

ZUSAMMENFASSUNG

Autosomal rezessive proximale spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine schwere neurodegenerative Erkrankung und die häufigste genetische Todesursache bei Säuglingen und Kleinkindern. SMA wird durch eine homozygote Deletion oder Mutationen des *survival of motor neuron 1 (SMN1)* Gens verursacht, welche zu einem Mangel an SMN Protein führen. Traditionell wird SMA als eine reine Erkrankung der spinalen Alpha-Motoneuronen (MN) betrachtet, welche zu einer Atrophie der Skelettmuskulatur führt. Wie der Mangel an diesem ubiquitär exprimierten Protein mit fundamentalen Zellfunktionen zu dieser zelltypspezifischen Pathologie führt, ist jedoch noch unklar. Es ist allgemein anerkannt, dass MN besonders anfällig für ein niedriges SMN-Niveau sind, nichtsdestotrotz haben zahlreiche Studien gezeigt, dass auch andere Zelltypen und Gewebe bei reduziertem SMN-Gehalt intrinsische Defekte aufweisen. Darüber hinaus wurde nicht nur gezeigt, dass der selektive SMN-Verlust in murinen MN eher einen dystrophischen Phänotyp als das gesamte SMA-Pathologiespektrum verursacht, sondern auch, dass der Verlust von MN-Zellsomata aus murinem Rückenmark zeitlich nach der Pathologie der neuromuskulären Endplatte (NMJ) auftritt. Die NMJ ist eine spezialisierte Synapse, die die Verknüpfung zwischen MN und Skelettmuskeln darstellt. Für die korrekte Übersetzung eines neuronalen Aktionspotentials in eine Muskelkontraktion bedarf es einer strikten Regulierung dieser Motoreinheit. Es ist erwiesen, dass eine fehlerhafte Funktion der MN zu einer Beeinträchtigung der NMJ und damit zur Atrophie des zugehörigen Muskels führt. Laut aktueller Studien spielt aber auch der Muskel selber eine essentielle Rolle für die Funktionstüchtigkeit der NMJ. Der Skelettmuskel ist ein endokrines Organ und reguliert durch die Freisetzung von Proteinen nicht nur die eigene Muskelbiologie, sondern interagiert so auch mit seiner Umgebung. Aus diesem Grund haben wir die Hypothese aufgestellt, dass sekretierte Faktoren aus intrinsisch defektem SMA-Muskel zu der beobachteten Pathologie der NMJ und MN in SMA beitragen könnten.

Eine detaillierte Sekretomanalyse ergab, dass ein SMN-Mangel in differenzierten Myozyten (Myotuben) zu signifikanten Sekretom-Veränderungen führt. Insgesamt implizieren die identifizierten differentiell sekretierten Proteine eine Deregulierung von Signalwegen, die die extrazelluläre Matrix beeinflussen. Der spannendste Fund war die Reduktion des C1q/tumor necrosis factor-related protein 3 (CTRP3) in dem Sekretom von SMN-defizienten Myotuben. CTRP3 ist ein sekretorisches Protein das im Blut zirkuliert und in der Zerebrospinalflüssigkeit nachgewiesen werden kann. Bisher wurde von einer Vielzahl von positiven Auswirkungen von CTRP3 auf den Stoffwechsel, die Herzfunktion, Entzündungsvorgänge und Wachstumssignalwege in diversen Zellen und Geweben berichtet. In Anbetracht der bekannten schützenden und Wachstumsfaktor-ähnlichen Funktionen von CTRP3 lässt sich vermuten, dass ein Mangel an interzellulärem CTRP3 zu einer Beeinträchtigung der MN und damit der NMJ, aber auch zu anderen in SMA beobachteten peripheren Pathologien beitragen könnte.

In dieser Arbeit durchgeführte CTRP3 Expressionsanalysen im SMA-Kontext führten zu den folgenden Erkenntnissen: Der CTRP3-Gehalt ist reduziert in dem Sekretom zweier verschiedener SMN-defizienter Muskelzelllinien, und im Vergleich zu WT-Kontrollen, stark reduziert im *Tibialis anterior* Muskel, im Blutplasma und im Gehirn von SMA Mäusen.

Um zu entschlüsseln, ob CTRP3 einen funktionellen Einfluss auf MN hat, wurden MN-ähnliche NSC34-Zellen und primäre MN mit rekombinantem CTRP3 behandelt und nachgeschaltete Signalwege analysiert. Eine umfangreiche Analyse des Proteoms von CTRP3-behandelten

NSC34-Zellen ergab, dass CTRP3 Translations- und Transkriptionswege stimuliert, und in Übereinstimmung damit, den PI3K/Akt/mTOR-Signalweg reguliert, welcher wiederum die Protein Translations-Maschinerie aktiviert. Axonale Proteinsynthese ist essentiell in Nervenzellen und vorherige Studien zeigten bereits, dass dieser Vorgang in SMA beeinträchtigt ist. Die Durchführung eines SUnSET-Experiments zeigte, dass CTRP3 die Proteinsyntheserate steigert. Außerdem fanden wir heraus, dass CTRP3 den Protein-Gehalt an SMN Protein und vaskulärem endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) hochreguliert, den *Smn*- und *Vegf*-Transkriptgehalt jedoch nicht beeinflusst. Interessanterweise wurde in vorhergehenden Studien berichtet, dass VEGF über neuroprotektive Fähigkeiten verfügt. Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse deutlich, dass CTRP3 neurotrophische Eigenschaften aufweist und die Proteinsynthese in NSC34-Zellen sowie primären MN stimuliert.

Es ist bereits bekannt, dass ein niedriges SMN-Niveau in MN das axonale Wachstum beeinträchtigt. Interessanterweise erhöhte die exogene CTRP3-Behandlung das axonale Wachstum in Wildtyp- und SMA-MN drastisch und konnte somit die Axonlänge von SMA-MN fast wieder auf das Niveau von WT-MN steigern.

Zusammenfassend hat diese Studie gezeigt, dass SMN-defiziente Myotuben differenziell Proteine sekretieren und insbesondere weniger CTRP3, einen Faktor, dem wir neuartige neurotrophische Eigenschaften zuordnen konnten. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass eine dysfunktionale retrograde Kommunikation an der NMJ zur Pathologie von MN und NMJ in SMA beitragen könnte. Um dies weiter zu untersuchen, habe ich im Rahmen dieser Arbeit in unserem Labor ein *in-vitro*-System für die neuromuskuläre Co-Kultur etabliert. Insgesamt verdeutlicht diese Studie, dass Skelettmuskeldefekte mehr als eine unerwünschte Nebenwirkung in SMA sein können