1AΔ\_NTEV\_tevS\_GV).

In Abbildung 17 sind die RLU Werte mit dem Zellklon „HEK293\_FRluc puro #20“ zu sehen. Bei allen Kombinationen dieses Versuchsansatzes kam es zu keiner spezifischen Aktivierung des Rezeptors und des nachgeschalteten Firefly-Luciferase Reporters durch G-CSF. Offenbar kam es bei keiner der Kombinationen von Rezeptor und Socs3 bzw. JAK2 zu einer Interaktion, die stabil und langfristig genug war, um ein robustes Signal des Reporters zu erhalten. Selbst bei den Ansätzen mit aktiver TEV kam es zu keiner stabilen Interaktion, was

für eine inkorrekte Prozessierung des bereits modifizierten G-CSF-R bzw. für generelle Probleme bei der Interaktion der komplementären Partner sprechen würde.

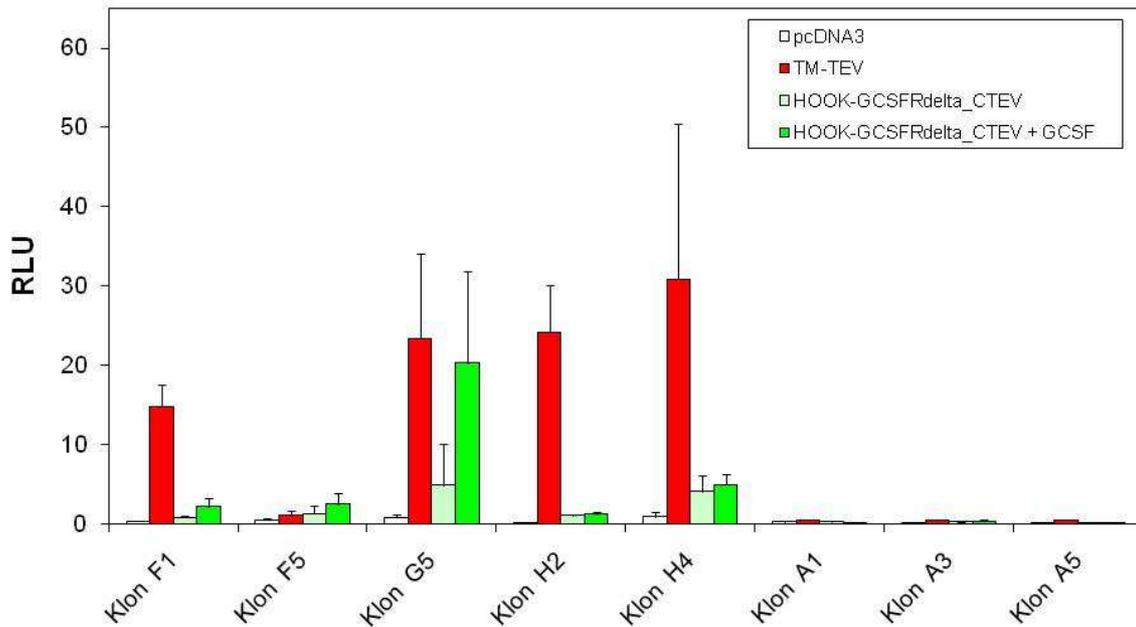


**Abbildung 17 Split-TEV Assay mit der stabilen Zelllinie HEK293\_FRluc puro #20.** Der modifizierte huG-CSF-R in seinen verschiedenen Split-TEV Varianten wurde zusammen mit den dazu komplementären Interaktionspartnern huJAK2 und huSocs3 getestet. Als Negativkontrolle fungierte der Ansatz mit dem modifizierten G-CSFRΔ1A\_NTEV\_tevS\_GV Konstrukt. Keiner der Versuchsansätze zeigte unter Zugabe von G-CSF eine eindeutige Aktivierung des Reporters. NTEV=NTEV\_tevS\_GV; NTEVm=NTEV\_tevSmut\_GV ; CTEV=C-terminales, inaktives Fragment der TEV; fullTEV=aktive TEV-Protease; GV=Gal4-VP16; FR-luc=Firefly-Luciferase, RLU=relative luminescence units

Aus diesem Grund wurde in einem zweiten Schritt der Generierung stabiler Zellklone der Klon HEK293\_FRluc puro #20 erweitert, indem er stabil mit dem Fusionskonstrukt des modifizierten humanen G-CSF-Rezeptors transfiziert wurde. Möglicherweise würde eine stabile Expression des Rezeptors eine korrekte Interaktion erlauben, die für den Split-TEV basierten Assay essentiell ist. Der HEK293-Klon wurde dafür mit dem linearisierten Plasmid des modifizierten Rezeptors pEXPR\_HOOK-GCSFRΔ\_NTEV\_tevS\_GV elektroporiert und nach anfänglicher Selektionierung von 40 Klonen auf seine Funktionalität in vier verschiedenen Ansätzen getestet. Der Leervektor pcDNA3 diente als Negativkontrolle,

transmembranes TEV (TM-TEV) als Positivkontrolle, indem sie bei korrekter Expression des Rezeptors den Transkriptionsfaktor GV abspaltet, der im Anschluss daran die Transkription des Reporters initiiert. Da, wie in der Literatur beschrieben, eine Dimerisierung des G-CSF-Rezeptors unter Bindung von zwei G-CSF Molekülen [116] stattfindet, wurde in einem doppelten Ansatz das Fusionskonstrukt des G-CSF-Rezeptor mit der C-terminalen TEV (pEXPR\_HOOK-GCSFRA\_CTEV) transfiziert. Ein Ansatz wurde dann mit G-CSF stimuliert, der andere blieb als Kontrolle unstimuliert.

Die Ergebnisse der getesteten HEK293\_FRluc puro #20: HOOK-GCSFRA\_NTEV\_tevS\_GV Klone sind Abbildung 18 zu entnehmen. Alle Klone bis auf eine Ausnahme zeigten weder bei der Positivkontrolle mit TM-TEV noch bei der Kontrolle mit dem direkten Interaktionspartner HOOK-GCSFRA\_CTEV unter Zugabe von G-CSF nennenswert erhöhte RLU-Werte, was für eine ungenügende Expression des fusionierten Rezeptors spricht. Dahingegen wies der Klon G5 sowohl eine GCSF-abhängige als auch eine TM-TEV abhängige Aktivität des Firefly-Luciferase Reporters auf. Diese gemessene Reporteraktivität ausgelöst durch die Proteininteraktion bzw. durch Zugabe von TM-TEV war mit einer 20 fachen Aktivierung der Firefly Luciferase nicht sehr hoch. Sie lag weit unter der 1000 fachen Aktivierung des Luciferase Reporters nach Zugabe des Transkriptionsfaktors GV bei dem zuvor getesteten HEK293\_FRluc puro #20 Klon. Für ein Screening einer G-CSF Bibliothek im großen Maßstab war daher auch dieser Klon aufgrund seiner niedrigen Aktivität nicht geeignet.



**Abbildung 18 Screening der HEK293\_FRLuc puro #20: HOOK-GCSFRA\_NTEV\_tevS\_GV Klone.** Die meisten Klone, die für eine nähere Charakterisierung herangezogen wurden, zeigten bis auf Klon G5 keine eindeutige TM-TEV und G-CSF abhängige Aktivität des Firefly-Luciferase Reporters. pcDNA3 = Leervektor (Negativkontrolle), TM-TEV = membranständige und aktive TEV-Protease (Positivkontrolle), RLU= relative luminescence units

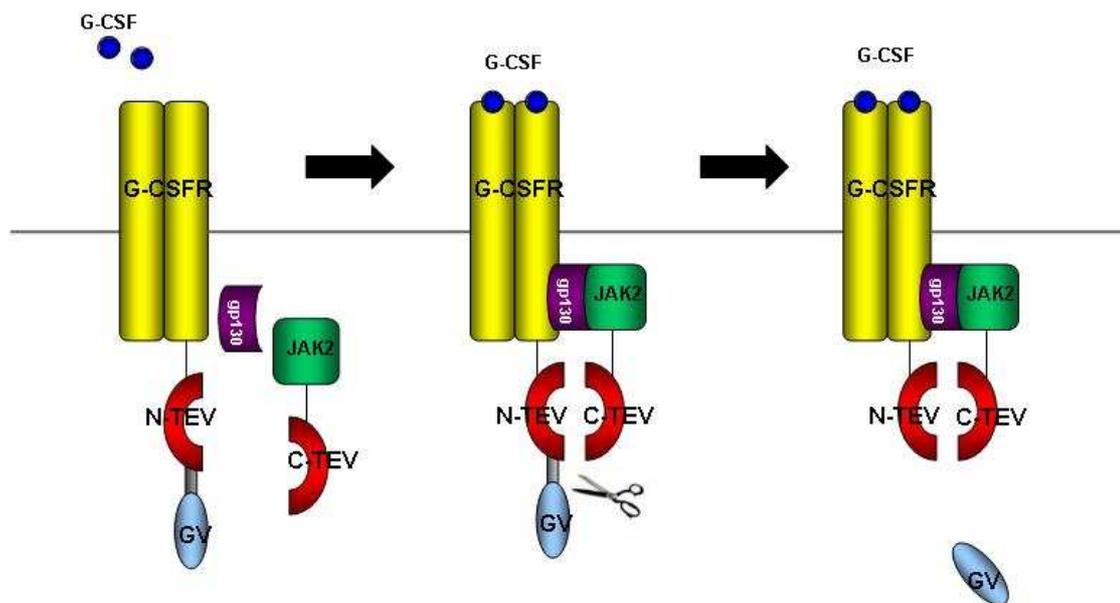
#### 4.1.1.4 Klonierung von Scaffold-Proteinen zur weiteren Etablierung und Optimierung des Split-TEV basierten Assays

Neben der Generierung stabiler Zelllinien wurden Experimente zur weiteren Optimierung des Assays auf transienter Ebene durchgeführt. Zur Stabilisierung der Wechselwirkung des Rezeptors und seinem direkten Interaktionspartners JAK2, und der damit verbundenen Verbesserung der Reporteraktivität wurde mit der Klonierung von gp130, einem sogenannten Scaffold-Protein, begonnen.

Das Protein gp130, auch IL6-Signal-Transducer genannt, ist ein kleines Protein, das an eine Vielzahl von Zytokinrezeptoren als Untereinheit binden kann. Indem die Untereinheit als Dimer an den Rezeptor bindet, werden Tyrosinkinasen wie die Januskinasen in einem ersten Schritt der Signaltransduktion rekrutiert [13, 18].

In Abbildung 19 ist das Modell des optimierten Split-TEV Assays mit den direkten Interaktionspartnern G-CSF Rezeptor, JAK2 sowie gp130 dargestellt, wobei gp130 die Bindung von JAK2 an den GCSF-Rezeptor stabilisieren, und damit ein robustes Signal der Firefly-Luciferase erzeugen soll.

Für die Klonierung des Scaffold Proteins wurden verschiedene Splicevarianten verwendet, die aber nicht exprimiert werden konnten. Eine ausreichende Stabilisierung der direkten Interaktionspartner JAK2 bzw. Socs3 mit dem G-CSF Rezeptor war daher nicht möglich und somit auch keine Verbesserung des Reportersignals. Ein Screening unserer Peptidbibliothek war deswegen mit dem Split-TEV basierten Assay nicht umsetzbar.



**Abbildung 19 Schematische Darstellung des optimierten Split-TEV basierten Assays.** Schematische Darstellung eines Split-TEV basierten Assays am Beispiel des modifizierten G-CSF-Rezeptors, der JAK2 und dem Scaffold-Protein gp130. Das „Hilfsprotein“ soll bei der Interaktion der beiden Fusionskonstrukte behilflich sein und sie ausreichend stabilisieren, damit ein robustes Signal des Reporters durch den Transkriptionsfaktor GV erzeugt wird.

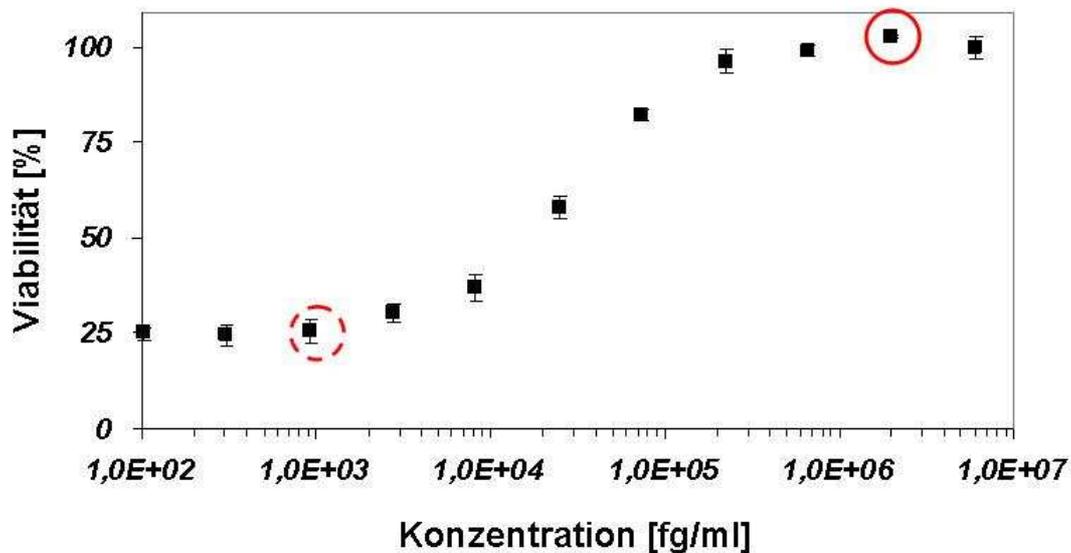
## **4.1.2 Peptidscreening mit der G-CSF abhängigen Zelllinie NFS-60**

Aufgrund der Schwierigkeiten, ein robustes Screeningsystem mit Hilfe des Split-TEV Assays zu etablieren, wurde ein einfacheres System gewählt, das nur ein Zelltyp-abhängiges Screening erlaubte. Bei dieser Zelllinie handelte es sich um die Linie NFS-60, eine murine myeloische Leukämiezelllinie, deren Wachstum und Viabilität von G-CSF bzw. IL-3 abhängig ist [115]. Nachdem dieser alternative Screeningassay erfolgreich etabliert worden war, wurden weitere Optimierungsversuche des Split-TEV basierten Assays eingestellt und das Screening der G-CSF Peptidbibliothek mit der G-CSF abhängigen Zelllinie NFS-60 durchgeführt.

### **4.1.2.1 Entwicklung eines Screening Assays basierend auf der Abhängigkeit von G-CSF**

Zunächst wurde diese Suspensionszelllinie mit seriell verdünntem G-CSF stimuliert, und die Anzahl lebender Zellen in Kultur photometrisch mit dem MultiTox Glo Assay (Promega) bestimmt. Für diesen Zweck wurden die NFS-60 Zellen in ihrem Kulturmedium ohne G-CSF ausgesät und mit seriell verdünntem G-CSF für 48 h bei 37°C stimuliert, um eine konzentrationsabhängige Viabilität in Abhängigkeit von G-CSF zeigen zu können.

In Abbildung 20 ist die Viabilitätskurve der Zelllinie NFS-60 dargestellt. Bei einer Konzentration von 2 ng/ml G-CSF, was einer Molarität von etwa 0,1 nM entspricht, zeigten die Zellen 100 %ige Viabilität. Dagegen wiesen die Zellen bei einer Konzentration von lediglich 2,7 pg/ml G-CSF eine stark geminderte Viabilität auf, die jedoch gegenüber den nicht behandelten Zellen noch signifikant erhöht war. Eine Konzentration von 2,7 pg/ml entspricht dabei einer Molarität von 0,1 pM. Diese beiden G-CSF-Konzentrationen wurden für das Screening einer Peptidbibliothek von G-CSF als Positivkontrollen verwendet. Als Negativkontrollen diente DMSO zusammen mit dem für G-CSF verwendeten Puffer (AX-200 Puffer). Diese beiden gewählten Konzentrationen gewährleisteten zum einen eine hohe Sensitivität des Assays, und zum anderen die Möglichkeit der Aktivitätsabschätzung potenzieller Hits.



**Abbildung 20 Viabilitätsassay auf NFS-60 Zellen mit einer Konzentrationsreihe von G-CSF.** Die Suspensionszelllinie NFS-60 wurde nach dem Aussäen mit seriell verdünntem G-CSF stimuliert und bei 37°C für 48 h inkubiert. Zwei der Messwerte innerhalb der Viabilitätskurve wurden als Positivkontrollen für das Peptidscreening verwendet, wobei eine Konzentration von 0,1 nM G-CSF (roter Kreis) einer 100%igen Viabilität und eine Konzentration von 0,1 pM G-CSF (roter, gestrichelter Kreis) der niedrigsten signifikanten Viabilität entspricht.

#### 4.1.2.2 Screening von einzelnen Peptiden

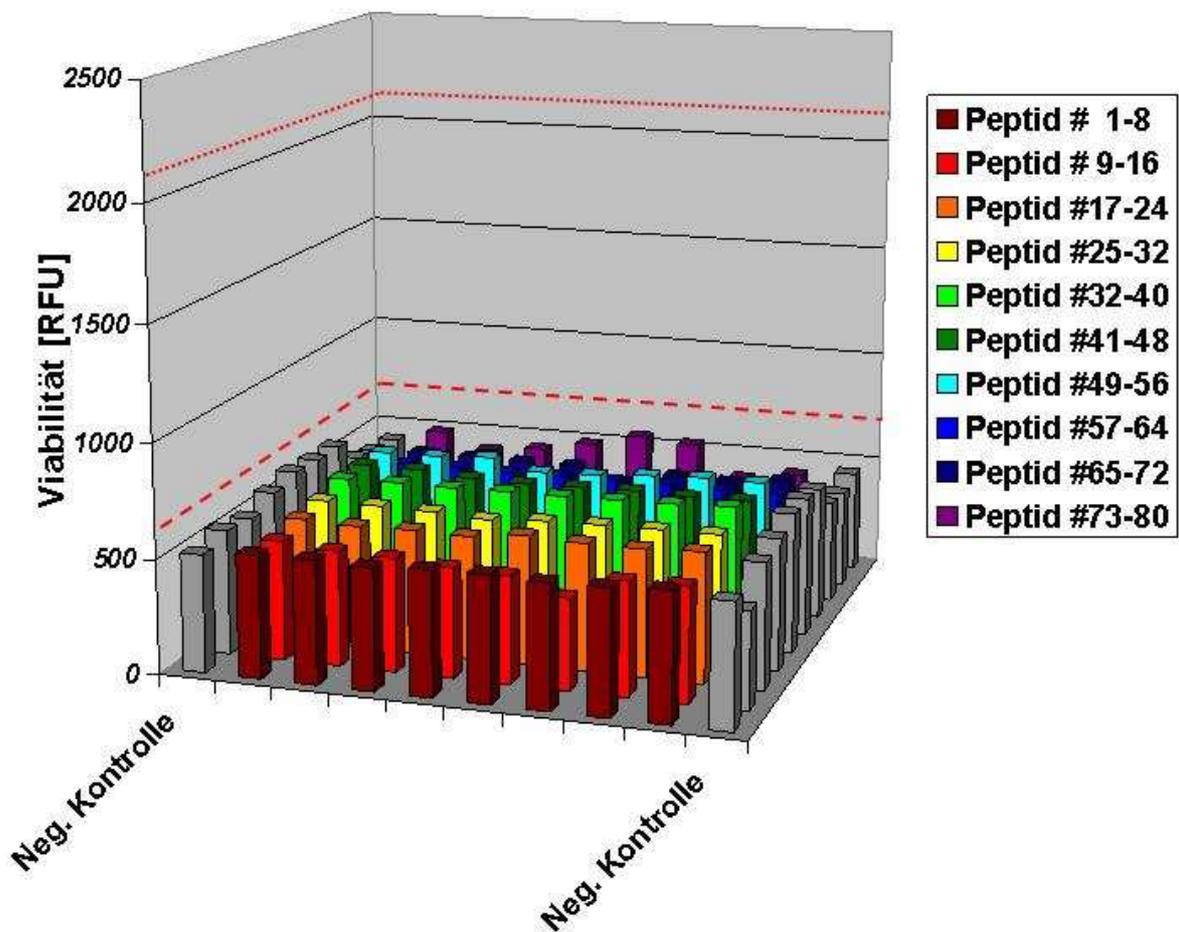
Für die Erstellung der Peptidbibliothek wurden die ersten 29 Aminosäuren der Aminosäuresequenz von G-CSF entfernt, da diese lediglich an der Prozessierung innerhalb der Zelle beteiligt sind. Die Länge der einzelnen Peptide der Bibliothek betrug 20 Aminosäuren, wobei die Peptide um jeweils 18 Aminosäuren überlappen. Bei einer Länge von insgesamt 178 Aminosäuren ergaben sich daraus 80 Peptide (siehe Abbildung 21). Aufgrund ihres sehr hohen Hydrophobizitätswertes wurden alle Peptide in DMSO gelöst. Demzufolge mussten sowohl die Positiv- als auch die Negativkontrollen mit dem gleichen prozentualen Anteil an DMSO angeglichen werden.

ATPLGPASSLPQSFLLKCLE (20) [0.64]  
 PLGPASSLPQSFLLKCLEQV (20) [0.67]  
 GPASSLPQSFLLKCLEQVRK (20) [0.45]  
 ASSLPQSFLLKCLEQVRKIQ (20) [0.49]  
 SLPQSFLLKCLEQVRKIQGD (20) [0.44]  
 PQSFLLKCLEQVRKIQGDGA (20) [0.37]  
 SFLLKCLEQVRKIQGDGAAL (20) [0.44]  
 LLKCLEQVRKIQGDGAALQE (20) [0.31]  
 KCLEQVRKIQGDGAALQEKL (20) [0.18]  
 LEQVRKIQGDGAALQEKLVS (20) [0.21]  
 QVRKIQGDGAALQEKLVSSEC (20) [0.2]  
 RKIQGDGAALQEKLVSSECAT (20) [0.18]  
 IQGDGAALQEKLVSSECATYK (20) [0.28]  
 GDGAALQEKLVSSECATYKLC (20) [0.36]  
 GAALQEKLVSSECATYKLCHP (20) [0.44]

*Abbildung 21 Design der Peptidlibrary. Ausgehend von der G-CSF Sequenz wurde eine sich überlappende Peptidbibliothek angefertigt. Die Peptide besitzen eine Länge von 20 mer und überlappen sich jeweils um 18 Aminosäuren. Der Hydrophobizitätswert in den eckigen Klammern gibt die Ladung des Peptids an.*

Für das Screening wurden zwei Negativkontrollen, die beiden Positivkontrollen (0,1 nM G-CSF und 0,1 pM G-CSF) und acht Peptide mit je acht Replikaten diagonal auf die Platte mit den darin enthaltenen Suspensionszellen aufgebracht. Dieses Pipettierschema sollte eventuelle Positionseffekte vermeiden (siehe Abbildung 10).

In Abbildung 22 sind die Ergebnisse des gesamten Peptidscreenings mit einer Molarität von 1  $\mu$ M, also einer  $10^4$  fach höheren Molarität als die der niedrigeren Positivkontrolle, zu sehen. Die Mittelwerte aller Positivkontrollen sind als rote Linien in der Abbildung dargestellt (gepunktete zweite Positivkontrolle, gestrichelte erste Positivkontrolle). Die Negativkontrollen entsprechen den grauen Balken innerhalb der Abbildung. Die mittlere Standardabweichung von acht Replikaten der Negativkontrolle betrug +/- 6,37 % und die der gescreenten Peptide +/- 5,81 %. Keines der getesteten Peptide der Bibliothek bewirkte bei einer Molarität von 1  $\mu$ M eine signifikante Erhöhung der Viabilität gegenüber den Negativkontrollen.

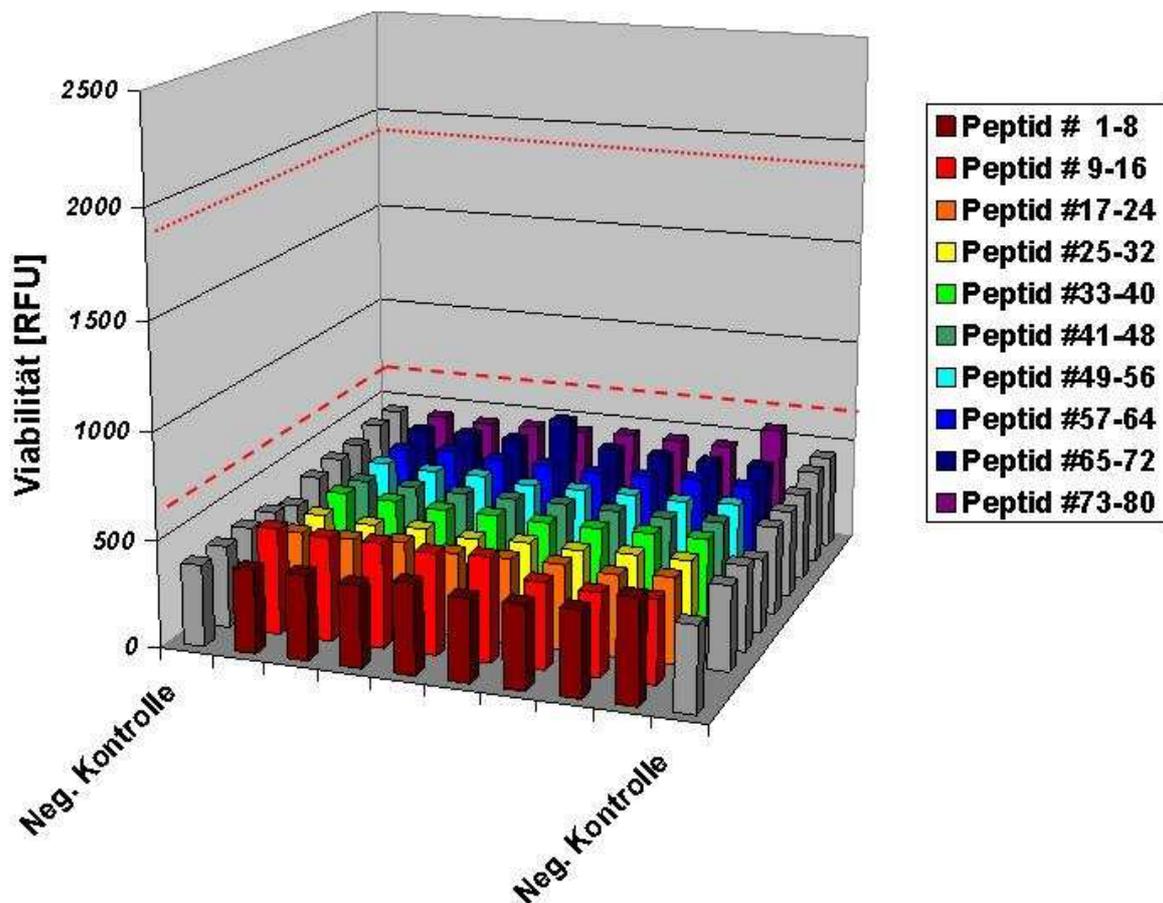


**Abbildung 22 Ergebnisse des 1  $\mu$ M Peptidscreenings.** Jede 96-well Platte (eine Balkenreihe) beinhaltete zwei Negativkontrollen ohne G-CSF (graue Balken) und zwei Positivkontrollen mit einer Molarität von 0,1 nM und 0,1 pM G-CSF. Die Mittelwerte aller Positivkontrollen sind als rote Linien in der Grafik dargestellt (rote gepunktete Linie = erste Positivkontrolle, rote gestrichelte Linie = zweite Positivkontrolle). Keines der 80 gescreenten Peptide bewirkte eine signifikante Erhöhung der Viabilität im Vergleich zu den Negativkontrollen.

Im Anschluss an das 1  $\mu$ M Peptidscreening wurde ein zweiter Screen mit einer Molarität von jeweils 10  $\mu$ M pro Peptid durchgeführt, was einen Anstieg des DMSO-Gehalts von 0,2 auf 2 % bedeutete. Während dieser DMSO Gehalt keinen Einfluss auf die erste Positivkontrolle von 0,1 nM G-CSF hatte, musste die zweite Positivkontrolle aufgrund der Sensitivität der verwendeten Zelllinie gegenüber höheren DMSO Konzentration von 0,1 auf 3,4 pM G-CSF erhöht werden.

Die Ergebnisse dieses Screens sind der Abbildung 23 zu entnehmen. Aufgrund der zehnfachen Erhöhung des DMSO-Gehalts waren die durchschnittlichen Viabilitätswerte der Negativkontrollen im Vergleich zum vorangegangenen Screening deutlich reduziert. Die beiden Positivkontrollen zeigten eine signifikante Erhöhung der Viabilität in allen gemessenen

96-well Platten gegenüber den Negativkontrollen (Mittelwerte als rote Linien dargestellt). Keines der 80 getesteten Peptide bewirkte bei einer Molarität von je 10  $\mu\text{M}$  eine signifikante Erhöhung der Viabilität im Vergleich zu den beiden Negativkontrollen.



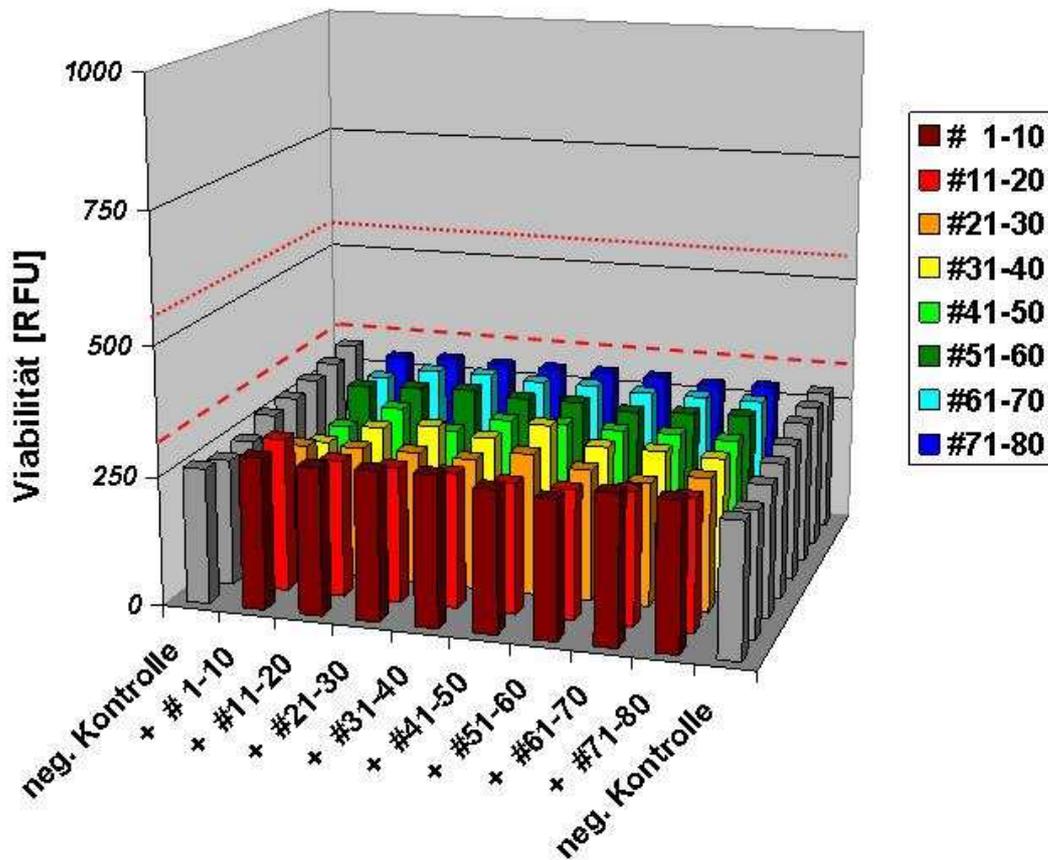
**Abbildung 23 Ergebnisse des 10  $\mu\text{M}$  Peptidscreenings.** Jede 96-well Platte (eine Balkenreihe) beinhaltete zwei Negativkontrollen ohne G-CSF und zwei Positivkontrollen mit einer Molarität von 0,1 nM und 3,4 pM G-CSF. Die Mittelwerte der zwei Positivkontrollen sind als rote Linien in der Grafik dargestellt (rote gepunktete Linie = erste Positivkontrolle, rote gestrichelte Linie = zweite Positivkontrolle). Keines der 80 gescreenten Peptide bewirkte eine signifikante Erhöhung der Viabilität im Vergleich zu den Negativkontrollen (graue Balken).

#### 4.1.2.3 Screening von Peptiden in einem Multiplex-Ansatz

Da beide Screeningansätze mit einer Molarität von 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  keine positiven Hits ergaben, wurde in einem letzten Versuch ein Multiplex Ansatz angewendet. Dieser Multiplex Ansatz basiert auf der Vorstellung möglicher notwendiger kooperativer Effekte verschiedener Proteinepitope, um den G-CSF-R vollständig aktivieren zu können. Für diesen Zweck wurden die 80 Peptide der Bibliothek in acht Gruppen zu je zehn Peptiden mit aufsteigender Nummerierung eingeteilt. Solch ein Peptidblock mit je zehn Peptiden wurde jeweils mit den verbliebenen sieben Peptidblöcken getestet, so dass alle kombinatorischen Möglichkeiten ausgeschöpft wurden.

Da die Zelllinie NFS-60 in den vorangegangenen Tests eine gesteigerte Sensitivität gegenüber erhöhten DMSO Konzentrationen gezeigt hatte, konnten in einem Ansatz bis maximal 20 Peptide mit einer Molarität von insgesamt 10  $\mu\text{M}$  (0,5  $\mu\text{M}$  je Peptid) getestet werden. Wie zuvor schon beschrieben, musste der DMSO-Gehalt entsprechend auf 2 % angeglichen werden und die zweite Positivkontrolle von 0,1 pM auf 3,4 pM erhöht werden.

Abbildung 24 zeigt die Ergebnisse dieses Multiplex Ansatzes, wobei die Negativkontrollen als graue Balken und die Mittelwerte aller Positivkontrollen als rote Linien in der Abbildung dargestellt sind. Die Negativkontrollen zeigten ähnlich niedrige Viabilitätswerte wie in den vorangegangenen Messungen des 10  $\mu\text{M}$  Peptidscreenings und obwohl jede mögliche Kombination an Peptiden der Bibliothek getestet wurde, ergab dieses Screening keine signifikanten Treffer. Einige der Peptidkombinationen zeigten eine leichte Erhöhung in ihrer Viabilität, die aber nie signifikant war und nie im Messbereich der zweiten Positivkontrolle lag.



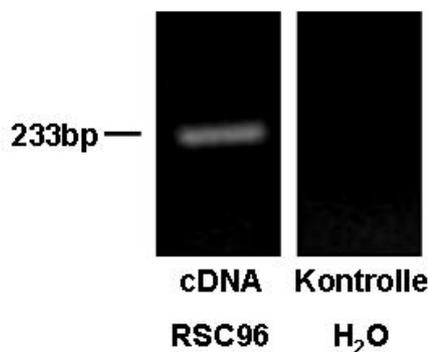
*Abbildung 24 Ergebnisse des Multiplex Screening Ansatzes. NFS-60 Zellen wurden mit vier Kontrollen und acht Peptidblöcken inkubiert, wobei die Kontrollen je zwei Negativkontrollen ohne G-CSF und zwei Positivkontrollen mit einer Molarität von 0,1 nM und 3,4 pM G-CSF enthielten. Ein Peptidblock bestand aus zehn Peptiden mit aufsteigender Nummerierung und wurde mit den verbliebenen sieben Peptidblöcken nacheinander getestet. Keine der Kombinationen bewirkte eine Erhöhung der Viabilität im Vergleich zu den Negativkontrollen.*

## 4.2 Untersuchung zur Wirkung von G-CSF in einem Mausmodell für CMT1A

### 4.2.1 Expression des G-CSF-R *in vitro* und *in vivo*

Um eine mögliche protektive Wirkung des Wachstumsfaktors G-CSF in einem Tiermodell für CMT1A untersuchen zu können, wurde zunächst die Expression des G-CSF Rezeptors (G-CSF-R) in der Schwanzzelllinie RSC96 überprüft. Bei dieser Zelllinie handelt es sich um adhärenzte Schwanzzellen aus der Ratte, die spontan immortalisiert sind [117]. RSC96 Zellen wurden im Rahmen dieser Arbeit für alle *in vitro* Tests verwendet.

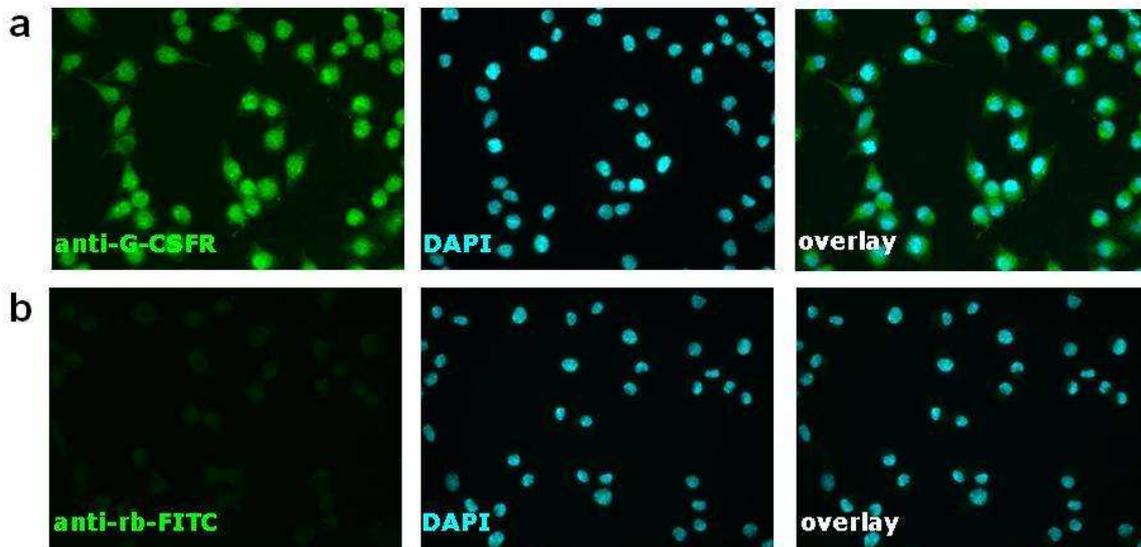
Der Nachweis des G-CSF-R erfolgte auf verschiedenen zellulären Ebenen mittels RT-PCR und Immunocytochemie. Mit Hilfe einer *Reverse Transcription* (RT) PCR wurde der Rezeptor auf RNA Ebene detektiert. Mit den beiden Oligonukleotiden G-CSF-R-frag32s und G-CSF-R-frag265s für den G-CSF-R konnte ein spezifisches PCR-Produkt in der erwarteten Größe von 233 bp im Agarosegel detektiert werden (siehe Abbildung 25).



**Abbildung 25** *Detektion des G-CSF-R auf RNA-Ebene. Mit Hilfe von spezifischen Oligonukleotiden konnte der G-CSF-R in einer RT-PCR nachgewiesen werden. Das PCR-Produkt wurde mittels einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und lieferte ein spezifisches Fragment in der erwarteten Bandenhöhe von 233 bp. Als Negativkontrolle diente Wasser.*

In einem weiteren Schritt wurde der G-CSF-R auf Proteinebene detektiert. Hierfür wurden die RSC96 Zellen mit 4%-iger Paraformaldehyd-Lösung (PFA) fixiert, um sie in einer Immunfluoreszenzfärbung weiter analysieren und eine Aussage über die Expression des Rezeptors treffen zu können. Die Färbung des G-CSF-R erfolgte dabei mit dem Primärantikörper sc-694, die Färbung der Zellkerne mit DAPI. Als Negativkontrolle diente der FITC-markierte Sekundärantikörper aus dem Kaninchen.

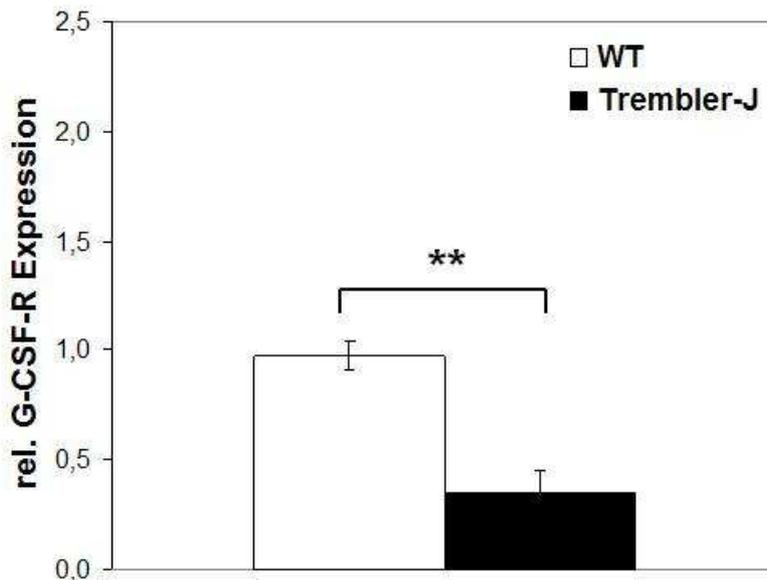
Abbildung 26 a zeigt die spezifische Immunfluoreszenzfärbung einer RSC96 Kultur gegen den G-CSF-R. Jede der abgebildeten Schwanzzellen in dem gezeigten Bildausschnitt der Zellkultur exprimiert den Rezeptor. Dagegen ist in Abbildung 26 b die Immunfluoreszenzfärbung der Negativkontrolle mit dem Sekundärantikörper zu sehen.



**Abbildung 26** Immunfluoreszenzfärbung der immortalisierten Schwanzzelllinie RSC96. Die ausgesäten Schwanzzellen wurden am nächsten Tag mit PFA fixiert, die Zellmembran permeabilisiert und unspezifische Bindestellen mit BSA geblockt. Abbildung 26 a zeigt die Immunfluoreszenzfärbung gegen den G-CSF-R, wohingegen die Abbildung 26 b die Negativkontrolle zeigt.

Neben dem Nachweis des G-CSF-R in der immortalisierten Schwanzzelllinie RSC96 sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene wurde der Rezeptor auch *in vivo* detektiert.

In Abbildung 27 sind die normalisierten Ergebnisse der relativen G-CSF-R-Expression dargestellt. Es besteht ein signifikanter Unterschied in der Rezeptorexpression zwischen Wildtyp und Trembler-J Tieren. Im Gegensatz zu den Wildtyp-Tieren exprimieren die Trembler-J Tiere 70 % weniger G-CSF-R im Alter von 20 Wochen.



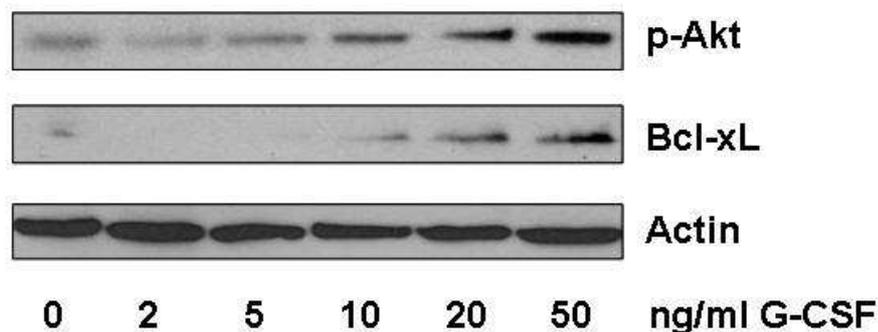
**Abbildung 27 Ergebnisse der G-CSF-R Expression mittels Real Time PCR.** Für die RNA Isolierung wurde jeweils fünf Tieren pro Gruppe ein Ischiassnerv entnommen. Danach wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und diese mit spezifischen Primern in einer Real-Time PCR analysiert. ( $p=0,0006$ )

#### **4.2.2 G-CSF aktiviert anti-apoptische Signalwege in der Schwanzzelllinie RSC-96**

Für die Aktivierung anti-apoptischer Signalwege muss zunächst die Dimerisierung des G-CSF-R durch Bindung von G-CSF ausgelöst werden [118]. Dieser rekrutiert dann seine direkten Interaktionspartner wie beispielsweise JAK2 und STAT3 [20, 21]. JAK2 wiederum kann über die PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) Akt (Proteinkinase B) aktivieren (PI3K/Akt-Signalweg) und STAT3 das anti-apoptische Protein Bcl-xL [19, 119]. Mit Hilfe von Western Blots sollten die Signalwege des G-CSF-Rezeptors in der Zelllinie RSC96 unter Einfluss von zunehmenden Konzentrationen an G-CSF näher untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden RSC96 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von G-CSF für 24 h stimuliert. Für den Nachweis der Aktivierung der anti-apoptischen Signalwege *downstream*

des G-CSF-R wurden Antikörper gegen phosphoryliertes Akt (P-Akt) und Bcl-xL verwendet. Als Ladekontrolle wurde ein Antikörper gegen das *housekeeping gene* Actin verwendet.

In Abbildung 28 ist die konzentrationsabhängige Aktivierung des Akt-Signalweges dargestellt. Mit zunehmender Konzentration an G-CSF steigt der Phosphorylierungsgrad von Akt. Die Expression des antiapoptotischen Proteins Bcl-xL nahm mit steigender Konzentration an G-CSF ebenfalls zu. Actin als Ladekontrolle zeigte eine regelmäßige Proteinverteilung der Banden.

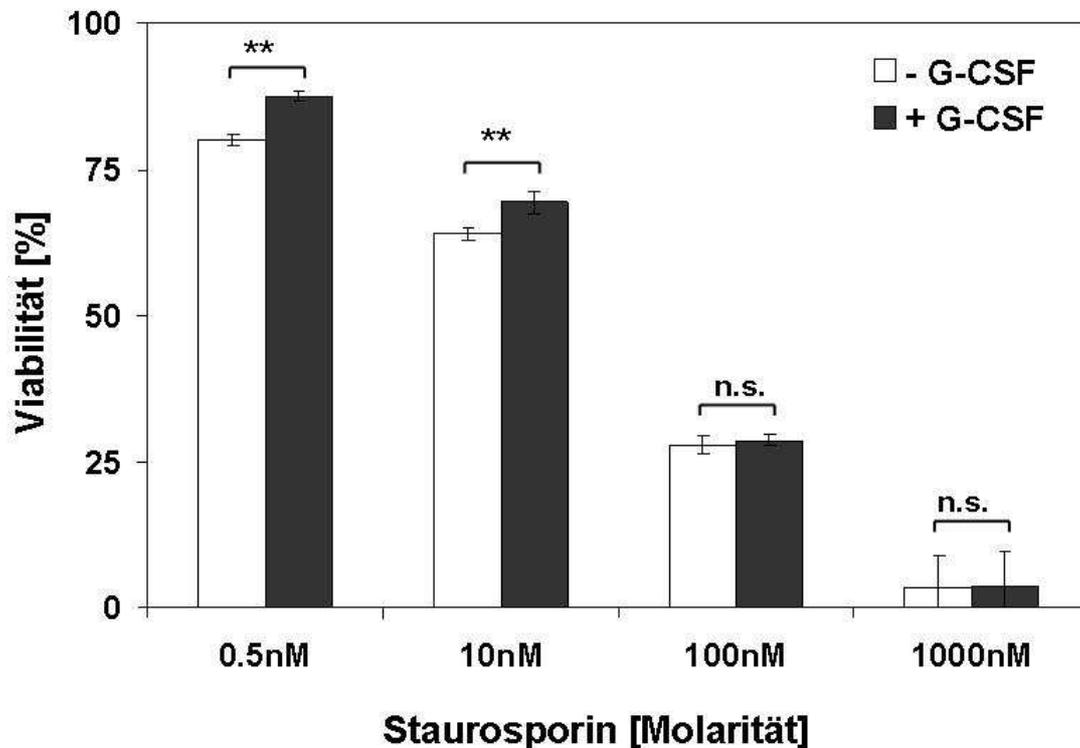


**Abbildung 28 Konzentrationsabhängige Stimulationsversuche mit huG-CSF auf der Schwannzelllinie RSC96.** RSC96 Zellen wurden am Vortag ausgesät und am nächsten Tag mit 0-50 ng/ml huG-CSF stimuliert. Nach der Lyse der Zellen wurde die Proteinkonzentration der Überstände bestimmt und im Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit Primärantikörpern gegen p-Akt, Bcl-xL und Actin, sowie den HRP-konjugierten Sekundärantikörpern gegen Kaninchen und Maus IgG.

Bei dem Alkaloid Staurosporin handelt es sich um einen Breitspektrum-Kinase Inhibitor, der in vielen Zelllinien Apoptose induzieren kann [120, 121]. Ursprünglich wurde Staurosporin im Jahr 1977 zum ersten Mal aus *Streptomyces staurosporeus* isoliert [122] und kann durch Aktivierung der Procaspase-3 Apoptose auslösen [120]. Die genaueren zugrundeliegenden Mechanismen sind allerdings immer noch unklar. Um die protektiven Eigenschaften von G-CSF näher zu untersuchen, wurde die immortalisierte Schwannzelllinie RSC96 mit unterschiedlichen Molaritäten des Alkaloids Staurosporin behandelt. Auf diese Weise konnte in den Zellen Apoptose induziert werden.

Abbildung 29 zeigt die Ergebnisse der Stimulation mit 0,5 nM, 10 nM, 100 nM und 1000 nM Staurosporin auf RSC96 Zellen. Alle Ansätze wurden entweder mit 50 ng/ml G-CSF oder mit dem korrespondierenden Puffer behandelt. Mit zunehmender Molarität an Staurosporin nahm die Viabilität der Zellen stark ab. RSC96 Zellen, die mit G-CSF behandelt wurden, zeigten einen moderaten aber signifikanten Anstieg der Viabilität im Bereich gemäßigter Konzentrationen Staurosporin bis zu 10 nM. Bei höheren Konzentrationen von 100 bzw.

1000 nM waren keine signifikanten Unterschiede zwischen G-CSF- und Puffer-behandelten Zellen messbar.

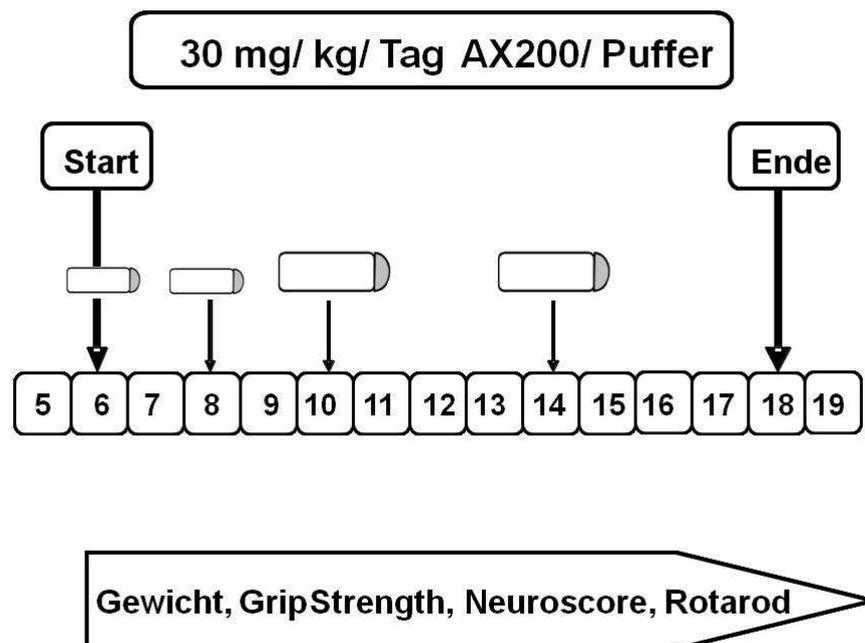


**Abbildung 29** Versuche zur Steigerung der Viabilität mit Hilfe von G-CSF in apoptotischen Zellen. Am Vortag wurden RSC96 Zellen in einer 96-well Platte ausgesät, um sie am darauf folgenden Tag mit unterschiedlichen Konzentrationen von Staurosporin zu behandeln. Unmittelbar nach Zugabe des Staurosporins wurde 50 ng/ml huG-CSF bzw. der korrespondierende Puffer zu den Zellen gegeben. Die Analyse erfolgte nach 48h mit Hilfe der Reagenz CellTiter-Blue bei 560nm/590nm.

### 4.2.3 Effekte einer G-CSF Behandlung in Trembler-J Mäusen

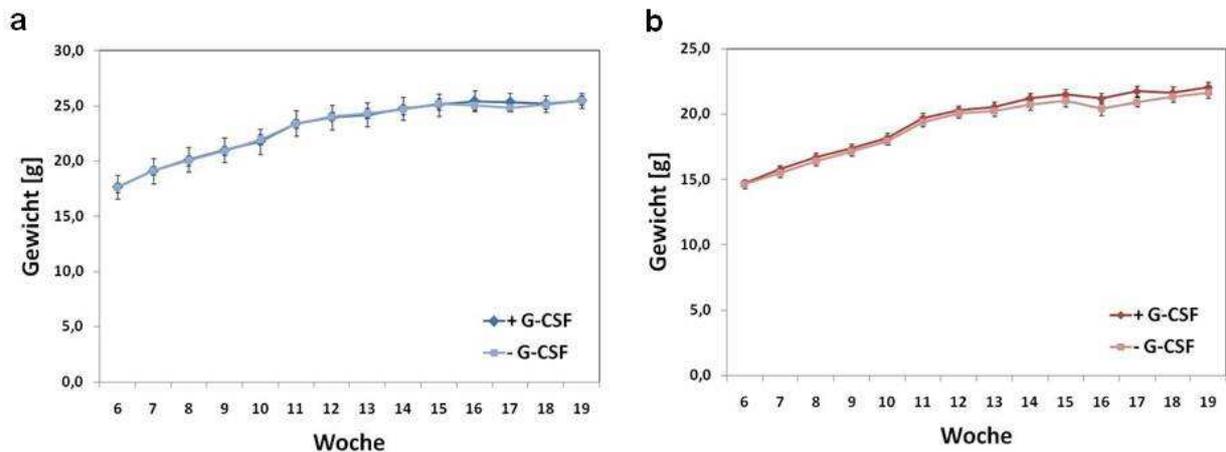
Nachdem der G-CSF-R in Schwanzzellen nachgewiesen und die Aktivierung anti-apoptotischer Signalwege durch G-CSF über den selbigen aufgezeigt werden konnte, sollten im Anschluss daran die therapeutischen Effekte des hämatopoetischen Wachstumsfaktors G-CSF auf den Phänotyp von Trembler-J Mäusen, einem Modell für CMT1A, untersucht werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine ausreichend große Kohorte des Stammes B6.D2-Pmp22<sup>Tr-J</sup>/J im Alter von fünf Wochen genotypisiert. Eine Gruppe bekam AX200 (G-CSF) als Medikament, wohingegen die andere Gruppe Puffer erhielt. Eine Gruppe bestand aus jeweils 27 Tieren beiderlei Geschlechts. Als Kontrolle wurden sechs Wildtypiere mitgeführt. Für die Darreichung der Medikamente wurden den Tieren in einem Alter von

sechs Wochen unter Gasnarkose osmotische Pumpen subkutan implantiert und regelmäßig ausgetauscht. Mithilfe dieser Pumpen wurde eine gleichmäßige Abgabe von AX200 bzw. Puffer gewährleistet. Die Behandlung der Tiere betrug in Anlehnung an bereits durchgeführte Studien mit Trembler-J Mäusen drei Monate [97, 107]. Im Laufe der dreimonatigen Behandlung wurden wöchentliche Verhaltenstests zur Überprüfung der motorischen und sensorischen Fähigkeiten durchgeführt (siehe Abbildung 30).



**Abbildung 30 Behandlungsprotokoll.** Die Behandlung für die Tiere mit AX200 bzw. mit dessen Puffer startete im Alter von sechs Wochen und dauerte 12 Wochen an, wobei die Tiere in diesem Zeitrahmen wöchentlichen motorischen Tests unterzogen wurden. Die kleinen Pumpen in der Abbildung entsprechen dem Modell 2002, die größeren dem Modell 2004.

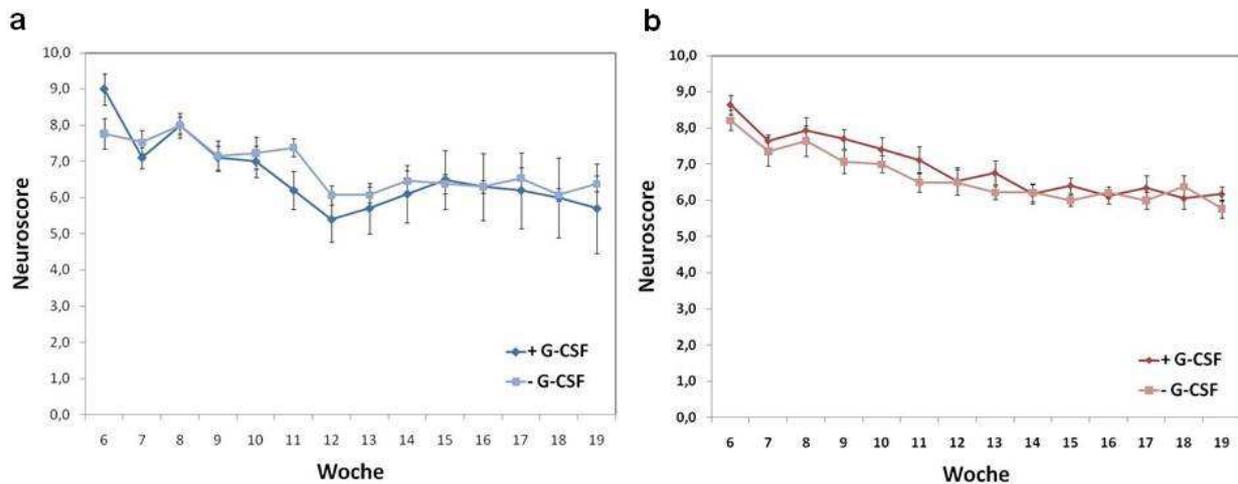
Neben den Verhaltenstests wurde auch das Gewicht der Tiere regelmäßig überprüft. Dafür wurden die Tiere einmal wöchentlich morgens gewogen. In Abbildung 31a ist die Entwicklung des gemittelten Gewichts der behandelten und unbehandelten männlichen Trembler-J Tiere dargestellt, in Abbildung 31b das gemittelte Gewicht der weiblichen Tiere. Im Verlauf der Studie nahmen beide Behandlungsgruppen beiderlei Geschlechts sukzessive an Gewicht zu, wobei die männlichen Tiere gemittelt rund 3 g mehr wogen als die weiblichen Tiere. Signifikante Unterschiede konnten zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen allerdings nicht festgestellt werden. Im Gegensatz zu den Wildtyptieren (nicht in der Abbildung gezeigt) wogen die Trembler-J Tiere im Mittel rund 2 g weniger.



**Abbildung 31 Entwicklung des Gewichts in behandelten und unbehandelten Trembler-J Tieren.** Für die Bestimmung des Körpergewichts wurden die beiden Tiergruppen jeweils morgens zur ungefähr gleichen Zeit gewogen. Sowohl die männlichen (a) als auch die weiblichen (b) Tiere beider Behandlungsgruppen nahmen an Gewicht zu, wobei keine signifikanten Unterschiede auftraten. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM. (blau= männlich,  $n=23$ ; rot=weiblich,  $n=31$ )

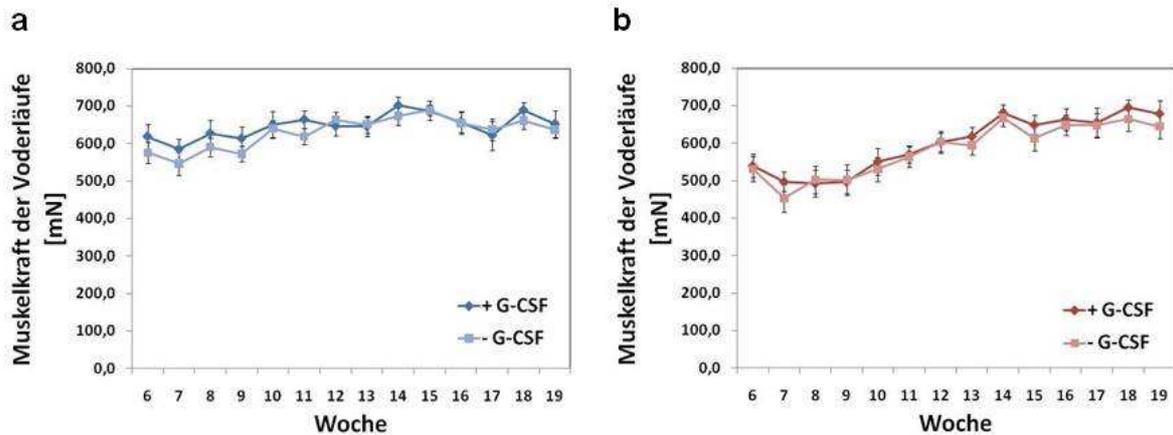
Für die Beschreibung der Entwicklung der Krankheitssymptome im Verlauf der Zeit wurde ein sogenannter Neuroscore verwendet. Mit Hilfe des Neuroscores können die typischen Symptome einer Krankheit besser eingeschätzt werden.

Bei der Evaluierung des Neuroscores über einen Zeitraum von 14 Wochen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen sowohl männlichen (Abbildung 32 a) als auch weiblichen (Abbildung 32 b) Geschlechts beobachtet werden. Allerdings kam es im Laufe der Studie in beiden Gruppen und Geschlechtern zu einer Verminderung des Neuroscores, also zu einer Verbesserung der phänotypischen Symptome der Trembler-J Tiere. Im Vergleich mit den Trembler-J Tieren beider Gruppen erzielten die mitgeführten Wildtypiere (nicht in der Abbildung gezeigt) durchgängig einen Neuroscore von 0 Punkten.



**Abbildung 32 Darstellung des Neuroscores von behandelten und unbehandelten Trembler-J Tieren.** Ein sogenannter Neuroscore stellt eine gängige Kalkulationshilfe zur Darstellung eines Krankheitsverlaufes dar. Innerhalb der 14 wöchigen Erfassung des Krankheitsverlaufs kam es zu einer sichtbaren Verbesserung in beiden Tiergruppen beiderlei Geschlechts. Dennoch waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen zu beobachten. Gezeigt ist der Mittelwert  $\pm$  SEM. (blau= männlich,  $n=23$ ; rot=weiblich,  $n=31$ )

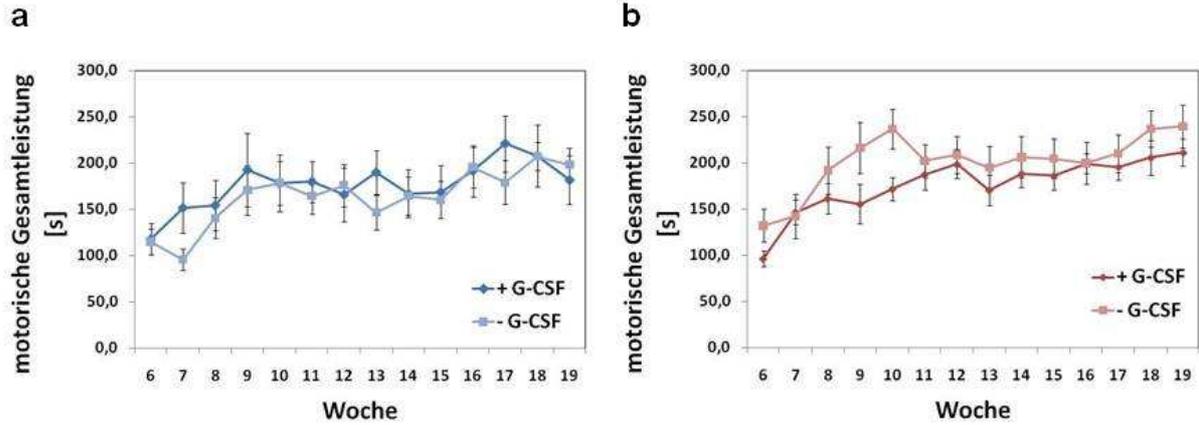
Mit Hilfe des Grip Strength Tests konnte die Kraft in den Vorderläufen der Mäuse bestimmt und somit eine Aussage über ihren Krankheitsverlauf getroffen werden. Abbildung 33 a zeigt die gemittelten Werte des Grip Strength Tests der männlichen Tiere über einen Zeitraum von 14 Wochen. Im Verlauf der Studie wiesen beide Behandlungsgruppen eine geringfügige Erhöhung ihrer Muskelkraft von  $\sim 600$  mN auf  $\sim 650$  mN in den Vorderläufen auf. Der Kurvenverlauf beider Tiergruppen verlief nahezu identisch ohne signifikante Unterschiede. In Abbildung 33 b sind die Werte der weiblichen Tiere zu sehen. Auch hier zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Behandlungsgruppen. Allerdings erhöhte sich die Muskelkraft in der Vorderläufen der weiblichen Tiere in einem größerem Maße im Vergleich zu den männlichen Tieren von  $\sim 550$  mN auf  $\sim 650$  mN. Die mitgeführten Wildtypiere erzielten bei dieser Übung  $>800$  mN und sind nicht in der Abbildung dargestellt.



**Abbildung 33 Darstellung der Muskelkraft der Vorderläufe von behandelten und unbehandelten Trembler-J Tieren.** Die Muskelkraft der Vorderläufe wurde im Rahmen dieser Studie mit Hilfe eines sogenannten Grip Strength Meters analysiert. Die Ergebnisse dieses Tests zeigten die reduzierte Kraft der beiden Tiergruppen beiderlei Geschlechts. Allerdings kam es dabei zu keinen signifikanten Unterschieden in den beiden Behandlungsgruppen. Gezeigt ist der Mittelwert +/- SEM. (blau= männlich, n=23; rot=weiblich, n=31)

Ein letzter motorischer Test, der wöchentlich mit den Tieren durchgeführt wurde, beschrieb die sogenannte Overall Motor Performance der beiden Behandlungsgruppen. Die Overall Motor Performance wurde mithilfe des Rotarods ermittelt. Der Mittelwert von drei Messungen wurde notiert. Um die Tiere an das Gerät zu gewöhnen wurde auch hier eine Woche vor Beginn der Studie mit ihnen einmalig trainiert.

In Abbildung 34 a ist der Verlauf der motorischen Gesamtleistung beider männlicher Tiergruppen über einen Zeitraum von 14 Wochen dargestellt. Bis auf nicht signifikanten Abweichungen der mit Vehikel behandelten Gruppe ähneln sich auch in diesem motorischen Test beide Kurvenverläufe. Die Zeit, die die Tiere auf dem Rotarod verblieben, nahm bei beiden Behandlungsgruppen im Verlauf der dreieinhalb Monate von durchschnittlich ~116 s auf ~190 s stetig zu. Abbildung 34 b zeigt die beiden Kurvenverläufe der weiblichen Tiere. In beiden Behandlungsgruppen nahm die Zeit auf dem Rotarod im Verlauf der Studie von ~110 s auf ~225 s zu. Es kam in diesem Zeitraum zu keinen signifikanten Unterschieden. Die mitgeführten Wildtypiere erreichten beim Rotarod Test mühelos die maximale Zeit von 470 s und sind in dieser Abbildung nicht aufgeführt.



**Abbildung 34** Darstellung der motorischen Gesamtleistung von behandelten und unbehandelten Trembler-J Tieren. Mit Hilfe des Rotarods wurde die motorische Gesamtleistung der Trembler-J Mäuse über einen Zeitraum von 14 Wochen bestimmt. Der Rotarod Test zeigte ein klares Defizit der motorischen Gesamtleistung bei beiden Tiergruppen beiderlei Geschlechter, wobei es zu keinen signifikanten Unterschieden kam. Gezeigt ist der Mittelwert +/- SEM. (blau= männlich, n=23; rot=weiblich, n=31)

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Screening einer Peptidbibliothek des hämatopoetischen Wachstumsfaktors G-CSF

Ein Ziel dieser Doktorarbeit war, agonistisch wirkende Peptidfragmente des Wachstumsfaktors G-CSF zu identifizieren. Für dieses Anliegen wurden zwei alternative Strategien entwickelt, um die Durchführbarkeit des Projekts zu gewährleisten. Eine dieser Methoden war der sogenannte Split-TEV basierte Assay [61, 62], mit dem die spezifische Rezeptoraktivierung mit nachgeschalteter Reporteraktivierung durch einzelne G-CSF-Peptide nachgewiesen werden sollten. Bei der anderen Methode handelte es sich um einen zellbasierten Assay.

Bei der Peptidbibliothek handelte es sich um 20 Aminosäuren lange Peptide, die direkt von der Sequenz des humanen G-CSF abgeleitet worden waren. Die Entdeckung eines solchen Peptids dieser Peptidbibliothek, das agonistisch und gleichzeitig spezifisch wirkt, wäre im Gegensatz zu dem G-CSF Protein eine vorteilhafte pharmakologische Weiterentwicklung. Denn neurodegenerative Erkrankungen wie die CMT-Krankheit erfordern eine lebenslange, medikamentöse Versorgung, die mit Hilfe von neurospezifisch wirkenden Peptiden besser gewährleistet werden könnte. Die Entdeckung eines solchen G-CSF Peptids könnte die Produktionskosten reduzieren, die Plasmahalbwertszeit möglicherweise verlängern und zu weniger unerwünschten Wirkungen führen, wie die Erhöhung der Leukozyten.

Bei der Etablierung und Optimierung des Split-TEV Assays kam es jedoch zu unerwarteten Schwierigkeiten, ein verlässliches Reportersignal der Firefly-Luciferase zu erhalten. Ohne dieses robuste Signal war es leider nicht möglich die Peptidbibliothek zu screenen. Nach Rücksprache mit dem Erfinder des Split-TEV Assays PD Dr. Moritz Rossner ist die Durchführbarkeit des Split-TEV Assays nicht in allen Zellsystemen und nicht für alle Signalwege garantiert.

Aufgrund dieser Schwierigkeiten bei der Etablierung des Screenings mit Hilfe des Split-TEV Assays wurde die G-CSF abhängige Suspensionszelllinie NFS-60 für dieses Vorhaben herangezogen. Die Etablierung dieses Assays verlief problemlos. Obwohl dieser hoch sensitiv war und eine Detektion von Peptiden mit einer bis zu  $3,4 \times 10^7$  - fach niedrigeren Aktivität als das Volllänge Protein erlaubt hätte, konnten keine positiven Treffer verzeichnet werden. Eine Post-Hoc Power-Analyse des Screenings zeigte, dass eine Erhöhung in der Viabilität der Zellen um 10 % mit einer Power von 80 % hätte detektiert werden können.

Gründe für das Scheitern des Projekts könnten entweder technische Probleme oder der zellbasierte Screening Assay selbst sein. Durch die sich überlappende G-CSF Peptidbibliothek wurde die gesamte kodierende Proteinsequenz des Peptidhormons abgedeckt. Der Reinheitsgrad der Peptide mit mindestens 30 % intaktem Peptid war sinnvoll gewählt.

Es ist möglich, dass die Länge der einzelnen Peptide nicht ausreichend war, den G-CSF Rezeptor vollständig zu aktivieren. Allerdings sind in der Literatur auch andere agonistische Peptide wie für den Erythropoietin (EPO) Rezeptor oder NCAM (*neural cell adhesion molecule*) beschrieben worden, die eine Länge von 20 Aminosäuren und weniger besitzen.

Ein weiterer interessanter Punkt ist die Tatsache, dass der G-CSF Rezeptor nur durch Bindung eines G-CSF Dimers selbst dimerisieren und dadurch induziert werden kann [18]. Auch das kleine Molekül SB 247464 wirkt möglicherweise durch seine zweifache Rotationssymmetrie als Auslöser für die Dimerisierung des G-CSF Rezeptors [43]. Es könnte daher für zukünftige Ansätze von Vorteil sein längere Peptide bzw. Peptide mit einer Fähigkeit zu dimerisieren für ein solches Vorhaben zu entwickeln.

## **5.2 Untersuchung zur Wirkung von G-CSF in einem Mausmodell für CMT1A**

Im zweiten Teil dieser Doktorarbeit sollte die Wirkungsweise des Wachstumsfaktors G-CSF auf die hereditäre Neuropathie CMT1A untersucht werden. Dieser Subtyp ist eine der am häufigsten auftretenden Formen dieser Erkrankung und wurde aufgrund dessen als Modell für diese Untersuchungen ausgewählt. Da kürzlich ein neues Wirkungsspektrum von G-CSF im ZNS nachgewiesen wurde [5, 35, 37, 39], sollten nun die Effekte des Wachstumsfaktors auf das PNS untersucht werden.

### **5.2.1 Effekte von G-CSF in der Schwanzzelllinie RSC96**

Die erste Frage, die im Zusammenhang mit dieser Studie aufkommt, ist, ob die von G-CSF aktivierten Zielmechanismen irrelevant im Zusammenhang mit dem Fortschreiten der CMT Erkrankung sind bzw. ob G-CSF die für diese Krankheit relevanten Mechanismen nicht aktiviert. In der Schwanzzelllinie RSC96 konnte die Rezeptorexpression des G-CSF-R nachgewiesen werden, sowie die Aktivierung von anti-apoptotischen Signalwegen durch den selbigen. G-CSF führte in dieser Zelllinie zu einer moderaten Protektion gegen einen Staurosporin-induzierten Zelltod. Allerdings wurde dabei nicht die Auswirkung des Wachstumsfaktors auf den Zelltod im Zusammenhang mit dem überexprimierten Pmp22 in Schwanzzellen untersucht. Es ist möglich, dass auf essentielle Mechanismen wie die Expression von Pmp22 gezielt werden muss, damit ein Medikament seine Wirksamkeit zeigen kann. Kaya et al. konnten ihrer Studie zeigen, dass durch die Gabe von Vitamin C die Genexpression von Pmp22 unterdrückt werden konnte, indem die Ascorbinsäure als negativer Regulator auf den Promotor von Pmp22 wirkt [104]. Belin et al. schrieben Vitamin C anti-proliferative Aktivität zu, die wahrscheinlich in der Inhibierung von Genen, die an der Proteinsynthese beteiligt sind, begründet ist [123].

### **5.2.2 Effekte einer G-CSF Behandlung in Trembler-J Mäusen**

Es konnten keine Effekte unter der dreimonatigen Gabe von G-CSF in dem dafür verwendeten Tiermodell Trembler-J beobachtet werden. Daher kam die Frage auf, ob Fehler im Design der Studie oder technische Probleme, die die Observierung eines Effektes schwierig machten, die Ursache für das Scheitern der Studie waren. Die Dosierung und die

Verabreichung durch osmotische Pumpen wurde bereits zuvor in ALS Modellen angewendet, in denen sie eindeutige Effekte wie beispielsweise überlebende Motoneuronen, funktionale Aspekte und das Überleben der Tiere zeigten [40]. Zudem lagen die gewählten 30 µg G-CSF/kg/ Tag innerhalb der therapeutischen Bandbreite, da sie in einer Reihe von anderen Modellen protektive oder stimulierende Effekte aufwiesen [39, 40]. Die Stabilität und die kontinuierliche Freisetzung von G-CSF in den verwendeten Pumpen wurde ebenfalls bereits gezeigt [40], obwohl die G-CSF Konzentration im Serum der Tiere dieser Studie nicht überprüft wurde.

Auch die Behandlungsdauer von drei Monaten sollte im Vergleich zu anderen therapeutischen Studien ausreichend für die Detektion eines Effekts sein. Khajavi et al. behandelten Trembler-J Mäuse beispielsweise für drei Monate mit Curcumin, das täglich verabreicht wurde [97]. Sahenk et al. injizierten dreimal pro Woche NT-3 (Neurotrophin-3) über einen Zeitraum von 12 Wochen [107].

Man könnte auch den ausgewählten Therapiebeginn anzweifeln, da andere Studien bereits im Alter von P8 gestartet wurden [109], einem Zeitpunkt, zu dem die Myelinisierung gerade eingesetzt hat [124]. Jedoch erscheint der in dieser Studie gewählte Behandlungsbeginn im Alter von sechs Wochen als angemessen. Wenn man den Zeitpunkt mit der Curcumin Studie von Khajavi et al. vergleicht, konnten sowohl bei Therapiebeginn im Alter von zwei Wochen als auch im Alter von drei Monaten eine Verbesserung der Symptome beobachtet werden. Allerdings waren die Effekte der Behandlung bei den jüngeren Trembler-J Tieren größer als bei den älteren Tieren [97]. Aufgrund der oben aufgeführten Gründe sollte das gewählte Behandlungsschema als adequat betrachtet werden, um relevante Behandlungseffekte in diesem Tiermodell zu detektieren.

Eine zweite Frage, die sich stellt, ist, ob der Wachstumsfaktor die für die CMT Erkrankung relevanten Mechanismen anspricht. Es ist durchaus möglich, dass ein essentieller Mechanismus die Beeinflussung der Expression des Pmp22 Levels ist. Studien in Trembler-J Tieren mit Vitamin C zeigten eine Reduzierung des exprimierten Pmp22 unterhalb des Wertes, der für das Auslösen des Phänotyps dieser Erkrankung nötig ist [104, 125]. Eine Langzeittherapie mit Onapristone, einem Progesteron Antagonisten reduzierte ebenso die erhöhten Pmp22 Level und verbesserte den Phänotyp von älteren Tieren [126, 127]. Ein Punkt, der gegen diese Argumentation spricht, ist, dass Curcumin keinen direkten Einfluss auf die Expression von Pmp22 hat. Dennoch kann es die schwerwiegende Neuropathie in Trembler-J Tieren abmildern, indem es der Aggregation mutierter Proteine und der damit verbundenen Apoptose entgegenwirken kann [97, 110].

Ein auffallender Unterschied im Vergleich zu einer beträchtlichen Anzahl von anderen neurologischen Krankheitsmodellen, die im Zusammenhang mit Effekten von G-CSF untersucht wurden, ist die Herabregulierung im Gegensatz zur bisher beobachteten Hochregulierung des G-CSF-R im Ischiasnerv von Trembler-J Mäusen. In allen anderen Modellen, die untersucht wurden, wurde eine Hochregulierung des Rezeptors in kranken Zellen vermutlich als endogene protektive Antwort beobachtet [36, 39]. Aus diesem Grund ist es möglich, dass sich Schwanzzellen anders als die bisher untersuchten Zellen verhalten, und dass aufgrund der Herabregulierung des Rezeptors die protektive Aktivität von exogen zugefügtem G-CSF limitiert ist.

## **6 SCHLUSSFOLGERUNG**

Das ursprüngliche Ziel, für chronische Erkrankungen wie die CMT Krankheit besser geeignete Peptidagonisten des G-CSF Rezeptors bereitzustellen, konnte nicht erfüllt werden. Im Vergleich zu anderen Studien könnte es in Zukunft von Vorteil sein, längere Peptide bzw. Peptide mit einer Fähigkeit zu dimerisieren für ein solches Vorhaben zu entwickeln.

Auch im zweiten Projekt dieser Doktorarbeit konnten keine Effekte von G-CSF in einem Modell für hereditäre Neuropathien beobachtet werden. Die im ZNS demonstrierten Effekte konnten nicht im PNS wiederholt werden.

## 7 REFERENZEN

1. Nagata, S., et al., *Molecular cloning and expression of cDNA for human granulocyte colony-stimulating factor*. Nature, 1986. **319**(6052): p. 415-8.
2. Welte, K., et al., *Purification and biochemical characterization of human pluripotent hematopoietic colony-stimulating factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. **82**(5): p. 1526-30.
3. Burgess, A.W. and D. Metcalf, *Characterization of a serum factor stimulating the differentiation of myelomonocytic leukemic cells*. Int J Cancer, 1980. **26**(5): p. 647-54.
4. Vellenga, E., et al., *Independent regulation of M-CSF and G-CSF gene expression in human monocytes*. Blood, 1988. **71**(6): p. 1529-32.
5. Schneider, A., H.G. Kuhn, and W.R. Schabitz, *A role for G-CSF (granulocyte-colony stimulating factor) in the central nervous system*. Cell Cycle, 2005. **4**(12): p. 1753-7.
6. Kaushansky, K., N. Lin, and J.W. Adamson, *Interleukin 1 stimulates fibroblasts to synthesize granulocyte-macrophage and granulocyte colony-stimulating factors. Mechanism for the hematopoietic response to inflammation*. J Clin Invest, 1988. **81**(1): p. 92-7.
7. Zsebo, K.M., et al., *Vascular endothelial cells and granulopoiesis: interleukin-1 stimulates release of G-CSF and GM-CSF*. Blood, 1988. **71**(1): p. 99-103.
8. Hill, C.P., T.D. Osslund, and D. Eisenberg, *The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. **90**(11): p. 5167-71.
9. Zink, T., et al., *Structure and dynamics of the human granulocyte colony-stimulating factor determined by NMR spectroscopy. Loop mobility in a four-helix-bundle protein*. Biochemistry, 1994. **33**(28): p. 8453-63.
10. Fukunaga, R., et al., *Expression cloning of a receptor for murine granulocyte colony-stimulating factor*. Cell, 1990. **61**(2): p. 341-50.
11. Fukunaga, R., et al., *Three different mRNAs encoding human granulocyte colony-stimulating factor receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(22): p. 8702-6.
12. Foxwell, B.M., K. Barrett, and M. Feldmann, *Cytokine receptors: structure and signal transduction*. Clin Exp Immunol, 1992. **90**(2): p. 161-9.
13. Tamada, T., et al., *Homodimeric cross-over structure of the human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor signaling complex*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(9): p. 3135-40.
14. Fukunaga, R., E. Ishizaka-Ikeda, and S. Nagata, *Growth and differentiation signals mediated by different regions in the cytoplasmic domain of granulocyte colony-stimulating factor receptor*. Cell, 1993. **74**(6): p. 1079-87.
15. Nicholson, S.E., et al., *Tyrosine residues in the granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor mediate G-CSF-induced differentiation of murine myeloid leukemic (M1) cells*. J Biol Chem, 1996. **271**(43): p. 26947-53.
16. Tian, S.S., et al., *Rapid activation of the STAT3 transcription factor by granulocyte colony-stimulating factor*. Blood, 1994. **84**(6): p. 1760-4.

17. Nicholson, S.E., et al., *Tyrosine kinase JAK1 is associated with the granulocyte-colony-stimulating factor receptor and both become tyrosine-phosphorylated after receptor activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(8): p. 2985-8.
18. Ihle, J.N., et al., *Signaling through the hematopoietic cytokine receptors*. Annu Rev Immunol, 1995. **13**: p. 369-98.
19. Zhu, Q.S., et al., *G-CSF-induced tyrosine phosphorylation of Gab2 is Lyn kinase dependent and associated with enhanced Akt and differentiative, not proliferative, responses*. Blood, 2004. **103**(9): p. 3305-12.
20. Nicholson, S.E., et al., *Distinct regions of the granulocyte colony-stimulating factor receptor are required for tyrosine phosphorylation of the signaling molecules JAK2, Stat3, and p42, p44MAPK*. Blood, 1995. **86**(10): p. 3698-704.
21. Takano, H., et al., *G-CSF therapy for acute myocardial infarction*. Trends Pharmacol Sci, 2007. **28**(10): p. 512-7.
22. Tsai, R.K., et al., *Anti-apoptotic effects of human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on retinal ganglion cells after optic nerve crush are PI3K/AKT-dependent*. Exp Eye Res, 2010. **90**(5): p. 537-45.
23. Takahama, H., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor mediates cardioprotection against ischemia/reperfusion injury via phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway in canine hearts*. Cardiovasc Drugs Ther, 2006. **20**(3): p. 159-65.
24. Zhu, Q.S., et al., *G-CSF induced reactive oxygen species involves Lyn-PI3-kinase-Akt and contributes to myeloid cell growth*. Blood, 2006. **107**(5): p. 1847-56.
25. Ward, A.C., et al., *The Src-like tyrosine kinase Hck is activated by granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and docks to the activated G-CSF receptor*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **251**(1): p. 117-23.
26. Corey, S.J., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling involves the formation of a three-component complex with Lyn and Syk protein-tyrosine kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(11): p. 4683-7.
27. Fuste, B., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor increases expression of adhesion receptors on endothelial cells through activation of p38 MAPK*. Haematologica, 2004. **89**(5): p. 578-85.
28. Chang, F., et al., *Signal transduction mediated by the Ras/Raf/MEK/ERK pathway from cytokine receptors to transcription factors: potential targeting for therapeutic intervention*. Leukemia, 2003. **17**(7): p. 1263-93.
29. Baumann, M.A., et al., *Modulation of MEK activity during G-CSF signaling alters proliferative versus differentiative balancing*. Am J Hematol, 2001. **68**(2): p. 99-105.
30. Miranda, M.B., T.F. McGuire, and D.E. Johnson, *Importance of MEK-1/-2 signaling in monocytic and granulocytic differentiation of myeloid cell lines*. Leukemia, 2002. **16**(4): p. 683-92.
31. Daniel, C.P. and T.M. Dexter, *The role of growth factors in haemopoietic development: clinical and biological implications*. Cancer Metastasis Rev, 1989. **8**(3): p. 253-62.
32. Neidhart, J., et al., *Granulocyte colony-stimulating factor stimulates recovery of granulocytes in patients receiving dose-intensive chemotherapy without bone marrow transplantation*. J Clin Oncol, 1989. **7**(11): p. 1685-92.

33. Hartung, T., *Anti-inflammatory effects of granulocyte colony-stimulating factor*. *Curr Opin Hematol*, 1998. **5**(3): p. 221-5.
34. Johnsen, H.E., et al., *Increased yield of myeloid progenitor cells in bone marrow harvested for autologous transplantation by pretreatment with recombinant human granulocyte-colony stimulating factor*. *Bone Marrow Transplant*, 1992. **10**(3): p. 229-34.
35. Pitzer, C., et al., *The hematopoietic factor granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in experimental spinal cord injury*. *J Neurochem*, 2010. **113**(4): p. 930-42.
36. Schneider, A., et al., *The hematopoietic factor G-CSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis*. *J Clin Invest*, 2005. **115**(8): p. 2083-98.
37. Schabitz, W.R., et al., *Neuroprotective effect of granulocyte colony-stimulating factor after focal cerebral ischemia*. *Stroke*, 2003. **34**(3): p. 745-51.
38. Schabitz, W.R. and A. Schneider, *New targets for established proteins: exploring G-CSF for the treatment of stroke*. *Trends Pharmacol Sci*, 2007. **28**(4): p. 157-61.
39. Pitzer, C., et al., *Granulocyte-colony stimulating factor improves outcome in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis*. *Brain*, 2008. **131**(Pt 12): p. 3335-47.
40. Henriques, A., et al., *CNS-targeted Viral Delivery of G-CSF in an Animal Model for ALS: Improved Efficacy and Preservation of the Neuromuscular Unit*. *Mol Ther.*, 2010. **19**(2): p. 284-92.
41. Schabitz, W.R., et al., *AXIS: a trial of intravenous granulocyte colony-stimulating factor in acute ischemic stroke*. *Stroke*, 2010. **41**(11): p. 2545-51.
42. Tanaka, H. and T. Kaneko, *Pharmacokinetics of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in mice*. *Blood*, 1992. **79**(2): p. 536-9.
43. Tian, S.S., et al., *A small, nonpeptidyl mimic of granulocyte-colony-stimulating factor [see commetns]*. *Science*, 1998. **281**(5374): p. 257-9.
44. Kaushansky, K., *Small molecule mimics of hematopoietic growth factors: improving on Mother Nature?* *Leukemia*, 2001. **15**(4): p. 673-4.
45. Hansen, S.M., et al., *Synthetic NCAM-derived ligands of the fibroblast growth factor receptor*. *Adv Exp Med Biol*, 2010. **663**: p. 355-72.
46. Manfe, V., et al., *Peptides derived from specific interaction sites of the fibroblast growth factor 2-FGF receptor complexes induce receptor activation and signaling*. *J Neurochem*, 2010. **114**(1): p. 74-86.
47. Kiselyov, V.V., et al., *Structural basis for a direct interaction between FGFR1 and NCAM and evidence for a regulatory role of ATP*. *Structure*, 2003. **11**(6): p. 691-701.
48. Ronn, L.C., B.P. Hartz, and E. Bock, *The neural cell adhesion molecule (NCAM) in development and plasticity of the nervous system*. *Exp Gerontol*, 1998. **33**(7-8): p. 853-64.
49. Tomasiewicz, H., et al., *Genetic deletion of a neural cell adhesion molecule variant (N-CAM-180) produces distinct defects in the central nervous system*. *Neuron*, 1993. **11**(6): p. 1163-74.
50. Cremer, H., et al., *Inactivation of the N-CAM gene in mice results in size reduction of the olfactory bulb and deficits in spatial learning*. *Nature*, 1994. **367**(6462): p. 455-9.

51. Ronn, L.C., et al., *Identification of a neuritogenic ligand of the neural cell adhesion molecule using a combinatorial library of synthetic peptides*. Nat Biotechnol, 1999. **17**(10): p. 1000-5.
52. Jacobsen, J., et al., *A peptide motif from the second fibronectin module of the neural cell adhesion molecule, NCAM, NLIKQDDGGSPIRHY, is a binding site for the FGF receptor*. Neurochem Res, 2008. **33**(12): p. 2532-9.
53. Soroka, V., et al., *Induction of neuronal differentiation by a peptide corresponding to the homophilic binding site of the second Ig module of the neural cell adhesion molecule*. J Biol Chem, 2002. **277**(27): p. 24676-83.
54. Pankratova, S., et al., *Neuroprotective properties of a novel, non-haematopoietic agonist of the erythropoietin receptor*. Brain, 2010.
55. Johnson, D.L., et al., *Identification of a 13 amino acid peptide mimetic of erythropoietin and description of amino acids critical for the mimetic activity of EMP1*. Biochemistry, 1998. **37**(11): p. 3699-710.
56. Livnah, O., et al., *Functional mimicry of a protein hormone by a peptide agonist: the EPO receptor complex at 2.8 Å*. Science, 1996. **273**(5274): p. 464-71.
57. Macdougall, I.C., et al., *A peptide-based erythropoietin-receptor agonist for pure red-cell aplasia*. N Engl J Med, 2009. **361**(19): p. 1848-55.
58. Wrighton, N.C., et al., *Small peptides as potent mimetics of the protein hormone erythropoietin*. Science, 1996. **273**(5274): p. 458-64.
59. Stead, R.B., et al., *Evaluation of the safety and pharmacodynamics of Hematide, a novel erythropoietic agent, in a phase I, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study in healthy volunteers*. Blood, 2006. **108**(6): p. 1830-4.
60. Doss, S. and B. Schiller, *Peginesatide: a potential erythropoiesis stimulating agent for the treatment of anemia of chronic renal failure*. Nephrol Nurs J, 2011. **37**(6): p. 617-26.
61. Wehr, M.C., et al., *Monitoring regulated protein-protein interactions using split TEV*. Nat Methods, 2006. **3**(12): p. 985-93.
62. Wehr, M.C., et al., *Analysis of transient phosphorylation-dependent protein-protein interactions in living mammalian cells using split-TEV*. BMC Biotechnol, 2008. **8**: p. 55.
63. Knuhtsen, H., E. Hiebert, and D.E. Purcifull, *Partial purification and some properties of tobacco etch virus induced intranuclear inclusions*. Virology, 1974. **61**(1): p. 200-9.
64. Babe, L.M. and C.S. Craik, *Viral proteases: evolution of diverse structural motifs to optimize function*. Cell, 1997. **91**(4): p. 427-30.
65. Bazan, J.F. and R.J. Fletterick, *Detection of a trypsin-like serine protease domain in flaviviruses and pestiviruses*. Virology, 1989. **171**(2): p. 637-9.
66. Parks, T.D., et al., *Expression and purification of a recombinant tobacco etch virus NIa proteinase: biochemical analyses of the full-length and a naturally occurring truncated proteinase form*. Virology, 1995. **210**(1): p. 194-201.
67. Sadowski, I., et al., *GAL4-VP16 is an unusually potent transcriptional activator*. Nature, 1988. **335**(6190): p. 563-4.
68. Hastings, J.W., *Biological diversity, chemical mechanisms, and the evolutionary origins of bioluminescent systems*. J Mol Evol, 1983. **19**(5): p. 309-21.

69. Wilson, T. and J.W. Hastings, *Bioluminescence*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1998. **14**: p. 197-230.
70. Gould, S.J. and S. Subramani, *Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology*. Anal Biochem, 1988. **175**(1): p. 5-13.
71. Nakatsu, T., et al., *Structural basis for the spectral difference in luciferase bioluminescence*. Nature, 2006. **440**(7082): p. 372-6.
72. Inouye, S., *Firefly luciferase: an adenylate-forming enzyme for multicatalytic functions*. Cell Mol Life Sci, 2009. **67**(3): p. 387-404.
73. Shimomura, O., *Bioluminescence in the sea: photoprotein systems*. Symp Soc Exp Biol, 1985. **39**: p. 351-72.
74. Lorenz, W.W., et al., *Isolation and expression of a cDNA encoding Renilla reniformis luciferase*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991. **88**(10): p. 4438-42.
75. Srikantha, T., et al., *The sea pansy Renilla reniformis luciferase serves as a sensitive bioluminescent reporter for differential gene expression in Candida albicans*. J Bacteriol, 1996. **178**(1): p. 121-9.
76. Skre, H., *Genetic and clinical aspects of Charcot-Marie-Tooth's disease*. Clin Genet, 1974. **6**(2): p. 98-118.
77. Patzko, A. and M.E. Shy, *Update on Charcot-Marie-Tooth disease*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2010. **11**(1): p. 78-88.
78. Casanovas, C., et al., *Charcot-Marie-tooth disease*. Foot Ankle Spec, 2008. **1**(6): p. 350-4.
79. Banchs, I., et al., *Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease*. J Biomed Biotechnol, 2009. **2009**: p. 985415.
80. Berger, P., P. Young, and U. Suter, *Molecular cell biology of Charcot-Marie-Tooth disease*. Neurogenetics, 2002. **4**(1): p. 1-15.
81. Niemann, A., P. Berger, and U. Suter, *Pathomechanisms of mutant proteins in Charcot-Marie-Tooth disease*. Neuromolecular Med, 2006. **8**(1-2): p. 217-42.
82. Lupski, J.R., et al., *DNA duplication associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A*. Cell, 1991. **66**(2): p. 219-32.
83. Thomas, P.K., *Overview of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **883**: p. 1-5.
84. Shy, M.E., et al., *Phenotypic clustering in MPZ mutations*. Brain, 2004. **127**(Pt 2): p. 371-84.
85. Vondracek, P., et al., *X-linked Charcot-Marie-Tooth disease: phenotypic expression of a novel mutation Ile127Ser in the GJB1 (connexin 32) gene*. Muscle Nerve, 2005. **31**(2): p. 252-5.
86. Vance, J.M., *Charcot-Marie-Tooth disease type 2*. Ann N Y Acad Sci, 1999. **883**: p. 42-6.
87. Suter, U. and S.S. Scherer, *Disease mechanisms in inherited neuropathies*. Nat Rev Neurosci, 2003. **4**(9): p. 714-26.
88. Robertson, A.M., et al., *Abnormal Schwann cell/axon interactions in the Trembler-J mouse*. J Anat, 1997. **190** ( Pt 3): p. 423-32.
89. Notterpek, L., et al., *PMP22 accumulation in aggresomes: implications for CMT1A pathology*. Neurobiol Dis, 1999. **6**(5): p. 450-60.

90. Nave, K.A., M.W. Sereda, and H. Ehrenreich, *Mechanisms of disease: inherited demyelinating neuropathies--from basic to clinical research*. Nat Clin Pract Neurol, 2007. **3**(8): p. 453-64.
91. Scherer, S.S. and L. Wrabetz, *Molecular mechanisms of inherited demyelinating neuropathies*. Glia, 2008. **56**(14): p. 1578-89.
92. Kohl, B., et al., *MCP-1/CCL2 modifies axon properties in a PMP22-overexpressing mouse model for Charcot-Marie-tooth 1A neuropathy*. Am J Pathol, 2010. **176**(3): p. 1390-9.
93. Valentijn, L.J., et al., *Identical point mutations of PMP-22 in Trembler-J mouse and Charcot-Marie-Tooth disease type 1A*. Nat Genet, 1992. **2**(4): p. 288-91.
94. Suter, U., et al., *A leucine-to-proline mutation in the putative first transmembrane domain of the 22-kDa peripheral myelin protein in the trembler-J mouse*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(10): p. 4382-6.
95. Robertson, A.M., et al., *Development of early postnatal peripheral nerve abnormalities in Trembler-J and PMP22 transgenic mice*. J Anat, 1999. **195 ( Pt 3)**: p. 331-9.
96. Devaux, J.J. and S.S. Scherer, *Altered ion channels in an animal model of Charcot-Marie-Tooth disease type 1A*. J Neurosci, 2005. **25**(6): p. 1470-80.
97. Khajavi, M., et al., *Oral curcumin mitigates the clinical and neuropathologic phenotype of the Trembler-J mouse: a potential therapy for inherited neuropathy*. Am J Hum Genet, 2007. **81**(3): p. 438-53.
98. Chetlin, R.D., et al., *Resistance training effectiveness in patients with Charcot-Marie-Tooth disease: recommendations for exercise prescription*. Arch Phys Med Rehabil, 2004. **85**(8): p. 1217-23.
99. Matjacic, Z. and A. Zupan, *Effects of dynamic balance training during standing and stepping in patients with hereditary sensory motor neuropathy*. Disabil Rehabil, 2006. **28**(23): p. 1455-9.
100. van Pomeran, M., et al., *The hypothesis of overwork weakness in Charcot-Marie-Tooth: a critical evaluation*. J Rehabil Med, 2009. **41**(1): p. 32-4.
101. Burns, J., et al., *Effective orthotic therapy for the painful cavus foot: a randomized controlled trial*. J Am Podiatr Med Assoc, 2006. **96**(3): p. 205-11.
102. Ward, C.M., et al., *Long-term results of reconstruction for treatment of a flexible cavovarus foot in Charcot-Marie-Tooth disease*. J Bone Joint Surg Am, 2008. **90**(12): p. 2631-42.
103. Shy, M.E., *Therapeutic strategies for the inherited neuropathies*. Neuromolecular Med, 2006. **8**(1-2): p. 255-78.
104. Kaya, F., et al., *Ascorbic acid inhibits PMP22 expression by reducing cAMP levels*. Neuromuscul Disord, 2007. **17**(3): p. 248-53.
105. Micallef, J., et al., *Effect of ascorbic acid in patients with Charcot-Marie-Tooth disease type 1A: a multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial*. Lancet Neurol, 2009. **8**(12): p. 1103-10.
106. Lewin, G.R. and Y.A. Barde, *Physiology of the neurotrophins*. Annu Rev Neurosci, 1996. **19**: p. 289-317.

107. Sahenk, Z., et al., *NT-3 promotes nerve regeneration and sensory improvement in CMT1A mouse models and in patients*. Neurology, 2005. **65**(5): p. 681-9.
108. Sahenk, Z., et al., *TrkB and TrkC agonist antibodies improve function, electrophysiologic and pathologic features in Trembler J mice*. Exp Neurol, 2010. **224**(2): p. 495-506.
109. Liu, N., et al., *Depleting endogenous neurotrophin-3 enhances myelin formation in the Trembler-J mouse, a model of a peripheral neuropathy*. J Neurosci Res, 2007. **85**(13): p. 2863-9.
110. Khajavi, M., et al., *Curcumin treatment abrogates endoplasmic reticulum retention and aggregation-induced apoptosis associated with neuropathy-causing myelin protein zero-truncating mutants*. Am J Hum Genet, 2005. **77**(5): p. 841-50.
111. Song, S., et al., *Granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) enhances recovery in mouse model of Parkinson's disease*. Neurosci Lett, 2010. **487**(2): p. 153-7.
112. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
113. Sanger, F., S. Nicklen, and A.R. Coulson, *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1977. **74**(12): p. 5463-7.
114. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
115. Nakoinz, I., et al., *Differentiation of the IL-3-dependent NFS-60 cell line and adaption to growth in macrophage colony-stimulating factor*. J Immunol, 1990. **145**(3): p. 860-4.
116. Layton, J.E., et al., *Interaction of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) with its receptor. Evidence that Glu19 of G-CSF interacts with Arg288 of the receptor*. J Biol Chem, 1999. **274**(25): p. 17445-51.
117. Badache, A. and G.H. De Vries, *Neurofibrosarcoma-derived Schwann cells overexpress platelet-derived growth factor (PDGF) receptors and are induced to proliferate by PDGF BB*. J Cell Physiol, 1998. **177**(2): p. 334-42.
118. Horan, T.P., et al., *Dimerization of granulocyte-colony stimulating factor receptor: the Ig plus CRH construct of granulocyte-colony stimulating factor receptor forms a 2:2 complex with a ligand*. J Biochem, 1997. **121**(2): p. 370-5.
119. Hunter, M.G. and B.R. Avalos, *Granulocyte colony-stimulating factor receptor mutations in severe congenital neutropenia transforming to acute myelogenous leukemia confer resistance to apoptosis and enhance cell survival*. Blood, 2000. **95**(6): p. 2132-7.
120. Chae, H.J., et al., *Molecular mechanism of staurosporine-induced apoptosis in osteoblasts*. Pharmacol Res, 2000. **42**(4): p. 373-81.
121. Andersson, M., et al., *Caspase and proteasome activity during staurosporin-induced apoptosis in lens epithelial cells*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000. **41**(9): p. 2623-32.
122. Omura, S., et al., *A new alkaloid AM-2282 OF Streptomyces origin. Taxonomy, fermentation, isolation and preliminary characterization*. J Antibiot (Tokyo), 1977. **30**(4): p. 275-82.

123. Belin, S., et al., *Antiproliferative effect of ascorbic acid is associated with the inhibition of genes necessary to cell cycle progression*. PLoS One, 2009. **4**(2): p. e4409.
124. Jessen, K.R. and R. Mirsky, *The origin and development of glial cells in peripheral nerves*. Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(9): p. 671-82.
125. Passage, E., et al., *Ascorbic acid treatment corrects the phenotype of a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease*. Nat Med, 2004. **10**(4): p. 396-401.
126. Sereda, M.W., et al., *Therapeutic administration of progesterone antagonist in a model of Charcot-Marie-Tooth disease (CMT-1A)*. Nat Med, 2003. **9**(12): p. 1533-7.
127. Meyer zu Horste, G., et al., *Antiprogestosterone therapy uncouples axonal loss from demyelination in a transgenic rat model of CMT1A neuropathy*. Ann Neurol, 2007. **61**(1): p. 61-72.

## **ANMERKUNG**

Das in dieser Doktorarbeit aufgeführte Peptidscreening des Wachstumsfaktors G-CSF wurde im Rahmen des BMBF Förderprogramms „BioProfile für die Region Braunschweig, Göttingen, Hannover“ (Forschungsvorhaben 0315180C) durchgeführt.

# **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, Nadine Conzelmann, an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als die angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher in gleicher oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungskommission vorgelegt.

Heidelberg, den 08.06.2011

# DANKSAGUNG

Zuerst möchte ich mich bei Herrn Dr. Bach und Herrn Willinger bedanken, die mir die Gelegenheit ermöglicht haben, meine Promotion bei der SYGNIS GmbH und Co. KG durchzuführen.

Herrn Professor Armin Schneider und Herrn Professor Gert Fricker danke ich für die ausgezeichnete Betreuung während meiner Doktorarbeit. Sowie Frau Dr. Claudia Pitzer, die mir sehr mit meiner Tierstudie geholfen hat.

Herrn Professor Bading und Herrn Dr. Özbeck, gilt ebenso mein Dank, da Sie freundlicherweise zugestimmt haben, meine beiden Beisitzer zu sein.

Ein weiterer großer Dank gehört den Mitarbeitern von SYGNIS, die mir bei meinen Labortätigkeiten mit Rat und Tat zur Seite standen und mich immer wieder aufgemuntert haben. Vielen lieben Dank an Ulrike Bolz, Gisela Eisenhardt, Simone Hoppe, Dr. Friederike Kirsch, Nadine Bischoff, Frank Herzog, Armin Keller, Christian Plaas, Dr. Gerhard Vogt, Oliver Wafzig, Elisabeth Janesch und Johanna Schwammel.

Paul Ruf und Gerhard Rimner möchte ich für die exzellente Pflege meiner Mäuse danken.

Im Rahmen des BMBF Projektes danke ich besonders Herrn PD Dr. Moritz Rossner, Dr. Tobias Fischer, Dr. Anna Botvinnik, Dr. Magdalena Brzózka, Anna Kathrin Stadler und Wilko Hinrichs. Danke für die schöne, aber kalte Zeit in Göttingen!

Ich danke auch meinen lieb gewonnenen Freunden Simone Hoppe, Eva Handwerker und Alexandre Henriques. Danke, dass Ihr mir immer wieder Mut zugesprochen habt und an mich geglaubt habt. Ohne Euch war es am Schluss viel zu still im 3.OG.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, die mich auf meinem Weg immer unterstützt haben.