

Hauptbetreuer: Prof. Dr. Michael Sereda

Titel des Projektes: Endothelin als de-differenzierendes Signal in der Pathogenese der CMT1A-Erkrankung.

Projektbeschreibung:

Endotheline (ET) sind Peptidhormone, die eine große Rolle in der Blutdruckregulation spielen. Zwei Endothelinrezeptoren (ETR_A / ETR_B) unterschiedlicher Spezifität werden in vielen Geweben exprimiert und regulieren dort unter anderem auch die Differenzierung von Zellen. In der häufigsten erblichen peripheren Neuropathie, der durch eine Überexpression des Myelinproteins PMP22 in Schwannschen Zellen (SC) verursachten Charcot-Marie-Tooth-Erkrankung (CMT) Typ 1A, trägt eine unvollständige Differenzierung der SC entscheidend zum Pathomechanismus bei. Unsere Arbeitsgruppe hat in peripheren Nerven des Rattenmodells für CMT1A eine deutlich erhöhte Expression des für ETR_B codierenden Gens (*ednrb*) auf mRNA-Ebene festgestellt. Außerdem haben wir erste Ergebnisse, dass eine Aktivierung von ETR in SC-Kultur die Phosphorylierung von *extracellular signal-regulated kinase* (Erk) bewirkt, einem Signal zur De-Differenzierung von SC. Im Rahmen dieses Projektes wollen wir nun der Hypothese folgen, dass die erhöhte Expression von ETR_B die SC in CMT1A an ihrer Differenzierung hindert und damit eine wichtige Rolle in der Pathogenese spielt. Da mit Bosentan ein zugelassener ETR-Antagonist zur Verfügung steht, könnte das den Weg zu einer pharmakologischen Therapie von CMT1A zeigen, für die es bisher keinen zugelassenen Wirkstoff gibt.

Zunächst wollen wir aufklären, welche Konzentrationen der drei ET-Isoformen in peripheren Nerven vorliegen, und ob es in CMT1A Veränderungen gibt. In SC-Kultur können dann relevante ET-Isoformen in entsprechenden Konzentrationen zur Stimulation verwendet und die Aktivierung von Erk über ETR_A und ETR_B unter Verwendung rezeptorspezifischer Inhibitoren bestimmt werden. Ebenfalls mithilfe ETR_A - und ETR_B -spezifischer Inhibitoren soll eine mögliche endogene Aktivität des Endothelinsystems untersucht werden, denn SC produzieren ET und sind somit prinzipiell zu autokriner Stimulation befähigt. Entsprechend wollen wir auch die Konzentrationen von ET-Isoformen in konditionierten Medien von Wildtyp- und CMT1A-Kulturen bestimmen. Eine Aktivierung von ETR bewirkt wahrscheinlich eine

Freisetzung von Arachidonsäure. Um den Signalmechanismus aufzuklären, wollen wir deshalb außerdem Arachidonsäure-Konzentrationen in konditionierten Medien und die Phosphorylierung von Phospholipasen messen. Ergänzend wollen wir die Lokalisation von ETR_A und ETR_B in SC in peripheren Nerven aufklären, um die an der Endothelin-Signalisierung beteiligten Zellen (myelinisierende/nichtmyelinisierende SC, Fasertypen) zu identifizieren.

Methodisch wird das Projekt die Präparation und Aufrechterhaltung und Behandlung von Zellkulturen sowie klassische biochemische Methoden wie SDS-Page, Western Blotting und ELISA beinhalten. Außerdem werden periphere Nerven präpariert, per Immunfluoreszenz gefärbt und im Konfokalmikroskop untersucht. Alle für das Projekt notwendigen Methoden sind in unserer Arbeitsgruppe bereits etabliert und erprobt.

Literatur:

Berti-Mattera, L. N., Wilkins, P. L., Harwalkar, S., Madhun, Z., Almhanna, K., & Mattera, R. (2000). Endothelins regulate arachidonic acid release and mitogen-activated protein kinase activity in Schwann cells. *Journal of neurochemistry*, 75(6), 2316-2326.

Brennan, A., Dean, C. H., Zhang, A. L., Cass, D. T., Mirsky, R., & Jessen, K. R. (2000). Endothelins control the timing of Schwann cell generation in vitro and in vivo. *Developmental biology*, 227(2), 545-557.

Fledrich, R., Stassart, R. M., Klink, A., Rasch, L. M., Prukop, T., Haag, L., Czesnik, D., Kungl, T., Abdelaal, T. A., Keric, N., Stadelmann, C., Brück, W., Nave, K.-A., & Sereda, M. W. (2014). Soluble neuregulin-1 modulates disease pathogenesis in rodent models of Charcot-Marie-Tooth disease 1A. *Nature Medicine*, 20(9), 1055–1061. doi:10.1038/nm.3664.

Fledrich, R., Akkermann, D., Schütza, V., Abdelaal, T. A., Hermes, D., Schäffner, E., ... Sereda, M. W. & Stassart, R. M. (2019). NRG1 type I dependent autocrine stimulation of Schwann cells in onion bulbs of peripheral neuropathies. *Nature communications*, 10(1), 1467.

Sereda, M. W., Griffiths, I., Pühlhofer, A., Stewart, H., Rossner, M. J., Zimmerman, F., Magyar, J. P., Schneider, A., Hund, E., Meinck H. M., Suter, U., & Nave, K.-A. (1996). A Transgenic Rat Model of Charcot-Marie-Tooth Disease. *Neuron*, 16(5), 1049–1060. doi:10.1016/s0896-6273(00)80128-2.